

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CÉLULAS PULMONARES TIPO II UTILIZANDO A TÉCNICA DE MICROARRANJO

JESSICA RODRIGUES PLAÇA¹; MARK R. SEGAL²; MARCUS REDU
ESLABÃO³; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN²

¹Laboratório de Bioinformática, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – jessicaplaca@gmail.com

²Department of Epidemiology & Biostatistics, University of California- San Francisco

³Laboratório de Bioinformática, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – marcus.eslabao@yahoo.com.br

⁴Laboratório de Bioinformática, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – odir@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O conjunto de genes expressos ou transcritos é por vezes referido como o perfil de expressão, ou transcriptoma (ROYCE, 2005). Para a compreensão das funções gênicas, saber quando, onde e em que medida um gene é expresso é o ponto central para investigar o papel da proteína codificada e atividade biológica. Este conhecimento pode aumentar a compreensão básica das causas e as consequências de doenças, assim como indicar produtos de genes que podem ter uma utilização terapêutica. Além disso, mudanças nos padrões multigênicos de expressão pode fornecer pistas sobre os mecanismos de regulação e funções bioativas mais amplas, auxiliando na identificação de indicadores moleculares (NAPOLI, 2003).

A tecnologia de Microarranjo, incluindo microarranjos de cDNA e de oligonucleotídeo, tem o potencial de avaliar simultaneamente milhares de genes expressos em uma amostra biológica, tais como células de cultura ou tecidos dissecados (HE, 2006). A análise de transcrição baseada nessa técnica é uma metodologia consolidada, sendo estes estudos em larga escala um aspecto crucial de uma nova forma de conceber a biologia experimental sendo potenciais ferramentas para estudar o papel do microambiente e biologia da célula (BAKER, 2008). Essa explosão de tecnologias de alta capacidade genômica abre uma nova área de pesquisa para a biostatística. À medida que mais cientistas começam a usar essas tecnologias para gerar novos conjuntos de dados, a necessidade de estabelecer estudos bem projetados com métodos estatísticos adequados é extremamente importante (ALMUDEVAR, 2006).

Células do epitélio alveolar do tipo II de ratos têm muitas funções fisiológicas conhecidas, como o movimento trans-epitelial de íons e água para retirar o líquido do pulmão fetal ao nascer, manter a homeostase do fluido alveolar normal, sintetizar uma variedade de moléculas efetoras imunes e enzimas antioxidantes para produção e secreção de surfactante pulmonar (BALLARD, 2010). Estas células são muito utilizadas como modelo de estudos sendo, na maioria das vezes, armazenadas para análises futuras. No entanto, não se sabe os efeitos que podem ser ocasionados quando há necessidade de incubação celular que ocorre principalmente devido a rotina laboratorial.

Visto isto, o estudo teve como objetivo determinar se o perfil de expressão gênica em células pulmonares tipo II de ratos, incubadas por 48 horas, é semelhante as células pulmonares tipo II adultas isoladas à fresco (controle), utilizando a técnica de microarranjo.

2. METODOLOGIA

As células isoladas foram semeadas em triplicata em placas revestidas com colágeno e cultivadas durante 48 h em DMEM-H21, F-12 de Ham (1:1) e 10% de soro fetal bovino. O RNA total foi extraído a partir de células do controle e de células incubadas utilizando RNA STAT (Tel -Test, Friendswood, TX) segundo as instruções do fabricante. Todas as amostras de RNA tinham alta integridade e pureza. Para a análise de microarranjo, o RNA foi convertido em cDNA marcado com biotina, utilizando reagentes e protocolos Affymetrix. O cDNA foi hibridizado com chips de microarranjo Affymetrix U133A que contêm 16-20 sondas oligonucleotídicas de 25-mer únicas com aproximadamente 14.500 sondas de genes, mas correspondentes à 12-16 sondas com uma única mudança de nucleotídeo. As hibridações foram realizadas com cDNA preparado a partir de células do controle e células incubadas por 48 horas. Um total de 15 chips foram analisados com células cultivadas a partir de três pulmões individuais. Hibridização, lavagem, coloração e a digitalização foi realizada utilizando os procedimentos descritos no manual técnico Affymetrix GeneChip Expression Analysis.

Affymetrix Microarray Suíte 5.0 foi utilizado para quantificar e analisar o conteúdo de mRNA de genes expressos. Os valores padrões fornecidos pelo Affymetrix foram aplicados a todos os parâmetros de análise. Sondas para 70 genes controle em cada chip foram usadas para normalizar a intensidade de fluorescência entre os chips e as matrizes foram escaladas a uma intensidade média de 1.500 unidades de fluorescência e analisadas de forma independente. A análise dos dados foi realizada via pacote Limma, uma biblioteca do ambiente Bioconductor R, utilizando falsas determinações baseadas em taxas de descoberta de números de genes diferencialmente expressos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pacote Limma gerou como resultado da análise uma lista de sondas (genes) com seus respectivos valores estatísticos obtidos (*Fold-change*, Média de Expressão, valor de T, valor de P e valor de B) que estão ilustrados na Tabela 1. Analisando os resultados gerados nesta tabela percebeu-se que os valores de P foram muito significativos para grande parte das sondas, no entanto quando os dados foram normalizados e ajustados verificou-se que nenhum dos genes foram diferencialmente expressos, com o valor de P ajustado mínimo de aproximadamente 0,211.

Tabela 1. Lista de 13 genes resultantes do pacote Limma com menor valor de P.

Gene	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
Moxd1	1.4572507	6.9211133333	10.0437358723	1.30864000058229e-05	0.2112668417	2.2205109657
LOC100360880	-0.854525	4.8874926667	-7.5539096642	9.29178329116006e-05	0.3058418579	1.1594520051
Kif18b	0.71628	4.292725	7.0583370362	0.0001460235	0.3058418579	0.8757496663
Rgs18	-1.017468	7.5279175	-6.8083086997	0.0001851584	0.3058418579	0.7210789174
Nuf2	-1.093259	3.2040736667	-6.6250824507	0.0002212802	0.3058418579	0.6024816673
Fam71a	-0.672415	6.3720403333	-6.5931088129	0.0002283558	0.3058418579	0.5813157206
Lin9	-0.917715	5.91635	-6.5557686471	0.0002369398	0.3058418579	0.5564171968
Haus3	-1.671272	10.1030805	-6.4388932607	0.0002662183	0.3058418579	0.4772144002
LOC691979	-0.456952	6.5430213333	-6.3269998425	0.000298066	0.3058418579	0.3995510475
LOC691979	0.5675973	8.171395	6.3175798552	0.0003009348	0.3058418579	0.3929294694
Hist1h1a	-0.591561	5.943685	-6.1284393728	0.0003655582	0.3058418579	0.2571818914
Hist1h2bl	-0.609967	6.4087888333	-6.1112322829	0.0003721637	0.3058418579	0.2445641967
Enc1	-0.731833	8.0880975	-5.9568361255	0.0004377403	0.3058418579	0.1293009694

Estes dados demonstram que as células de pulmão tipo II de rato podem ser incubadas por 48 h, sem alteração nos padrões de expressão dos aproximadamente 16.000 genes analisados, nas condições de cultivo utilizadas neste estudo, podendo as pesquisas com estas células ocorrer sem alteração nos resultados ocasionados pelo período de incubação.

4. CONCLUSÕES

Com os resultados demonstrados pode-se concluir que a incubação por 48 h de células pulmonares tipo II de rato por 48 h não altera os padrões de expressão celular. Além disso, evidencia que escolha das análises estatísticas corretas são fundamentais para um resultado de expressão diferencial confiável.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMUDEVAR, A; KLEBANOV, LB; QIU X; SALZMAN P; YAKOVLEV, AY. Utility of Correlation Measures in Analysis of Gene Expression. **The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**, Estados Unidos, v. 3, p.384–395, 2006.

BAKER, S.G.; KRAMER, B.S..Using microarrays to study the microenvironment in tumor biology: The crucial role of statistics. **Semin Cancer Biology**, Estados Unidos da América, v.18, n.5, p.305-310, 2008.

BALLARD, P.L.; LEE, J.W.; MATTHAY, M.A.. Regulated gene expression in cultured type II cells of adult human lung. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, Estados Unidos da América, p. 36 - 50, 2010.

HE, Z.; CHAN, W.Y.; DYM, M.. Microarray technology offers a novel tool for the diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. **Reproduction**, Estados Unidos da América, v.132, p.11-19, 2006.

NAPOLI, C.; LERMAN, L.O; NIGRIS, F.. Microarray analysis: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians. **Heart**, Estados Unidos da América, v.89, n.6, p.597-604, 2003.

ROYCE, T.E.; ROZOWSKY, J.S.; GERSTEIN, M. Issues in the analysis of oligonucleotide tiling microarrays for transcript mapping. **Trends in genetics: TIG**, Estados Unidos da América, v.21, n.8, p.466-475, 2005.