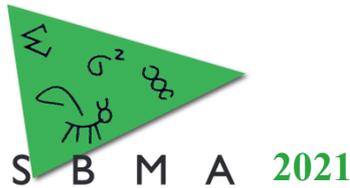


XIV Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

18 a 19 de Outubro de 2021

On-line





Genes de referência para estudos de expressão gênica no rim e no duodeno de galinhas poedeiras submetidas a diferentes níveis de cálcio e fósforo na dieta

Karine Daenquele Silva Pinto¹, Letícia Alves Salmória², Fernando de Castro Tavernari^{3,4}, Jane de Oliveira Peixoto^{2,3}, Adriana M. Guaratini Ibelli^{2,3}, Débora Ester Petry Marcelino⁵, Mariane Spudeit dal Pizzol⁴, Leila de Genova Gaya¹, Mônica Corrêa Ledur^{3,4}

¹Universidade Federal de São João del Rei, São João del Rei - MG, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná, Guarapuava, PR

³Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

⁴Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UDESC-Oeste, Chapecó, SC.

⁵Faculdade de Concórdia FACC, Concórdia, SC.

*Autor correspondente: karine.daequuele@yahoo.com

Resumo: O processo de normalização com genes de referência adequados é fundamental para obter níveis precisos de expressão gênica. Portanto, objetivou-se avaliar 10 genes candidatos de referência para determinar sua estabilidade nos tecidos do rim e duodeno de galinhas poedeiras submetidas a dietas com diferentes níveis de cálcio:fósforo. Os tecidos do rim e duodeno de 18 animais com 70 semanas de idade foram coletados, congelados e submetidos à extração de RNA e análise quantitativa de PCR (qPCR). Os genes de referência avaliados foram *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *MRPS27*, *MRPS30*, *RPL30*, *RPL4*, *RPL5*, *RPLP1* e *TOP2B*. Para a avaliação da estabilidade dos genes, o *pipeline* automatizado endoGenes foi utilizado, incluindo a análise com três algoritmos: GeNorm, BestKeeper e NormFinder, e um ranking final foi gerado. Neste estudo, os genes de referência mais adequados para a investigação do perfil de expressão gênica relacionado ao metabolismo de cálcio e fósforo em galinhas poedeiras foram o *RPL5* e *RPL30* para o rim e o *RPLP1* e *HPRT1*, para o duodeno.

Palavras-chave: estabilidade, normalizadores, qPCR.

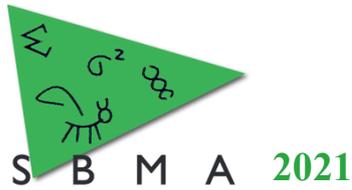
Abstract: The use of reference genes is essential to obtain accurate measurements of gene expression. Therefore, the aim of this study was to evaluate 10 candidate reference genes to determine their stability in kidney and duodenum tissues of laying hens fed with different levels of calcium and phosphorus in the diet. A total of 18 kidney and duodenal samples from 70-week-old laying hens were collected, submitted to RNA extraction and quantitative PCR (qPCR) analysis. The reference genes evaluated were *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *MRPS27*, *MRPS30*, *RPL30*, *RPL4*, *RPL5*, *RPLP1* and *TOP2B*. For the evaluation of gene stability, the automated pipeline endoGenes was used, which included the analysis with three algorithms: GeNorm, BestKeeper and NormFinder. Furthermore, a final ranking with the most stable genes was generated. In this study, the most suitable reference genes for investigating the gene expression profile in kidney and duodenum of laying hens submitted to diets with different levels of calcium and phosphorus were *RPL5* and *RPL30*, and *RPLP1* and *HPRT1*, respectively.

Keywords: stability, normalizers, qPCR.

Introdução

A análise de expressão gênica tem como objetivo elucidar os processos biológicos de organismos vivos em diferentes condições e a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é utilizada para validar os resultados de RNA-seq, sendo considerada uma ferramenta eficiente devido a sua especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade. Essa técnica é usada para amplificar e quantificar de maneira simultânea uma região específica da molécula de DNA e também para estudos de expressão gênica através de amostras de cDNA a partir de RNA (Rebouças et al., 2013).

Para a análise de qPCR é necessário padronizar as metodologias utilizadas, com a correta escolha e utilização de genes de referência, conhecidos como genes endógenos. O uso desses genes garante que as variações nos níveis de entradas de RNA entre as amostras sejam normalizadas, evitando erros na quantificação. Para que tais genes sejam utilizados como normalizadores, estes devem apresentar padrões de expressão estáveis entre diferentes condições experimentais, estados fisiológicos, tecidos ou organismos. Assim, é necessário testar a estabilidade dos genes antes de utilizá-los como referência em estudos de expressão gênica (Lorenzetti et al, 2018). Portanto, para obter genes estáveis para serem



utilizados como referência em estudos de expressão gênica relacionados ao metabolismo de cálcio e fósforo em galinhas poedeiras, objetivou-se com este trabalho avaliar dez genes candidatos endógenos nos tecidos do rim e duodeno de galinhas com 70 semanas de idade submetidas a dietas com diferentes relações de cálcio e fósforo.

Material e Métodos

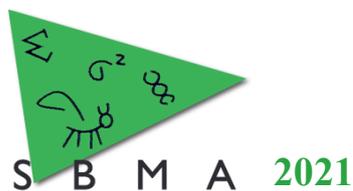
Foram utilizadas poedeiras da linhagem Bovans White submetidas a dietas com diferentes relações de cálcio:fósforo (Ca:P) a partir de 20 semanas de idade. Estas foram avaliadas até as 70 semanas de idade quanto a sua produtividade e qualidade da casca dos ovos e separadas em três grupos para a realização deste estudo: um grupo controle que recebeu a relação Ca:P normalmente utilizada (Ca 4% e 0,35% P), um grupo de alto desempenho (4.71% Ca e 0.21% P) e um de baixo desempenho produtivo (3.29% Ca e 0.49% P). Nas 70 semanas de idade foi realizado o abate e a coleta de amostras do rim e duodeno de 18 galinhas, seis de cada grupo e armazenadas em freezer (-70°C). A extração de RNA dos tecidos foi realizada de acordo com o protocolo Trizol (Invitrogen, CA, EUA), seguido pela purificação em coluna de sílica com kit Qiagen RNEasy (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha). O RNA foi quantificado em espectrofotômetro Biodrop (Biodrop, Cambridge, UK) e amostras com relação 260/280nm acima de 1,8 foram consideradas puras. O cDNA foi sintetizado a partir de 3 µg de RNA total utilizando-se o kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega, WI, EUA). A quantificação relativa de cada gene de referência foi realizada por qPCR. O padrão de expressão dos seguintes genes foi avaliado: *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *MRPS27*, *MRPS30*, *RPL30*, *RPL4*, *RPL5*, *RPLP1* e *TOP2B*. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata em 15 µL de volume final contendo 0,13 µM de cada primer e ~ 20 ng de cDNA, além da utilização de controles negativos para detectar possível contaminação. As reações foram realizadas em equipamento Quantstudio 6 (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando SYBR Green como corante fluorescente com a seguinte condição de ciclagem: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 30 segundos 60 °C. A curva *de melting* foi incluída para todos os genes estudados para verificar a especificidade dos primers. A diferença máxima permitida nos valores de Ct entre as réplicas técnicas foi de 0,4 Ct. Para avaliação de estabilidade dos genes de referência foi utilizado o *pipeline* automatizado endoGenes, disponível em <https://github.com/hanielcedraz/endoGenes>, que incluiu a análise com três algoritmos: GeNorm (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004) e BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), gerando um ranking final com os genes mais estáveis usando o RankAgreeg.

Resultados e Discussão

A concentração média de RNA total foi 1398,81 ng/µl para o rim e 1848,04 ng/µl para o duodeno. Em relação à qualidade do RNA, a relação A260/280 média foi de 1,86 ± 0,34 para as amostras de rim e 2,01 ± 0,06 para as amostras de duodeno, demonstrando uma boa qualidade das amostras de RNA a serem utilizadas em análises posteriores. Os valores médios de Ct dos genes candidatos de referência variaram de 16,62 a 22,27 nas amostras de rim e 16,43 a 23,67 nas amostras de duodeno, sendo semelhantes entre os grupos estudados e indicando que todos os genes avaliados se apresentaram expressos no rim e no duodeno.

Foram avaliados genes já recomendados como normalizadores de acordo com a literatura (Kozera & Rapacz, 2013). Em relação à estabilidade dos genes, aqueles mais bem classificados no ranking final também tiveram uma boa estabilidade em cada algoritmo separadamente (Tabela 1). Para o rim, os genes *RPL5* e *RPL30* foram os mais estáveis para o algoritmo GeNorm. Para o NormFinder, os mais estáveis foram *RPL4* e *RPL5* e para o algoritmo Bestkeeper foram o *RPL5* e *MRPS27*. Já os genes menos estáveis foram *MRPS30* e *GAPDH* para todos os algoritmos, exceto para Bestkeeper que foram *GAPDH* e *RPLP1*. Para o duodeno, os genes *RPLP1* e *TOP2B* foram os mais estáveis no algoritmo GeNorm e para o Bestkeeper foram os genes *RPLP1* e *HPRT1*. Os genes *TOP2B* e *GAPDH* foram considerados mais estáveis para o NormFinder. Já os genes menos estáveis para o duodeno foram o *RPL30* e *RPL5* em todos os algoritmos. Por meio de uma classificação geral, *RPL5* e *RPL30* foram os genes mais estáveis encontrados para os tecidos do rim e *RPLP1* e *HRPT1* para os tecidos do duodeno.

Tabela 1. Valores de estabilidade e classificação dos genes (entre parênteses) para cada tecido segundo os três algoritmos utilizados e o ranking final gerado pelo RankAgreeg.



GENE	RIM				DUODENO			
	Bestkeeper	NormFinder	geNorm	Final Ranking	Bestkeeper	NormFinder	geNorm	Final Ranking
<i>HBMS</i>	0,39 (3)	0,15 (4)	0,40 (3)	4	0,39 (3)	0,48 (8)	0,67 (7)	8
<i>RPL5</i>	0,30 (1)	0,13 (2)	0,22 (1)	1	0,98 (10)	0,67 (10)	0,91 (9)	10
<i>RPL4</i>	0,42 (5)	0,11 (1)	0,51 (5)	5	0,45 (7)	0,44 (7)	0,62 (6)	7
<i>MRPS30</i>	0,51 (8)	0,32 (9)	0,73 (9)	9	0,41 (4)	0,25 (5)	0,41 (3)	4
<i>MRPS27</i>	0,36 (2)	0,25 (7)	0,66 (7)	7	0,47 (8)	0,34 (6)	0,56 (5)	6
<i>HPRT1</i>	0,44 (7)	0,14 (3)	0,34 (2)	3	0,37 (2)	0,23 (3)	0,34 (1)	2
<i>RPLP1</i>	0,53 (9)	0,27 (8)	0,59 (6)	8	0,32 (1)	0,23 (4)	0,36 (2)	1
<i>TOP2B</i>	0,41 (4)	0,17 (6)	0,45 (4)	6	0,42 (5)	0,19 (1)	0,34 (1)	3
<i>GAPDH</i>	0,76 (10)	0,46 (10)	0,85 (10)	10	0,45 (6)	0,21 (2)	0,50 (4)	5
<i>RPL30</i>	0,42 (6)	0,16 (5)	0,22 (1)	2	0,82 (9)	0,60 (9)	0,79 (8)	9

Em galinhas, não existem estudos sobre a estabilidade de genes endógenos no rim e duodeno. Portanto, este estudo é importante para caracterizar esses tipos de amostras, principalmente porque esses tecidos estão envolvidos no metabolismo dos principais nutrientes presente nas dietas. Assim, os genes mais estáveis para cada tecido poderão ser utilizados como normalizadores para estudos de expressão gênica relacionados ao metabolismo de cálcio e fósforo em poedeiras.

Conclusão

Os genes de referência mais adequados, identificados no presente estudo, para a investigação do perfil de expressão gênica relacionado ao metabolismo de cálcio e fósforo em galinhas poedeiras foram o *RPL5* e *RPL30* para o rim e o *RPLP1* e *HPRT1* para o duodeno.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pelo projeto EMBRAPA 13.16.04.005.00.00. Os autores LAS e DEPM agradecem a CAPES e CNPq/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, respectivamente, pela concessão de bolsa. Os autores FCT e MCL agradecem ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

Literatura citada

- Andersen C. L. et al. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, 64, 5245-5250.
- Kozera, B. & Rapacz, M. 2013. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, 54, 391-406.
- Lorenzetti, W. R., Ibelli, A. M. G., Peixoto, J. D. O., Mores, M. A. Z., Savoldi, I. R., Carmo, K. B. D., Oliveira, H. C., Ledur, M. C. 2018. Identification of endogenous normalizing genes for expression studies in inguinal ring tissue for scrotal hernias in pigs. **PLoS ONE** 13 (9): e0204348.
- Pfaffl, M. W. et al. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters**, 26, 509-515.
- Rebouças, E. L., Costa, J. J. D. N., Passos, M. J., Passos, J. R. D. S., Hurk, R. V. D., & Silva, J. R. V. 2013. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 56, 143-154.
- Vandesompele, J. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3 (7), 1-12.