29455

SELEÇÃO DE GENE DE REFERÊNCIA PARA TECIDO NORMAL DE TIREOIDE E BÓCIO

Raquel Weber, Ana Paula Santin, Laura Walter Bessestil, Beatriz Maria de Azevedo Assis Brasil, Ilma Simoni Brum, Tania Weber Furlanetto

Introdução: A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR) é uma técnica amplamente utilizada em estudos de expressão gênica, devido a sua alta sensibilidade. A fim de realizar uma acurada comparação dos níveis de mRNA em amostras biológicas, a escolha de um gene de referência para normalizar os dados obtidos pela qRT-PCR é um ponto crucial na análise dos resultados, uma vez que permite minimizar o efeito das variações experimentais inerentes ao método. Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar seis candidatos a gene de referência para estudos de expressão gênica em tecido normal de tireoide e em bócio. Metodologia: Realizou-se um estudo experimental com a análise de 16 amostras de tecido normal de tireoide e 19 amostras de bócio obtidas de pacientes submetidos à tireoidectomia total ou parcial. O RNA total das amostras foi extraído utilizando o reagente Trizol® . A concentração e a pureza do RNA total foram avaliadas pela medida da absorbância por espectrofotometria (NanoDrop 1000) em 230, 260 e 280nm. A síntese do cDNA foi feita a partir de 1 ug RNA total utilizando oligonucleotídeo complementar a cauda poli-A e o kit Superscript II Reverse Transcriptase®. Os genes avaliados foram: β-actina, Complexo succinato desidrogenase subunidade A flavoproteína (SDHA), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Proteína de ativação tirosina 3-monooxigenase 5-triptofano polipeptídeo zeta (YWHAZ), hipoxantina fosforibosiltransferase I (HPRT1) e beta-2-microglobulina (B2M). A qRT-PCR foi realizada utilizando o kit Platinum®SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG. A estabilidade dos candidatos a gene normalizador foi analisada pelo programa NormFinder e pelo cálculo do MFC. Resultados: Os valores de estabilidade obtidos pelo NormFinder foram os seguintes: β-actina=0,046, GAPDH=0,069, HPRT1=0,197, YWHAZ=0,284, SDHA=0,349 e B2M= 0,533. Já, pela análise do MFC, foram encontrados os seguintes resultados: β-actina=1,36, GAPDH=1,43, HPRT1=1,46, YWHAZ=1,46, SDHA=1,37 e B2M= 2,25. Conclusão: O gene β-actina foi o mais estável tanto pelo programa NormFinder, quanto pelo cálculo do MFC. Desse modo, este gene pode ser utilizado como referência para estudos de expressão gênica em tecido normal de tireoide e em bócio, pela técnica de qRT-PCR. CEP/HCPA (GPPG:120272).