

PADRONIZAÇÃO DE REAÇÕES PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL DE GENES LIGADOS À DIABETES E OBESIDADE: MÓDULO *Mus musculus*

**BIANCA DE OLIVEIRA SCHUMACHER¹; IRAE MOREIRA²; DOUGLAS MESQUITA
 FIGUEIREDO²; BETÂNIA MUNIZ DA CRUZ²; ELIZABETE HELBIG³; CARLOS
 CASTILHOS BARROS³**

¹*Bolsista PBIP e graduanda – Faculdade de Nutrição – bianca.ocs@hotmail.com*

²*Graduandos – Faculdade de Nutrição - iraelmoreira@gmail.com - fdmesquita2008@hotmail.com - betaniamc@gmail.com*

³*Professores da Faculdade de Nutrição – helbignt@gmail.com - barros_cc@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

A obesidade tem aumentado em diversos países inclusive no Brasil (MOKDAD et al., 1999; MOKDAD et al., 2001; FLEGAL et al., 2002; MOKDAD et al., 2004; FLEGAL et al., 2005). Diversas comorbidades, como diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), hipertensão, dislipidemia, entre outras estão relacionadas com a obesidade e vem se tornando problemas de saúde pública (MALNICK; KNOBLER, 2006; YUSUF et al., 2005). Diante deste quadro, os estudos relacionados à obesidade e suas comorbidades se tornam cada vez mais importantes e necessários. Tanto a obesidade como suas comorbidades são condições multifatoriais envolvendo predisposição genética e influência ambiental.

O desenvolvimento de intervenções para a prevenção e tratamento destas condições requer a compreensão das alterações moleculares que ocorrem dentro de cada tecido. O estudo das alterações de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da obesidade e das comorbidades relacionadas se tornou uma importante ferramenta para a compreensão destes mecanismos moleculares. Diversas técnicas foram desenvolvidas para o estudo de expressão gênica, sendo na sua maioria onerosas, ou requerem equipamentos de alto custo.

Diante do panorama o objetivo deste estudo é padronizar as reações para estudo da expressão gênica das proteínas ligadas a obesidade, diabetes e síndrome metabólica, e com isso desenvolver um kit de arranjo de reações de PCR em tempo real (qPCR), a fim de disponibilizar estes kits para a comunidade científica.

2. METODOLOGIA

Com o auxílio de ferramentas de bioinformática foram desenhadas e definidas as melhores sequências de Oligonucleotídeos iniciadores (primers) a serem usadas para a reação de qPCR. Os primers escolhidos foram testados em condições de qPCR, usando o sistema SYBR, para isso foram usadas amostras de DNA complementar (cDNA) conhecido e proveniente do excedente de trabalhos anteriores. A qPCR foi realizada com ABI Prism 7900 sequence detection system (Applied) usando-se 100 nM de primers e 5 ng de cDNA. Com este primeiro teste analisamos se houve amplificação dos produtos esperados e se as curvas de derretimento dos produtos possuíam um único pico. Os produtos das reações foram posteriormente analisados por eletroforese em gel de agarose para conferir o tamanhos dos produtos, e eliminar reações que produzem mais de um produto na

qPCR, pois isso impede a correta análise de expressão gênica pela técnica estudada.

Os pares de primers que passaram pelos testes anteriores foram então analisados quanto sua eficiência de amplificação para a seleção dos mais adequados (eficiência de amplificação aproximadamente igual a 2). Para isso foram feitas curvas padrão com amostras conhecidas de cDNA em diferentes diluições, em triplicata, e sob condições de qPCR para o sistema SYBR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram testados 29 pares de primers para diversos genes como descrito na tabela abaixo.

Tabela 1- Genes do estudo e seus respectivos pares de primers

Nome do gene	Gene	Par de primers
ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8	ABCC8	mmuABCC8f1/r1
Angiotensin I converting enzyme	ACE	ace_fw/rv
ATP citrate lyase	ACLY	mmuACLYf1/r1
Beta-3 adrenergic receptor	ADRB3	mmuADRB3f1/r1
Beta-3 adrenergic receptor	ADRB3	mmuADRB3f2/r2
Angiotensinogen	AGT	agt_fw/rv
RAC-beta serine/threonine-protein kinase	AKT2	mmuAKT2f1/r1
Aquaporin 2	AQP2	mmuAQP2f1/r1
Chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	mmuCCL5f1/r1
Chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	mmuCCR2f1/r1
CD28 antigen	CD28	mmuCD28f1/r1
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM1	mmuCEACAM1 f1/r1
CCAAT/enhancer binding protein	CEBPA	mmuCEBPAf1/r1
Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4	CTLA4	mmuCTLA4f1/r1
Dual specificity protein phosphatase 4	DUSP4	mmuDUSP4f1/r1
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	ENPP1	mmuENPP1f1/r1
Fructose 1,6-bisphosphatase	fbp1	fbp1f/r
Forkhead box C2	FOXC2	mmuFoxC2f1/r1
Forkhead box protein G1	FOXG1	mmuFoxG1f1/r1
Forkhead box P3	FOXP3	mmuFoxP3f1/r1
Glucose-6-Phosphatase, Catalytic Subunit 1	G6PC1	G6Pasef/r
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	mmuG6PDf1/r1
Glucagon	GCG	mmuGCGf1/r1
Glucagon receptor	GCGR	mmuGCGRf1/r1
Glucokinase	Gck	Glucokinasef/r
Glucagon-like peptide 1 receptor	GLP1R	mmuGLP1Rf1/r1
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1	GPD1	mmuGPD1f1/r1
Glycogen synthase kinase 3 beta	GSK3B	mmuGSK3Bf1/r1
Heme oxygenase 1	HMOX1	mmuHMOX1f1/r1

Na primeira etapa os pares de primers foram testados em condições de qPCR e dos 29 primers, 14 apresentaram especificidade de amplificação dos genes alvo e destes apenas 1 apresentou mais de um pico na curva de derretimento dos produtos fator que o exclui, pois se torna impossível aferir se o aumento da luminescência medida no aparelho se deve ao produto relativo ao gene estudado, ou ao produto inespecífico.

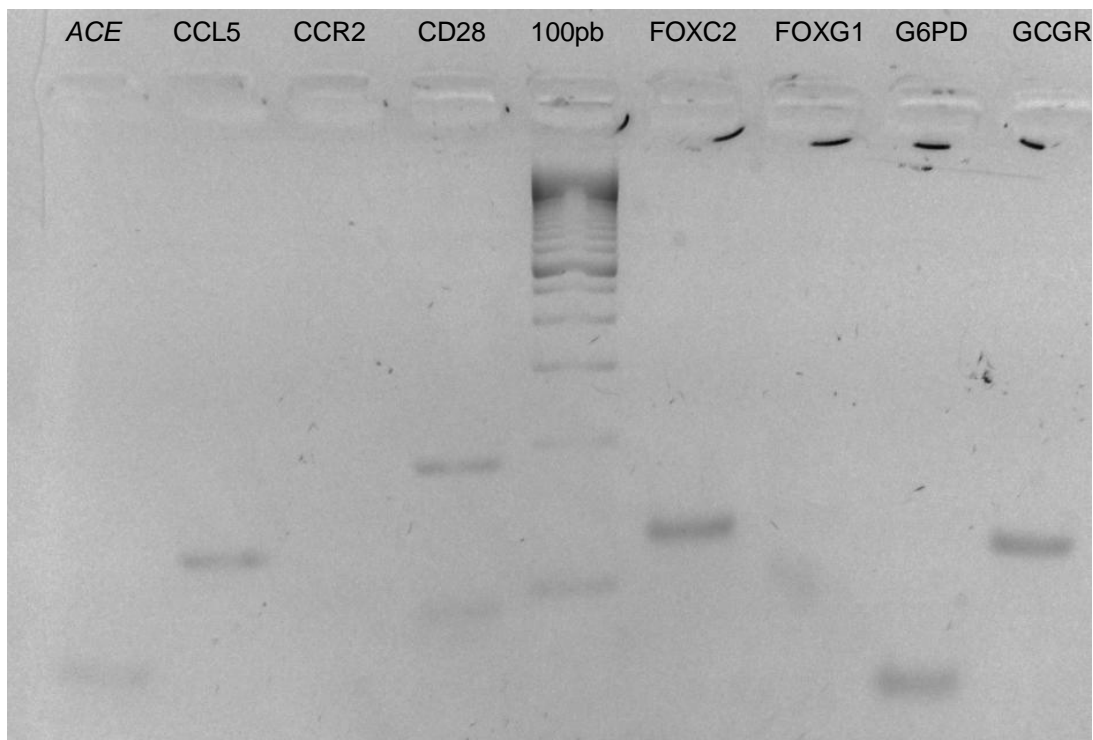


Figura 1- Análise do tamanho dos produtos das qPCRs. Imagem de eletroforese em gel de agarose 3% para estimar o tamanho dos produtos das reações. Coluna central com marcador molecular 100 pb, o qual tem padrões de bandas com tamanho múltiplo de 100 pares de bases.

Os produtos das reações dos 13 pares de primers que amplificaram produtos foram analisados em gel de agarose para verificar se o tamanho dos produtos das qPCRs eram compatíveis com o esperado.

Como representado na figura 1, os genes *ACE*, *CCL5*, *FOXC2*, *G6PD* e *GCGR* amplificaram uma banda única e compatível com a esperada, *CCR2* e *FOXG1* não apresentaram banda e o *CD28* amplificou duas bandas.

Uma segunda análise, usando amostras misturadas de cDNA de fígado e tecido adiposo, mostrou que muitos dos primers que aparentemente não funcionaram em cDNA de fígado amplificaram bandas únicas com a nova amostra. Esta diferença se deve ao fato de que diferentes tecidos expressam diferentes genes. Portanto os primers só podem ser adequadamente testados quando houver a expressão do gene relativo no tecido usado para a extração do RNA mensageiro e posterior síntese do cDNA. A partir dessa segunda análise os primers que funcionaram serão testados quanto a sua de amplificação pelo uso de análise das curvas padrões, como descrito acima, e novos primers serão desenhados para os genes que não funcionaram e para outros genes ligados à obesidade e síndrome metabólica.

4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram padronizados os primers para análise de expressão dos genes **ACE**, **CCL5**, **FOXC2**, **G6PD** e **GCGR**. Estes primers foram testados com relação a especificidade de amplificação do gene alvo, e quanto sua eficiência de amplificação. Novos genes deverão ser padronizados para que o kit proposto possa ser completo e sirva de ferramenta para estudos de expressão gênica em trabalhos que usem camundongos como modelo para se estudar obesidade e doenças relacionadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **The Journal of the American Medical Association (Jama [S.I.]**), v. 288, n. 14, p. 1723-7, Oct 9 2002.

FLEGAL, K. M. et al. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. **The Journal of the American Medical Association (Jama [S.I.]**), v. 293, n. 15, p. 1861-7, Apr 20 2005.

MALNICK, S. D.; KNOBLER, H. The medical complications of obesity. **An International Journal of Medicine (Qjm [S.I.]**), v. 99, n. 9, p. 565-79, Sep 2006.

MOKDAD, A. H. et al. The spread of the obesity epidemic in the United States, 1991-1998. **The Journal of the American Medical Association (Jama [S.I.]**), v. 282, n. 16, p. 1519-22, Oct 27 1999.

MOKDAD, A. H. et al. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. **The Journal of the American Medical Association (Jama [S.I.]**), v. 286, n. 10, p. 1195-200, Sep 12 2001.

MOKDAD, A. H. et al. Actual causes of death in the United States, 2000. **The Journal of the American Medical Association (Jama [S.I.]**), v. 291, n. 10, p. 1238-45, Mar 10 2004.

YUSUF, S. et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. **The Lancet**, v. 366, n. 9497, p. 1640-9, Nov 5 2005.