

Perfil de expressão de microRNA em pacientes com autismo clássico: um estudo caso-controle

Julia M. Sorrentino^{1,3}, Tamara Vaccaro^{1,2,3}, Cláudia M.B. Andrade⁴, Sócrates Salvador^{3,5}, Rudimar dos Santos Riesgo^{3,5}, Rogério Margis^{2,4}, Carmem Gottfried^{1,2,3}

¹Grupo de Pesquisa em Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica – UFRGS;

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, ICBS – UFRGS;

³Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (ProTID/HCPA);

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia – UFRGS;

⁵Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina – UFRGS

Introdução

O autismo clássico, juntamente com os outros transtornos do espectro, é um dos distúrbios mais comuns do desenvolvimento infantil. Apesar da grande variabilidade no quadro clínico, os transtornos do espectro autista comprometem o desenvolvimento humano através de três manifestações principais: alterações qualitativas na interação social, nas habilidades de comunicação e presença de comportamentos e interesses estereotipados e repetitivos. Apesar de diversas evidências de alterações neurológicas, genéticas e imunológicas, não existe ainda um marcador biológico definido. Entretanto, alterações epigenéticas possivelmente estão envolvidas e possibilitam, por exemplo, detectar padrões diferenciais de expressão de microRNA. Os microRNA são seqüências de aproximadamente 22 nucleotídeos de RNA (ácido ribonucléico) não-codificante que regulam a expressão de outros genes provavelmente através do emparelhamento base-específico com RNA mensageiro (mRNA) alvo, conforme mostra a figura 1. Padrões diferenciais de expressão de microRNA tem sido correlacionados com um grande número de patologias de natureza multifatorial, portanto a identificação da patologia em nível molecular pode ser utilizada como base para o desenvolvimento de exames diagnósticos e tratamentos mais específicos.

Relevância da análise de microRNA

A expressão de microRNA pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de exames diagnósticos e tratamentos mais específicos para o autismo.

Objetivo

Este estudo tem como objetivo avaliar o padrão de expressão de 26 microRNA de células leucocitárias de pacientes com autismo clássico.

Metodologia

Estudo caso-controle: comparação da expressão de 26 microRNA de 8 pacientes com autismo clássico do gênero masculino com idade entre 5 e 10 anos frente ao perfil de expressão de 8 indivíduos típicos.

Após punção periférica e obtenção da amostra, o sangue com anticoagulante foi misturado com o reagente Trizol e as amostras estocadas em freezer -80°C para posterior extração de RNA total. A síntese de cDNA foi realizada com a utilização de primer multiplex com oligonucleotídeos miRLoop específicos para o conjunto de 26 microRNA. As análises da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas através do sistema SYBR Green®, utilizando um oligonucleotídeo que é microRNA específico e um oligonucleotídeo complementar a seqüência universal presente no oligonucleotídeo utilizado para a síntese dos cDNA.

As reações foram feitas no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System da Applied Biosystems e analisadas pelo StepOne™ Software v2.0; a análise estatística aplicada foi o Teste T independente com $p < 0,05$.

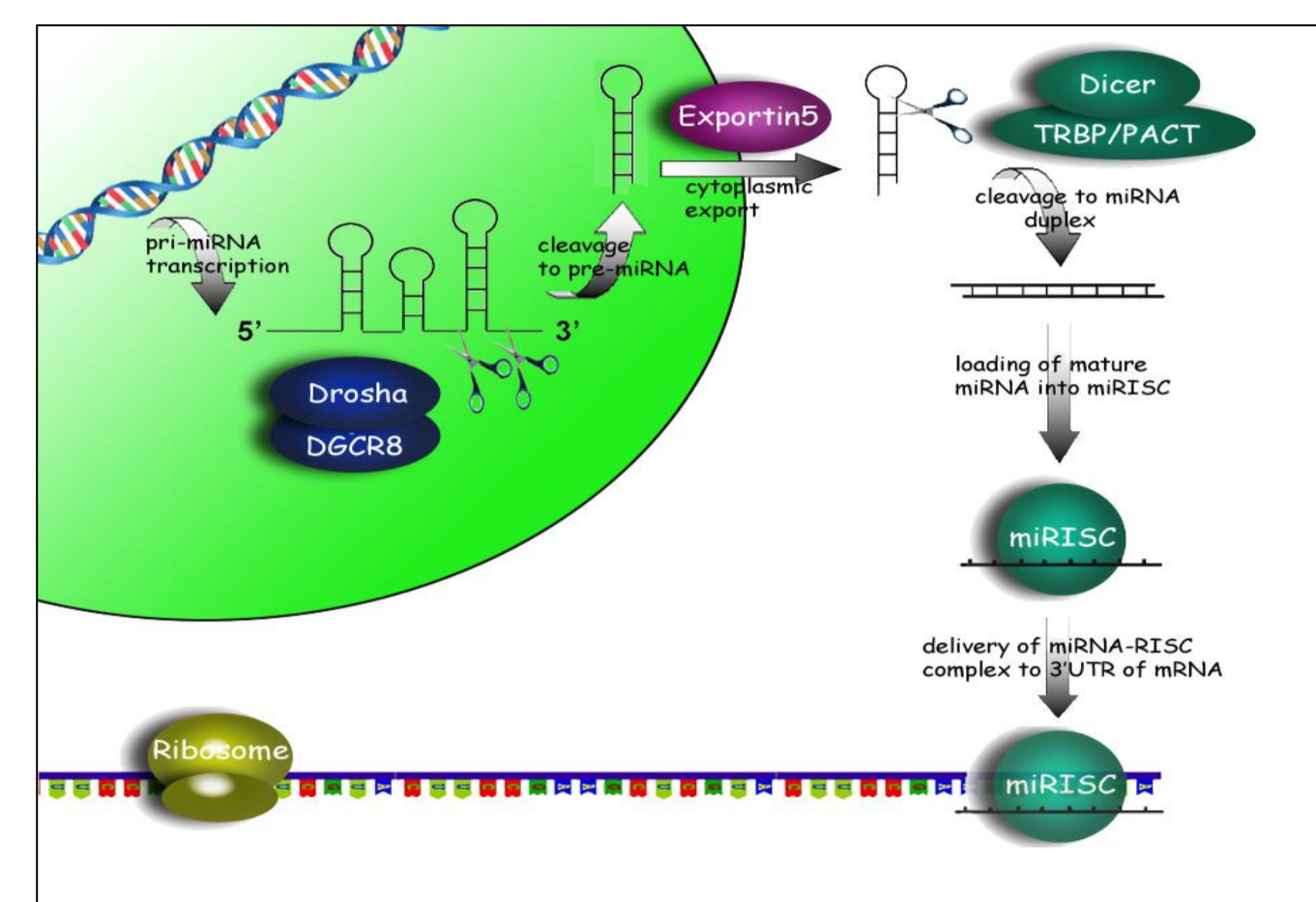


Figura 1: Processamento de microRNA. (<http://www.micrnaworld.com> acesso em 11/10/2010).

Resultados e Discussão

A Figura 2 apresenta a curva de amplificação representativa da análise e a curva de Melting dos 26 microRNA de uma amostra.

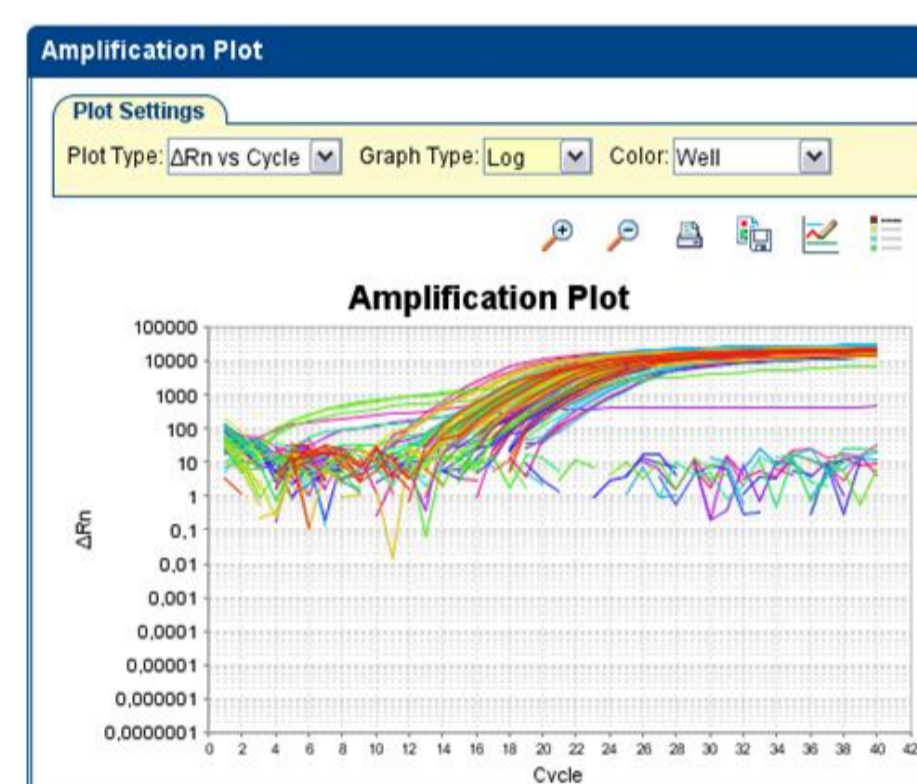


Figura 2(A): Exemplo de Curva de Amplificação

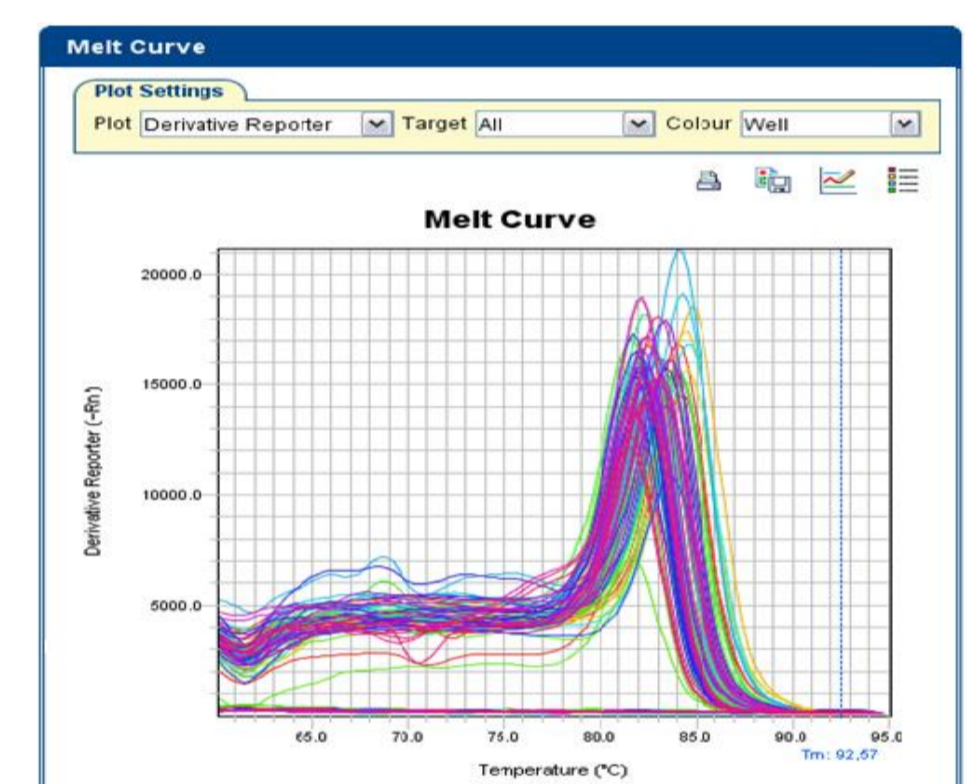


Figura 2(B): Exemplo de Curva de Melting (dissociação específica do produto de amplificação)

Após a análise das 16 amostras (8 pacientes autistas e oito controles) foi aplicado o software GeNorm®, que revelou 4 microRNA normalizadores da reação. Esses normalizadores têm expressão uniforme entre as amostras e são usados como “genes de referência”. Portanto, dos 26 microRNA analisados, a expressão de 22 foi calculada a partir dos 4 normalizadores.

Com a análise estatística, verificou-se que 6 microRNA têm expressão aumentada nos pacientes autistas em relação ao grupo controle, com $p < 0,05$, conforme mostra a tabela 1:

Padrão de microRNA alterado em relação ao grupo controle

Cnt x Aut	Valor p
miR_A	0,006
miR_B	0,001
miR_C	0,042
miR_D	0,024
miR_E	0,010
miR_F	0,007

Tabela 1: Os nomes reais dos microRNA foram alterados para letras (A-F), pelo fato de que os resultados ainda não foram publicados. Valor de p indica diferença do grupo controle.

Conclusão

Esses resultados são relevantes e promissores na busca de marcadores biológicos para o auxílio do diagnóstico precoce de autismo. Novos estudos serão necessários para ampliar o número amostral e avaliar novas moléculas de microRNA e respectivos alvos de mRNA.