

ANÁLISE ENTRE OS CONTROLES INTERNOS NO qRT-PCR EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS

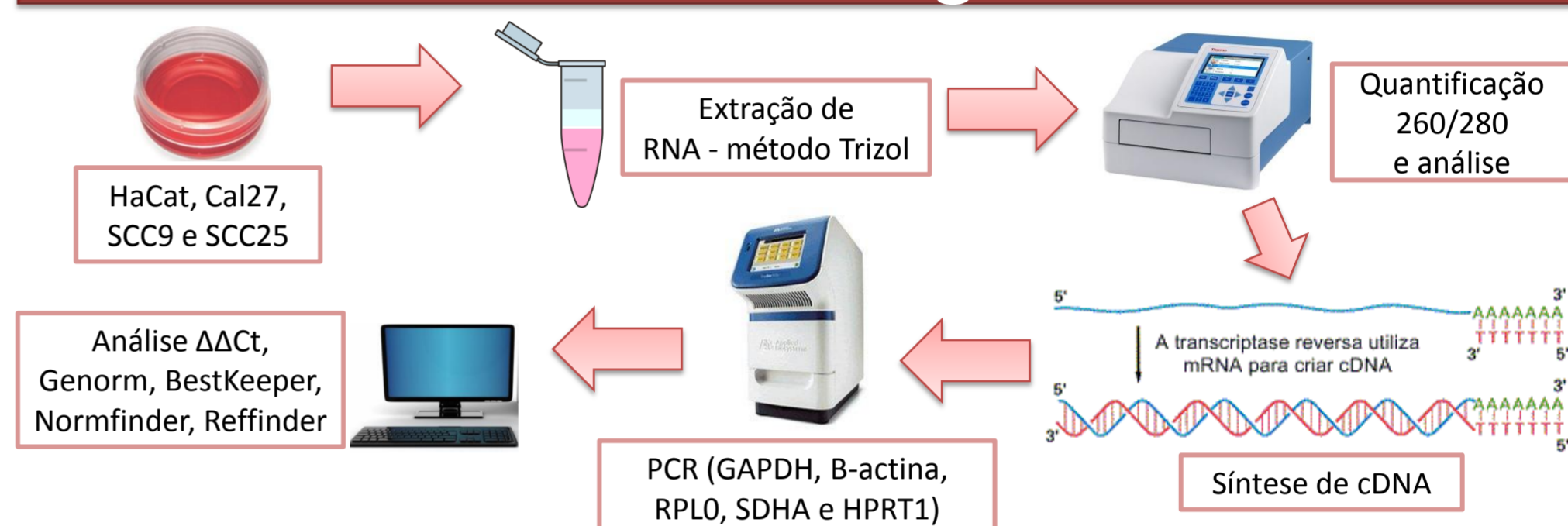
Gabrielle Pedroni* (1), Marcelo Lazzaron Lamers (1,2,).

1 Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2 Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. gabriellecaxiense@hotmail.com, marcelo.lamers@ufrgs.br

Introdução e objetivo

O ensaio de qRT-PCR é uma técnica amplamente utilizada para estudos de biologia molecular. A partir deste ensaio é possível quantificar o RNA mensageiro (RNAm) extraído a partir de células ou tecidos. Para normalização utilizam-se genes que as células expressam constitutivamente, que tem a função de controles internos para normalizar a expressão de genes alvo. No entanto, não é adequado o uso dos mesmos genes endógenos para normalização em todos os tipos celulares. **Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a estabilidade de diferentes genes endógenos como controles internos entre linhagens celulares humanas de origens distintas.**

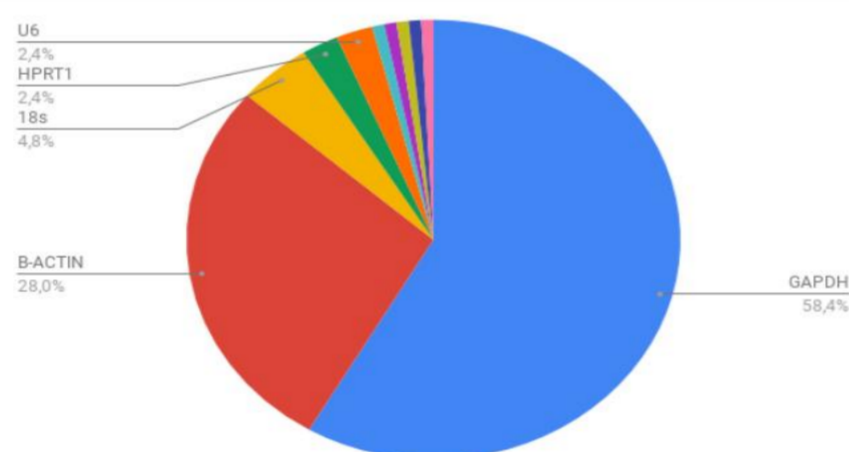
Metodologia



Resultados

1. Controles endógenos utilizados nas linhagens HACAT, Cal27, SCC9 e SCC25 em estudos nos últimos 5 anos

Fig. 1. Utilização de diferentes genes de controles endógenos para normalização da expressão do gene alvo. Estudos analisados demonstram que o gene de controle endógeno GAPDH é o mais utilizado nas linhagens de HACAT, Cal27, SCC9 e SCC25.



2. Valores absolutos de Ct nas linhagens celulares demonstram variabilidade entre os genes endógenos

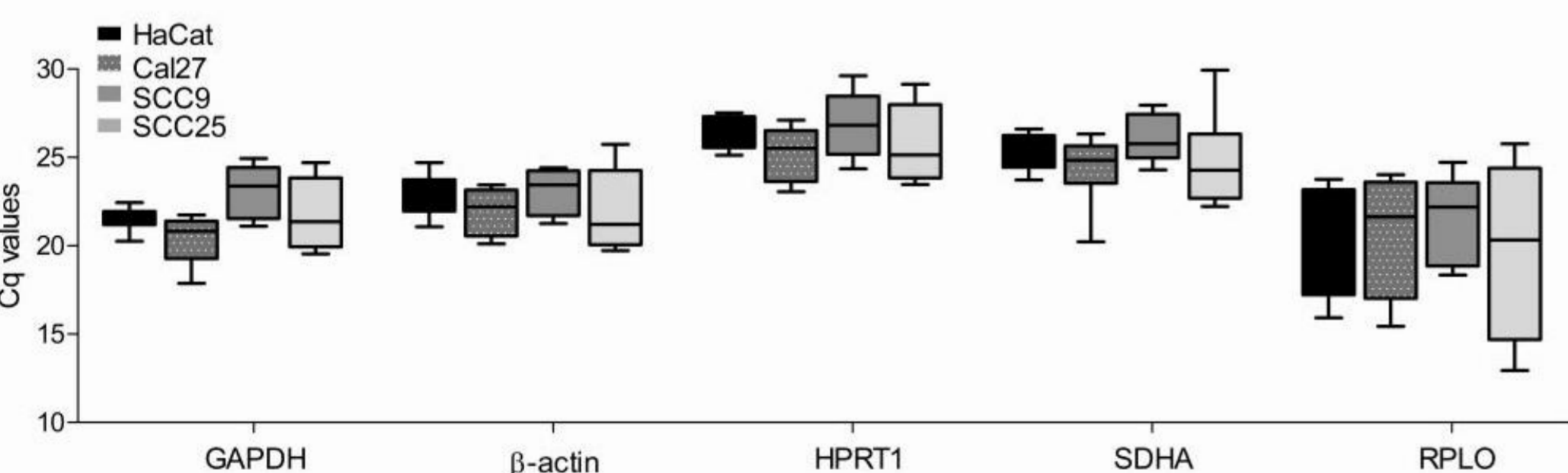


Fig. 2. Variabilidade dos CTs dos genes endógenos GAPDH, B-act, HPRT1, SDHA e RPL0 nas amostras de Hacat, Cal27, SCC9 e SCC25. O gene endógeno RPL0 foi o que demonstrou maior amplitude de variação.

3. Estabilidade dos genes endógenos analisados por diferentes métodos

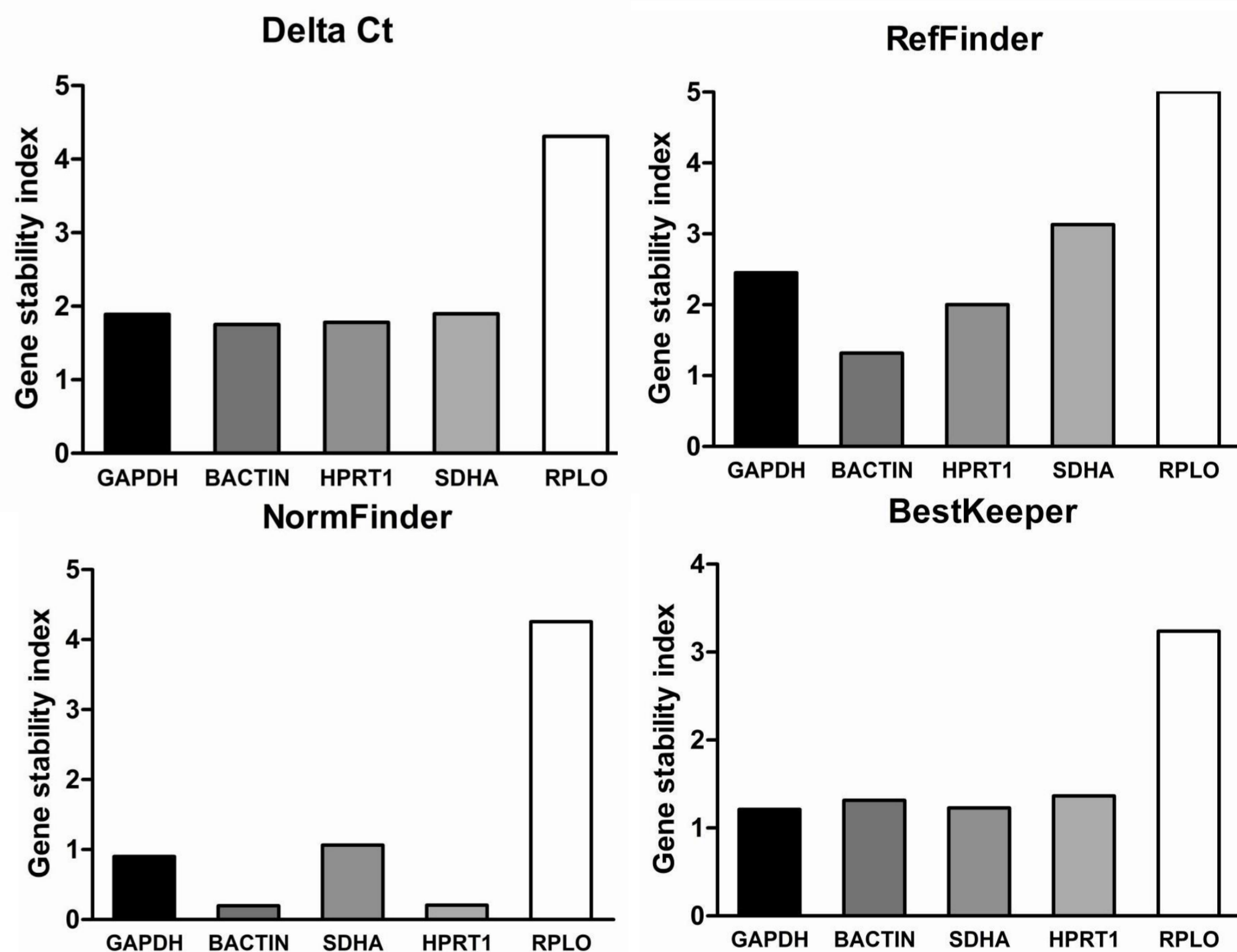


Fig. 3. Diferentes softwares para avaliação da estabilidade de genes endógenos. Menores valores indicam genes com maior estabilidade. Observa-se que houve diferença entre a indicação de gene com maior estabilidade de acordo com o método utilizado pelo software.

4. Análise pelo GeNorm mostra que são necessários, no mínimo, 2 controles endógenos

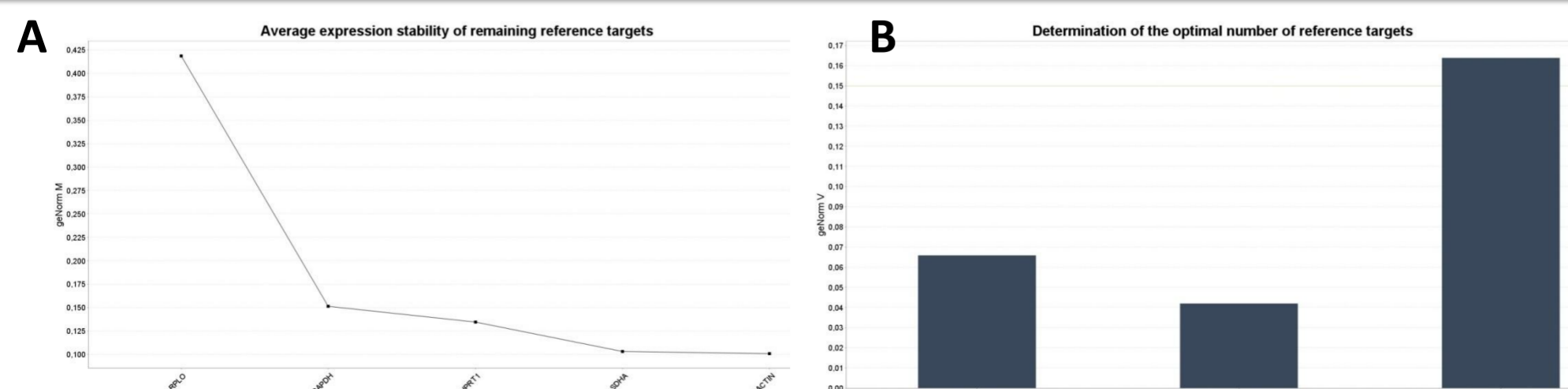


Fig. 4. A- Análise por GeNorm demonstra que B-actina foi o gene endógeno mais estável. B- Quando compara-se o número ótimo dos genes endógenos em um experimento, foi demonstrado que são necessários, no mínimo, 2 genes endógenos para as linhagens estudadas.

Conclusão

Analisando o uso de diferentes genes para controle endógeno no ensaio de RT-PCR com diferentes linhagens celulares, observa-se a importância de testar diferentes opções para satisfazer critérios de métrica deste ensaio. Além disso, nota-se que, idealmente, são necessários 2 genes para uso de controle endógeno quando comparamos as diferentes linhagens celulares estudadas.

Apoio financeiro