

# Seleção de genes candidatos a referência para estudos de expressão gênica por meio de análises de RNA-Seq e qPCR

*Kamila de Oliveira da Rosa*<sup>1</sup>  
*Polyana Cristine Tizioto*<sup>2</sup>  
*Luiz Lehmann Coutinho*<sup>3</sup>  
*Gerson Barreto Mourão*<sup>3</sup>  
*Luciana Correia de Almeida Regitano*<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aluna de Mestrado em Genética e Melhoramento Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP;

<sup>2</sup>Pós doutoranda, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP;

<sup>3</sup>Professor do departamento de Zootecnia da Esalq-USP, Piracicaba, SP;

<sup>4</sup>Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

A metodologia de PCR em tempo real é comumente aplicada para realização de ensaios de expressão gênica que objetivam quantificar os níveis de RNA mensageiro (mRNA) presentes em um determinado estágio do desenvolvimento, tecido e/ou condição fisiológica de um organismo. A utilização de genes de referência é recomendada para normalização de dados de PCR quantitativo (qPCR), visando minimizar as possíveis diferenças decorrentes de variações técnicas. O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é uma abordagem que foi desenvolvida para analisar a variação decorrente da regulação transcricional, bem como pós-transcricional de todos os genes expressos nas amostras avaliadas. Objetivou-se com este trabalho verificar a possibilidade de escolha de genes de referência para estudos de qPCR utilizando dados de RNA-Seq. Para tal, inicialmente foram utilizados os valores de expressão ajustados obtidos pelo programa Cuffdiff, expressos em “fragmentos por quilobase de exon por milhões de fragmentos mapeados” (FPKM), calculados a partir dos dados de RNA-Seq de tecido hepático de animais da raça Nelore. Estes valores foram utilizados para verificar quais os genes que apresentaram expressão uniforme entre 20 animais conhecidos por serem geneticamente divergentes para consumo alimentar residual. Ensaios de qPCR foram realizados posteriormente, para obtenção de valores expressos em “cycle threshold” (Ct) e comparação da estabilidade dos genes de referências apontados primariamente pelos dados de RNA-Seq. Os ensaios de qPCR foram realizados utilizando amostras de fígado de quatro animais Nelore para avaliação dos seguintes genes: RPS9, RPL19, YWHAZ e HPRT1. As contagens de reads corrigidas (valores FPKM) para estes genes reportadas pelo Cuffdiff para os grupos fenotípicos eficiente (Ef) e ineficiente (In) foram: RPS9 Ef: 392,346 In: 443,802; RPL19 Ef: 196,034 In: 217,634; YWHAZ Ef: 12,2557 In: 12,2376 e HPRT1 Ef: 56,4342 In: 56,5175. Os genes YWHAZ e HPRT1 apresentaram valores de expressão semelhantes nas condições avaliadas, atendendo um pré-requisito essencial de um gene de referência adequado. Os valores de Ct dos quatro genes obtidos pelos ensaios de qPCR foram fornecidos para o programa RefFinder que utiliza diversos programas para indicação do melhor gene de referência. Nesta análise, os genes YWHAZ e HPRT1 foram novamente selecionados como os melhores genes de referências pelo Genorm. Portanto, é possível inferir que a utilização de dados de expressão de RNA-Seq para selecionar genes referência para ensaios de qPCR parece ser uma estratégia viável que deve auxiliar experimentos de perfilamento de RNA por sequenciamento visando a validação posterior por ensaios de qPCR.

**Palavras-chave:** Gene referência, PCR em tempo real, transcriptoma

**Apoio financeiro:** Capes.

**Área:** Genética Animal/ Melhoramento Animal