

AVALIAÇÃO DE GENES DE CONTROLE ENDÓGENO PARA PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE CITOCINAS

RENATA NOBRE DA FONSECA¹; FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE²; JOAO ALVARADO RINCÓN³; RENATA PIEROBOM GRESSLER⁴; AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

³Universidade De La Salle - joaoal13@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – repierobomgressler@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) é uma técnica com alta sensibilidade, capaz de detectar e quantificar RNAs mensageiros (mRNA) de baixa abundância (BUSTIN, 2000). Além disso, é rápida, eficiente, e possibilita a utilização de um amplo intervalo de concentrações iniciais amostras (HEID, 1996). Essas qualidades fizeram da qPCR um método muito utilizado para quantificar com precisão níveis de transcrição gênica (VANGUILDER et al. 2008). No entanto, para que os resultados obtidos tenham validade, além de outros fatores, é necessária a seleção de genes normalizadores (também chamados de genes de referência interna, genes endógenos, ou de 'housekeeping genes') adequados (HUGGET et al. 2005).

Presume-se que os genes normalizadores sejam expressos de forma constitutiva e, dessa maneira, devem apresentar expressão estável sob uma variedade de condições experimentais. Entretanto, alguns estudos sugerem que a expressão de genes normalizadores possa variar significativamente sob diferentes condições experimentais, abrindo a possibilidade de que informações errôneas possam ser geradas se a normalização de dados for baseada em genes que sofram essa variação (DHEDA et al. 2004; SCHMITTGEN & ZAKRAJSEK, 2000; TRICARICO et al. 2002). Assim, uma das maneiras de contornar os problemas associados ao uso de genes normalizadores com variabilidade é avaliar a validade dos candidatos a genes de referência nos contextos experimentais específicos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade da transcrição dos genes normalizadores eucariotos: *beta actina* (*βactina*), *Gliceraldeído- 3-fosfato desidrogenase* (*GAPDH*) e *beta-2 microglobulina* (*B2M*) em linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 quando em contato com diferentes tratamentos provenientes da bactéria *Bacillus toyonensis*.

2. METODOLOGIA

Foram analisados três genes constitutivos: *βactina*, *GAPDH* e *B2M* (Tabela 1) em macrófagos murinos RAW 264.7(ATCC® TIB-71). Inicialmente, a linhagem de células eucariotas foi cultivada em microplacas de 24 cavidades à confluência de 10⁶ células por poço. Para adsorção das células à placa, o cultivo foi incubado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por duas horas, suplementado com Meio Essencial Mínimo (MEM) e 10% de soro fetal bovino (SFB)

Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e os tratamentos (células vegetativas, esporos vivos e inativados, DNA e sobrenadante da cultura de *Bacillus toyonensis*) foram adicionados. Como controle positivo foi utilizado o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia Coli* O111:B4 (SIGMA) na concentração de 1 µg/mL e como controle negativo foi utilizado apenas MEM. Todos os tratamentos foram incubados com as células por 1, 8 e 24 horas e avaliados em triplicata.

Após 1, 8 e 24 horas as células foram coletadas com TRI Reagent® (SIGMA) e armazenadas a -80°C até o processamento. O RNA total foi extraído conforme recomendações do fabricante, utilizando clorofórmio (CHCl₃), isopropanol ((CH₃)₂CHOH) e etanol (C₂H₆O) 75%. O RNA extraído foi ressuscitado em 40 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNase (SIGMA). A quantificação da pureza e do material genético foi realizada em espectrofotômetro (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) através da mensuração da OD₂₆₀ e OD_{260/280}, respectivamente. Foram utilizadas amostras com quantificação igual ou superior a 50ng/µL, assim como com relação OD_{260/280} entre 1.8 e 2.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO RAD), seguindo recomendações do fabricante. O cDNA sintetizado foi padronizado em 500ng para o volume final de 20 µL de reação. As amostras foram estocadas à -20 °C até o uso.

A qPCR foi realizado em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) utilizando 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,25 µL *primer forward* (PF), 0,25 µL *primer reverse* (PR) (10 µM/µL), 2,4 µL de água ultrapura livre de DNAase e RNase (SIGMA), 0,1 µL de CxR Reference Dye e 2 µL de amostra. As condições de termociclagem para os três genes avaliados foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg e anelamento e extensão a 60°C por 1min. A curva de dissociação foi realizada a 95°C por 15 seg, 55°C por 1 min e 95°C por 15 seg. Para análise da expressão gênica foi utilizado o método Delta-Delta Ct (ΔΔCt) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A fim de verificar o desempenho dos genes, foi utilizado o *software* geNorm conforme descrito por VANDESOMPELE et al. (2002).

Os genes constitutivos também foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey, para comparações múltiplas do tipo todos contra todos. Toda a análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados

Gene	Sequência (5'-3')	Referência
ACTB	F - AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	Määttä et al. (2018)
	R - CAATAGTGATGACCTGGCCGT	
B2M	F - CTGCTACGTAACACAGTTCCACCC	Stephens et al. (2011)
	R - CATGATGCTTGATCACATGTCTCG	
GAPDH	F - AACGACCCCTTCATTGAC	Sun et al. (2016)
	R - TCCACGACATACTCAGCAC	

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de variância e do teste de Tukey empregado para verificar se os tratamentos haviam interferido na expressão dos genes endógenos demonstraram que alguns estímulos interferiram na expressão basal desses genes ($p < 0,05$), corroborando resultados obtidos também pelo *software* geNorm.

Verificou-se que nos três tempos avaliados (1, 8 e 24 horas) os genes *βactina* e *GAPDH* demonstraram-se estáveis e, conseqüentemente, mais confiáveis para serem utilizados nos cálculos de expressão relativa utilizando a metodologia descrita por SCHMITTGEN & LIVAK (2008). Em contrapartida a expressão do gene *B2M* foi influenciada de forma significativa pelos estímulos utilizados.

A *βactina* é uma das seis isoformas existentes da actina, sendo uma das duas formas não musculares e presentes no citoesqueleto (GUNNING et al., 2015). O *GAPDH* é uma enzima chave no processo de glicólise, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído 3-fosfato (G3P) em 1,3 – bifosfoglicerato (TISDALE, 2002; ERCOLANI et al., 1998). Além disso, essa enzima também desempenha um papel na imunidade inata, promovendo a ativação do fator de transcrição *NFκB* induzida por *TNFα* e a produção de interferon tipo I, por meio da interação com os fatores 2 e 3 associados ao receptor de TNF (TRAF2 e TRAF3), respectivamente (GAO et al., 2013, 2016). A *B2M* é um dos componentes do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I), que está presente em todas as células nucleadas (GUSSOW et al., 1987).

No estudo publicado por STEPHENS et al. (2011) foi demonstrado que o gene *B2M*, em conjunto com os genes *HMBS* (hidroximetilbilano sintase) e *βactina*, foram os mais estáveis para utilização como normalizadores na técnica de PCR em tempo real em osteoblastos, osteoclastos e macrófagos murinos. Entretanto, é importante ressaltar que nesse estudo a expressão desses genes não foi avaliada em resposta a estímulos externos. TANAKA et al. (2017) avaliaram genes de referência seguros para a normalização da expressão gênica relativa em macrófagos murinos derivados da medula óssea (BMDM, do inglês *bone marrow derived macrophages*) e também na linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7, após estímulo com LPS por 6 e 24 horas. Nesse estudo foi identificado que o *B2M* apresentou variações significativas de expressão durante o estímulo com LPS e com os tratamentos, indicando que essa exposição pode alterar a expressão desse gene. O fato de a *B2M* ser um dos componentes estruturais do MHC I pode explicar o porquê desse gene, entre os três endógenos testados, ter sido o mais influenciado pelos estímulos utilizados.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo sugere que, para estudos que têm como objetivo avaliar a transcrição de genes para citocinas em macrófagos murinos RAW 264.7, a utilização do *B2M* como gene endógeno normalizador não é recomendada, visto que esse gene pode sofrer alterações frente aos diferentes estímulos. A transcrição dos genes endógenos *Bactina* e *GAPDH* também sofreram alterações frente a diferentes tratamentos, entretanto não foram significativas quando comparadas ao *B2M*. Para futuros estudos sugere-se, então, a utilização de *Bactina* e *GAPDH* e a investigação de genes endógenos como *RPL13A* (proteína ribossomal L13A), *PPIA* (peptidilprolina isomerase A) e *GUSB* (B-glucoronidase).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSTIN, Stephen A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of molecular endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

- DHEDA, Keertan et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, v. 37, n. 1, p. 112-119, 2004.
- ERCOLANI, L. et al. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 30, p. 15335-15341, 1988.
- GAO, Xiaofei et al. Citrobacter rodentium NleB protein inhibits tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3 (TRAF3) ubiquitination to reduce host type I interferon production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 35, p. 18232-18238, 2016.
- GAO, Xiaofei et al. NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- κ B activation. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 1, p. 87-99, 2013.
- GUNNING, Peter W. et al. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. **Journal of cell science**, v. 128, n. 11, p. 2009-2019, 2015.
- HEID, Christian A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- GÜSSOW, Detlef et al. The human beta 2-microglobulin gene. Primary structure and definition of the transcriptional unit. **The journal of immunology**, v. 139, n. 9, p. 3132-3138, 1987.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.
- SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.
- SCHMITTGEN, Thomas D.; ZAKRAJSEK, Brian A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 46, n. 1-2, p. 69-81, 2000.
- TANAKA, Akane et al. Selection of reliable reference genes for the normalisation of gene expression levels following time course LPS stimulation of murine bone marrow derived macrophages. **BMC immunology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2017.
- TISDALE, Ellen J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase C α and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3334-3341, 2002.
- TRICARICO, Carmela et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. **Analytical biochemistry**, v. 309, n. 2, p. 293-300, 2002.
- STEPHENS, Alexandre S.; STEPHENS, Sebastien R.; MORRISON, Nigel A. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2011.
- VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.
- VANGUILDER, Heather D.; VRANA, Kent E.; FREEMAN, Willard M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.