

Júlia Schneider^{1,2}, Amanda de Barros Machado^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{2,3},

Diego Duarte Alcoba^{1,2}, Ilma Simoni Brum^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

² Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

³ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Introdução

Atualmente, as estratégias de avaliação e de seleção de oócitos destinados à maturação *in vitro* (MIV) dependem principalmente da morfologia do complexo *cumulus*-oócito (CCO). Porém, este método possui precisão menor do que a desejada, visto que oócitos não competentes muitas vezes são selecionados. Portanto, técnicas *in vitro* não invasivas de avaliação da qualidade do oócito para maturação e posterior fertilização *in vitro* (FIV) estão em desenvolvimento. Dentre estas, destaca-se a seleção de oócitos através da utilização do corante de vitalidade Azul Cresil Brilhante (BCB). Em várias espécies animais a utilização do BCB já está consolidada; no entanto, os efeitos causados por este corante em embriões humanos provenientes de oócitos submetidos a esta técnica ainda não foram elucidados. Visto que a utilização de oócitos humanos para pesquisa é bastante restrita e que as células murais da granulosa (GC) e do *cumulus oophorus* (CC) apresentam íntima relação com o oócito na formação do folículo ovariano, a utilização do BCB nestas células permite elucidar, de forma indireta, o possível efeito do BCB sobre oócitos humanos. A análise da expressão gênica de genes alvo que possam ter sido alterados após utilização do BCB é uma importante metodologia para identificar presença ou ausência de efeitos causados por este corante nos oócitos. Para que os resultados do perfil de expressão gênica sejam confiáveis é necessária a utilização de uma estratégia de normalização. O uso de genes normalizadores é tido como padrão-áureo para a normalização de resultados de experimentos de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR) até o momento; porém, uma vez que não há um gene de referência universal, este deve ser determinado conforme o tipo de amostra utilizado.

Objetivo

Avaliar e validar, dentre cinco candidatos, os genes normalizadores mais adequados para estudos de expressão gênica com cultura primária de GC e CC, utilizando-se da técnica de RT-qPCR.

Materiais e Métodos

Estudo experimental *in vitro* no qual GCs e CCs foram coletadas de 6 pacientes submetidas a tratamento de infertilidade após estimulação ovariana, independente deste estudo. O RNA das células da granulosa e das células do cumulus (tratadas e não tratadas com BCB) foi extraído e, então, o cDNA foi sintetizado. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa foi realizada utilizando-se *primers* para cinco genes candidatos a normalizadores (GAPDH, ACTB, YWHAZ, HPRT1 e B2M). A estabilidade dos genes foi analisada pelo *software NormFinder*. (Projeto aprovado pelo CEP HCPA: 120367).

Resultados

O *software* utilizado indicou o gene ACTB como sendo, dentre os analisados, aquele com menor valor de estabilidade, ou seja, o mais estável (valor de estabilidade mais próximo de zero) no grupo celular GC. Este gene apresentou a menor variação de expressão quando da análise dos grupos controle e tratado juntamente, revelando um valor de estabilidade de 0,192. Com relação ao grupo celular CC, o gene indicado pelo *software* foi HPRT-1, sendo que este apresentou um valor de estabilidade de 0,140. As figuras 1 e 2 abaixo ilustram estes resultados.

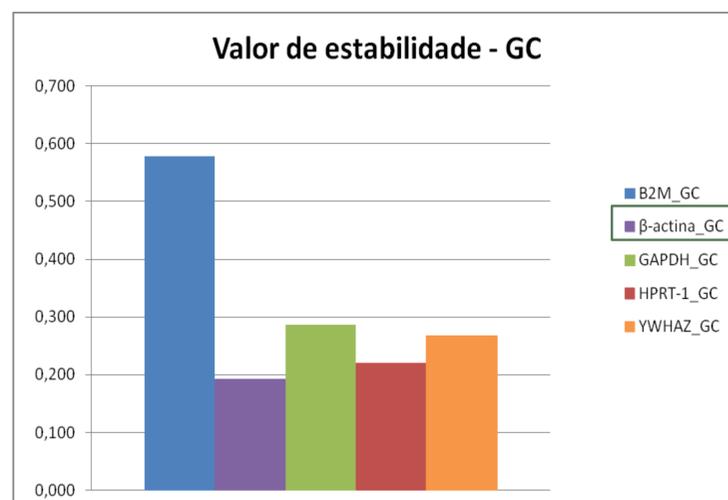


Figura 1 – Gráfico com a variação dos valores de estabilidade para os genes analisados nas células murais da granulosa pelo *software NormFinder*, mostrando o gene β-actina como sendo o que apresentou menor valor de estabilidade.

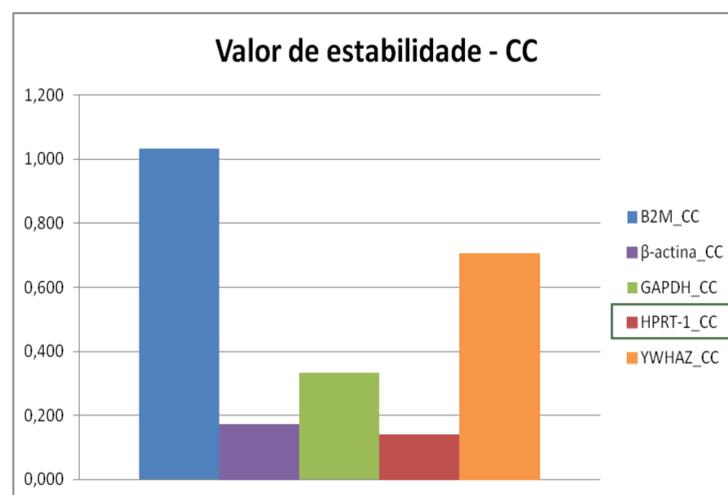


Figura 2 – Gráfico com a variação dos valores de estabilidade para os genes analisados nas células do *cumulus oophorus* pelo *software NormFinder*, mostrando o gene HPRT-1 como sendo o que apresentou menor valor de estabilidade.

Conclusão

Este trabalho apresenta ACTB e HPRT-1 como sendo os mais adequados genes normalizadores, dentre os analisados, para estudos de expressão gênica em cultura primária de células murais da granulosa e do *cumulus oophorus*, respectivamente.