

Seleção do gene de referência para estudo de expressão gênica em células de cultura primária endometriais hiperandrogênicas e hiperinsulinêmicas

JULIANA CASTILHOS BEAUVALET^{1,2}, Prof. Dr. EDISON CAPP²

¹ Graduanda em Biomedicina, UFRGS

² Laboratório de Ginecologia e Obstetria Molecular (LaGOM); Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET)



UFRGS PROPSQ XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

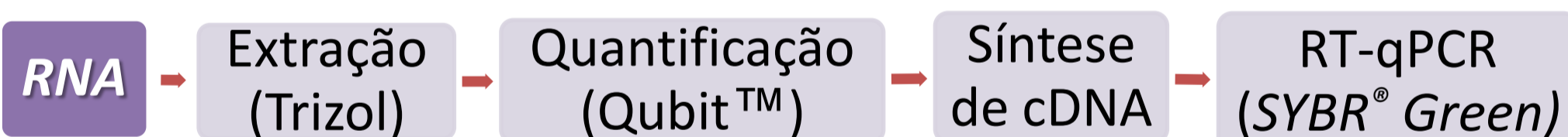
INTRODUÇÃO

A análise quantitativa de expressão gênica através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR) é um método amplamente utilizado, apesar de apresentar grande variabilidade. Essa variação está associada à técnica, podendo ser referente à qualidade da extração do RNA das amostras, à pureza do RNA total ou à eficiência da síntese de DNA complementar (cDNA) (SILVER *et al.*, 2006). Para compensar a variabilidade e garantir uma quantificação adequada, são utilizados controles internos chamados genes normalizadores, que são expressos adequadamente no tecido estudado e têm alta estabilidade de expressão mesmo sob condições (ou tratamentos) diferentes (BUSTIN, 2002).

No projeto do qual este trabalho faz parte, buscou-se verificar o efeito do tratamento com metformina sobre a expressão de IL-8 e IL-1 β em células de cultura primária endometriais hiperandrogênicas e hiperinsulinêmicas, simulando as características da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). Para ser possível quantificar a expressão gênica de IL-8 e IL-1 β , foi realizada a busca e seleção do melhor gene normalizador para o modelo de cultura primária utilizado.

METODOLOGIA

Genes candidatos a normalizadores: β -actina (*ACTB*), β -2-microglobulina (*B2M*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (*HPRT1*) e proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano, polipeptídeo zeta (*YWHAZ*).



O software NormFinder foi utilizado para selecionar o melhor gene normalizador.

RESULTADOS

Ordem	Gene	Valor de estabilidade
1	HPRT1	0,140
2	ACTB	0,148
3	B2M	0,158
4	YWHAZ	0,307
5	GAPDH	0,367

Fig. 1 – Valores de estabilidade atribuídos pelo software NormFinder aos genes candidatos a normalizador, em ordem decrescente de estabilidade. A combinação mais estável foi *HPRT1* e *ACTB*, sendo o gene *HPRT1* o mais estável dentre todos.

Na avaliação intra e intergrupos (Fig. 2), é possível verificar alguma variação na expressão de *HPRT1*, apesar de sua alta estabilidade. Isto é esperado devido a vários fatores que interferem na expressão gênica em cultura primária, ressaltando a necessidade de identificar o melhor gene normalizador.

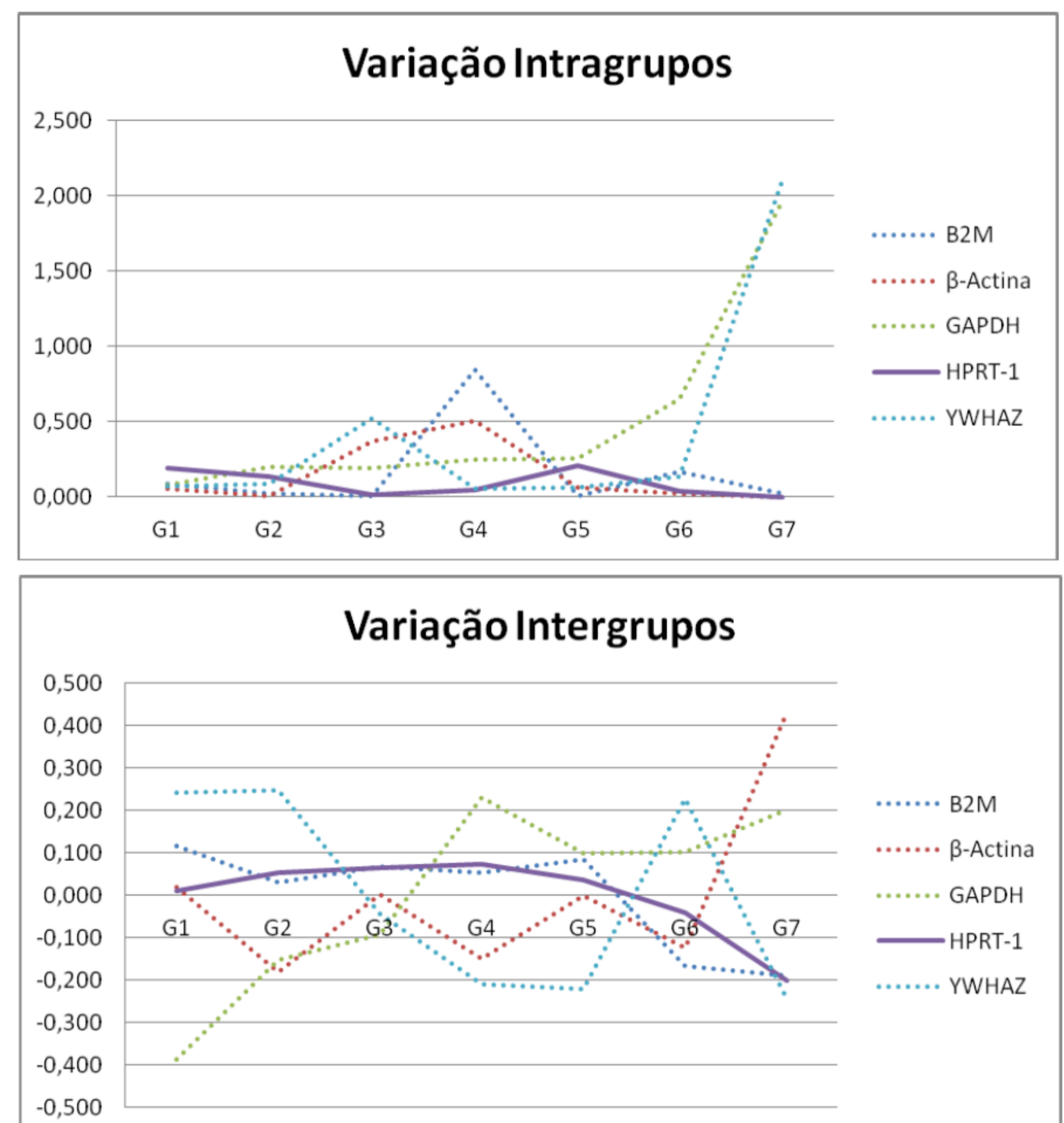


Fig. 2 – Variação intra e intergrupos da expressão dos genes candidatos a normalizadores. O gene *HPRT1* apresentou maior estabilidade em ambos os casos.

Esses dados estão de acordo com os obtidos por Kim e colaboradores (2009), que encontraram os genes *GAPDH* e *18S ribossomal RNA (18S rRNA)* como menos adequados para normalização em tecido endometrial e os genes *YWHAZ*, *cytochrome c-1 (CYC1)* e *ACTB* como mais estáveis. Sadek e colaboradores (2012) encontraram, utilizando o software *geNorm*, os genes *YWHAZ*, *CYC1* e *ACTB* como mais adequados para tecido endometrial biopsiado. As discrepâncias nos resultados podem ser resultantes das diferenças nas ferramentas utilizadas em cada estudo.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados, concluiu-se que o gene *HPRT1* é o mais indicado como normalizador da análise de expressão gênica em células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas de cultivo primário.

REFERÊNCIAS

- SILVER, N.; BEST, S. *et al.*; "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." *BMC Mol Biol* 7: 33; 2006
- BUSTIN, S. A.; "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39; 2002
- KIM, J. Y.; SONG, H. *et al.*; "Transcriptional profiling with a pathway-oriented analysis identifies dysregulated molecular phenotypes in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 94(4): 1416-1426; 2009
- SADEK, K. H.; CAGAMPANG, F. R. *et al.*; "Variation in stability of housekeeping genes in endometrium of healthy and polycystic ovarian syndrome women." *Hum Reprod* 27(1): 251-256; 2012



MODALIDADE DE BOLSA

PROBIC/FAPERGS