

Qual a diferença de expressão de miRNAs nas diferentes subregiões do hipocampo de ratos?

Palavras-chave: miRNA, Hipocampo, Expressão gênica

Nicolas Alexandre de Oliveira, IB, Unicamp

Prof. Dr. André Schwambach Vieira, IB, Unicamp

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso é um tecido heterogêneo que proporciona percepções sobre o ambiente através da associação entre o Sistema Nervoso Central e o Sistema Nervoso Periférico. No cérebro, o hipocampo, uma estrutura crucial para a retenção de memória de longo prazo e aprendizagem devido à sua plasticidade sináptica (Anand e Dhikav 2012; Knierim 2015), pode ser dividido em quatro subregiões: CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado (GD) (Knierim 2015). O estudo dos microRNAs (miRNAs) tem se mostrado vital no contexto do hipocampo. Esses pequenos RNAs regulatórios (~22nt) regulam a expressão de RNAs mensageiros (mRNAs) por meio do silenciamento pós-transcricional da expressão gênica (Shang et al. 2023). Considerando a importância dos miRNAs na modulação da expressão gênica e na plasticidade sináptica, processos essenciais para memória e aprendizagem, seu estudo no hipocampo é crucial. Diversos bancos de dados dedicados à análise e ao armazenamento de informações sobre miRNAs permitem a verificação de diferenças na expressão gênica dos miRNAs e de seus mRNAs alvos, proporcionando insights valiosos sobre os mecanismos moleculares que sustentam as funções cognitivas do hipocampo. O estudo conduzido por Machado - “*The transcriptome of rat hippocampal subfields*” (Machado et al. 2022)) - apresentou dados inéditos referentes a expressão gênica diferencial de cada sub-região do hipocampo, apontando novos genes marcadores, processos biológicos e relações hierárquicas de semelhança de expressão global de mRNAs entre as subregiões utilizando sequenciamento de nova geração de mRNAs no hipocampo e ferramentas de bioinformática. Porém, os dados de miRNAs podem se comportar de uma maneira diferente do que os mRNAs, e, dessa forma, neste estudo, realizamos a listagem e comparação de miRNAs encontrados nas diferentes subregiões do hipocampo, com o objetivo de contribuir para avanços significativos na área de pesquisa clínica. Posteriormente a isso, verificamos possíveis vias diferenciais em cada uma das subregiões.

2. MÉTODOS

As mesmas amostras de RNA descritas no estudo “*The transcriptome of rat hippocampal subfields*”, Machado et al 2022, foram usadas. Segue descrição resumida dos procedimentos. Foram utilizados ratos Wistar machos (n=5) cada um com 12 semanas de idade, sendo realizada anestesia e remoção dos encéfalos conforme previamente descrito (Machado et al. 2022), apresentando o protocolo CEUA Unicamp 2903-1. Os encéfalos foram processados para produção de lâminas histológicas, sendo realizada microdissecção a laser para isolamento das subregiões hipocámpais CA1, CA2, CA3 e GD, seguido de extração de RNA utilizando-se Trizol.

Para o preparo de bibliotecas de microRNA foram utilizados 200ng de RNA das amostras. As bibliotecas foram preparadas utilizando-se o KitTruSeq SmallRNA Library Preparation, Illumina Inc., seguindo instruções do fabricante. As bibliotecas obtidas foram sequenciadas por meio da plataforma Illumina HiSeq 2500. Os arquivos FASTQ obtidos a partir do sequenciamento de cada amostra foram utilizados nas etapas posteriores de análise *in silico*.

No que diz respeito à verificação da qualidade dos *reads* obtidos, foi utilizado a ferramenta *Fast Quality Control* (FASTQC) para promover tal análise, seguindo os resultados esperados para miRNAs, sendo eles com poucos erros. Já para a remoção de adaptadores e primers de RNA PCR, foi utilizado a ferramenta *Reaper*, removendo exclusivamente os adaptadores e indexes dos miRNAs com os devidos parâmetros. Para promover o alinhamento das sequências, foi utilizado a ferramenta *Bowtie2* (Langmead and Salzberg 2012) com os devidos parâmetros.

A ferramenta *miRDeep2* (Friedländer et al. 2012) foi utilizada para a identificação dos miRNAs, havendo o uso das ferramentas *mapper.pl* e *quantifier.pl*, contribuindo com o processo de identificação e quantificação dos *reads* de miRNAs, respectivamente. Já para a realização da normalização dos dados e análise estatística dos genes diferencialmente expressos foi usado o pacote *DESeq2* (Love, Huber, and Anders 2014), ambientado em R, que auxiliou na formação do Gráfico de Componentes Principais e tabelas de comparação entre as subregiões. Para obtenção dessas tabelas, foi realizada a comparação entre as subregiões hipocámpais (par a par e uma contra todas) para estabelecer qual miRNA era mais ou menos expresso a depender da comparação¹. Os dados foram selecionados levando em consideração um grau de significância estatística de p-value ajustado <0.05 e um *basemean* >10 após a análise pelo DESeq2. Além disso, foi feita uma predição com a ferramenta online *GeneCodis4* (Garcia-Moreno et al. 2022) para Processos Biológicos (BP) para identificar possíveis BP diferenciais para cada uma das subregiões.

3. RESULTADOS

Após o sequenciamento, foi obtido um total de 648.402 *reads* em média por amostra. No controle de qualidade, conseguimos obter os dados referentes a quantidade das amostras, quantidade de adaptadores, confiança da base por posição e sequências superexpressadas para cada uma das subregiões disponíveis dos 5 ratos. Após isso, foi necessária a realização de

¹ Como ler: AxB - Significa que A foi o controle para verificação dos genes em B. Logo, se determinado gene está com LogFoldChange > 0, significa que ele está superexpresso em B em relação a A.

um *Trimming* a fim de encontrarmos as amostras os miRNAs propriamente ditos em cada uma das subregiões dos animais, realizando o procedimento com o software *Reaper*. Após o corte com o *Reaper*, os dados não apresentaram mais os Primers ou mesmo adaptadores.

Ao utilizar o *miRDeep2*, foram obtidos os dados de expressão de cada miRNA para as subregiões do hipocampo. Após isso, houve a contagem dos miRNAs presentes em cada uma das subregiões, obtendo o Gráfico 1.

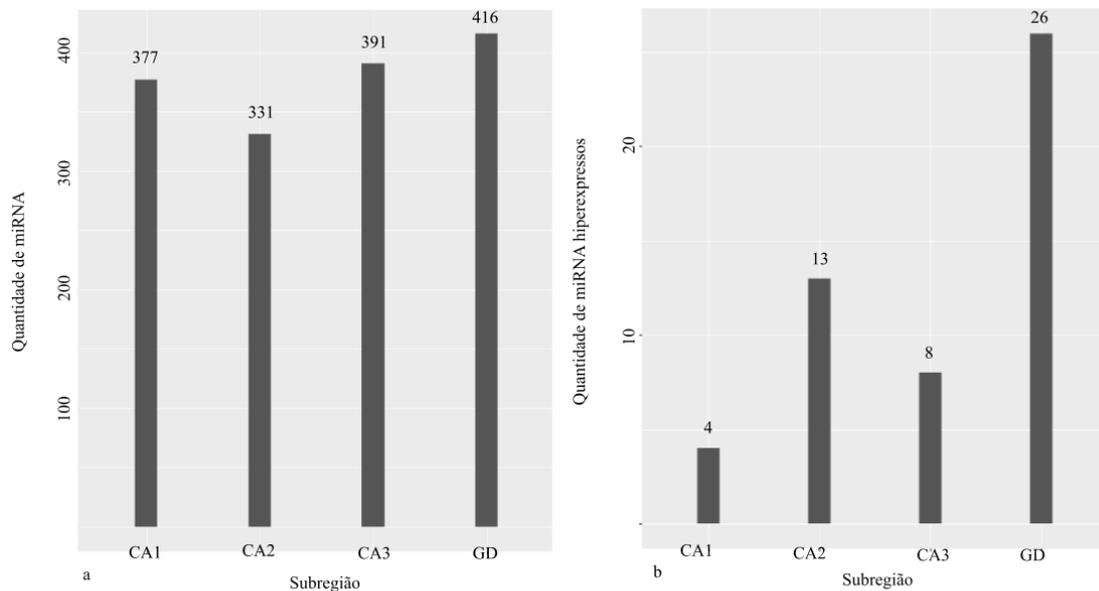


Gráfico 1 - a. Gráfico em barras obtido pelo R mostrando a quantidade de miRNAs totais encontrados em todas as amostras em cada uma das subregiões, levando em consideração um cut-off de 10 reads per count. b. Gráfico em barras obtido pelo R mostrando a quantidade de miRNA superexpressos encontrada em cada uma das subregiões do hipocampo, levando em consideração p-value ajustado <0.05

Para cada uma das subregiões, foram encontrados os valores quantitativos e qualitativos de miRNAs totais (Gráfico 1a), bem como o número de miRNAs específicos que cada uma possui (Gráfico 1b). Para determinar o número de miRNAs expressos em cada uma das subregiões foi estabelecido um *cutoff* de 10 *counts* para cada amostra e, então, somado a quantidade de miRNAs diferentes encontrados em todas as amostras para aquela subregião. Dos 377 miRNAs encontrados em CA1, 4 são superexpressos e 4 hiporexpressos; na subregião CA2, 13 miRNA superexpressos e 17 hiporexpressos. Já para CA3, 8 superexpressos e 1 hiporexpresso, enquanto na subregião GD, 26 são mais expressos e 32 são hiporexpressos. Todos esses valores levam em consideração um p value ajustado <0.05.

	Superexpressos na subregião hipocampal CA1	Hiporexpressos na subregião hipocampal CA1
Subregião	miRNA	miRNA
CA1	rno-miR-7a-5p	rno-miR-31a-5p
CA1	rno-miR-7b	rno-miR-181d-5p
CA1	rno-miR-29a-3p	rno-miR-383-5p

Tabela 1 - miRNAs superexpressos e hiporexpressos para a subregião CA1 do hipocampo em comparação com as demais sub-regiões avaliadas. p-value ajustado <0.05.

	Superexpressos na subregião hipocampal CA2	Hiporexpressos na subregião hipocampal CA2
Subregião	miRNA	miRNA
CA2	rno-miR-485-5p	rno-miR-326-3p
CA2	rno-miR-434-3p	rno-miR-136-3p

CA2	rno-miR-540-3p	rno-miR-221-5p
-----	----------------	----------------

Tabela 2 - miRNAs superexpressos e hipoexpressos para a subregião CA2 do hipocampo em comparação com as demais sub-regiões avaliadas. p-value ajustado <0.05.

	Superexpressos na subregião hipocampal CA3	Hipoexpressos na subregião hipocampal CA3
Subregião	miRNA	miRNA
CA3	rno-miR-27b-3p	rno-miR-222-3p
CA3	rno-miR-23b-3p	
CA3	rno-miR-434-5p	

Tabela 3 - miRNAs superexpressos e hipoexpressos para a subregião CA3 do hipocampo em comparação com as demais sub-regiões avaliadas. p-value ajustado <0.05.

	Superexpressos na subregião hipocampal GD	Hipoexpressos na subregião hipocampal GD
Subregião	miRNA	miRNA
GD	rno-miR-204-5p	rno-miR-369-5p
GD	rno-miR-342-3p	rno-miR-434-5p
GD	rno-miR-186-5p	rno-miR-434-3p

Tabela 4 - miRNAs superexpressos e hipoexpressos para a subregião GD do hipocampo em comparação com as demais sub-regiões avaliadas. p-value ajustado <0.05.

Após isso, realizamos a análise de expressão diferencial para todas as sub-regiões em comparação par a par (CA1 x CA2, CA1 x CA3, etc), obtendo uma tabela com todos os nomes de miRNAs que estavam com um p-value ajustado < 0.05, separando entre os superexpressos e hipoexpressos, obtendo o Gráfico 2.

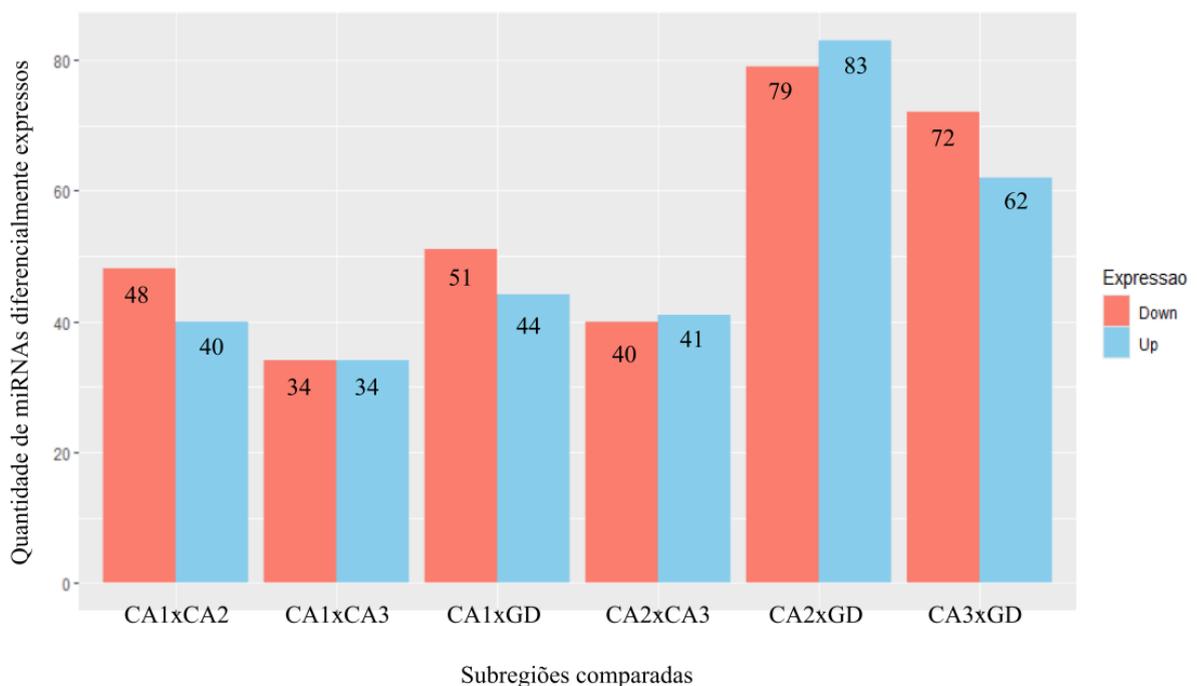


Gráfico 2 - Gráfico em barras obtido pelo R mostrando a quantidade de miRNA diferencialmente expressos encontrada comparando cada uma das subregiões do hipocampo par a par, levando em consideração p-value ajustado <0.05. Barras azuis revelam a quantidade de miRNAs hiperexpressos e barras vermelhas indicam miRNAs hipoexpressos por subregião.

O Gráfico 2 indica o número total de genes diferencialmente expressos comparando as regiões par a par. Como é possível observar, a comparação de expressão dos mRNAs da subregião CA2 com a subregião GD é a que mais apresenta divergência de expressão. Com isso, para melhor visualização, conseguimos construir uma Análise de Componentes Principais (PCA - Gráfico 3) demonstrando a variação entre as amostras e seu relacionamento entre si, bem como o que está mostrado no Gráfico 2.

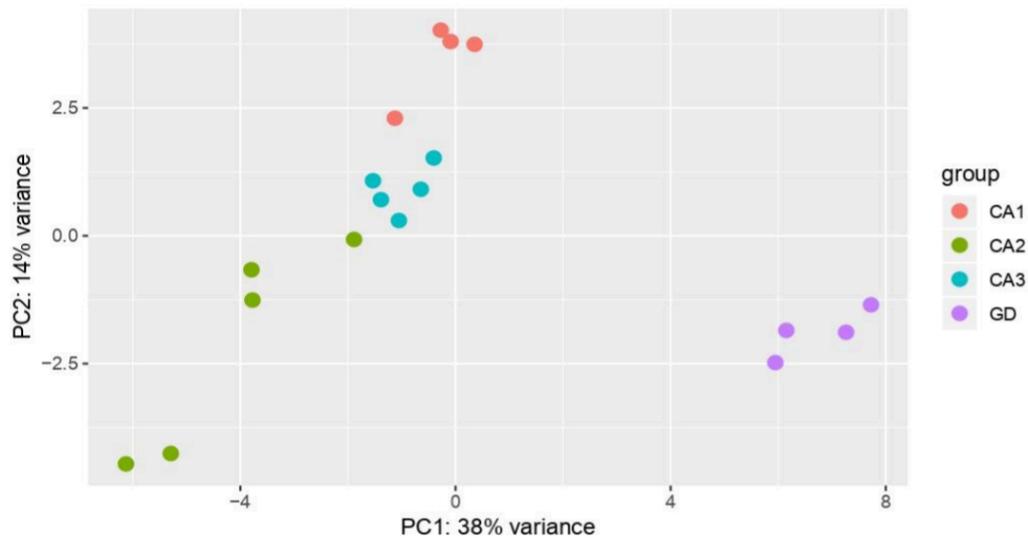


Gráfico 3 - Gráfico PCA obtido pelo pacote DESeq2 para a análise de expressão diferencial das subregiões do hipocampo. Nele é possível observar a formação de agrupamentos respectivos de cada uma das subregiões.

Neste gráfico, ficou evidenciado que há concentrações em grupos de expressão característicos de cada uma das sub-regiões capaz de agrupar as amostras individuais em clusters (agrupamentos) evidenciados pelos círculos de mesma cor. CA2 é a sub-região que mais apresenta variação interna dentro de sua expressão. Ademais, as tabelas a seguir apresentam alguns dos possíveis BP diferenciais em cada uma das subregiões utilizando a ferramenta online *GeneCodis4* (Garcia-Moreno et al. 2022).

Processos Biológicos diferenciais em CA1 quando comparado com todas as outras regiões	
Descrição	p valor ajustado
Poli-ADP-ribosilação de proteínas	0.0030562832420414927
Autoprocessamento de proteínas	0.0030562832420414927
Regulação positiva da reparação de quebra de dupla fita via recombinação homóloga	0.0030562832420414927

Tabela 5 - Processos biológicos que são diferenciais para a subregião CA1.

Processos Biológicos diferenciais em CA2 quando comparado com todas as outras regiões	
Descrição	p valor ajustado
Transdução de sinal	0.025504097411738376
Regulação positiva do processo de apoptose	0.025504097411738376
Resposta à cafeína	0.03679728697655673

Tabela 6 - Processos biológicos que são diferenciais para a subregião CA2.

Processos Biológicos diferenciais em CA3 comparado com todas as outras regiões	
Descrição	p valor ajustado

Homeostase dos linfócitos	0.0005697676985873378
Regulação positiva da permeabilidade da membrana mitocondrial envolvida no processo apoptótico	0.0005697676985873378
Desenvolvimento do baço	0.0005697676985873378

Tabela 7 - Processos biológicos que são diferenciais para a subregiãoCA3

Processos Biológicos diferenciais em GD comparado com todas as outras regiões	
Descrição	p valor ajustado
Envelhecimento	0.0011740108014534941
Ritmo circadiano	0.003679857102118997
Regulação negativa do processo de apoptose	0.043622730629183565

Tabela 8 - Processos biológicos que são diferenciais para a subregiãoGD

4. DISCUSSÃO

Com este trabalho demonstramos que existe uma expressão diferencial de miRNAs específica para cada sub-região do hipocampo, denotando mais uma vez que as sub-regiões apresentam maquinaria de expressão e regulação gênica específicas, podendo refletir em funções cognitivas/neurológicas únicas desempenhadas por elas. A partir do PCA observamos que GD é a sub-região com maior diferença de expressão de miRNAs, assim como o observado nos dados de Machado e colaboradores (Machado et al., 2022).

Perante todos os resultados, foi possível evidenciar a comparação CA2 x GD apresentou maior número de miRNAs com expressão diferencial frente a todas as demais comparações, e que CA2 possui a maior variação de expressão interna comparada a todas as demais subregiões.

5. CONCLUSÃO

Dessa forma, como principais aquisições e conclusões, conseguimos elencar quais eram os miRNAs expressos em cada uma das subregiões, obtendo a lista desses miRNAs. Conseguimos também comparar esses miRNAs entre as subregiões e compreender quais subregiões apresentavam maior similaridade entre si e e qual a mais distinta, percebendo que há expressão diferencial de miRNAs entre as subregiões. E, além disso, conseguimos encontrar quais são os miRNAs específicos de cada subregião, nos proporcionando informações sobre os processos biológicos diferenciais.

6. REFERÊNCIAS:

- Anand, Kuljeet Singh, and Vikas Dhikav. 2012. "Hippocampus in Health and Disease: An Overview." *Annals of Indian Academy of Neurology* 15 (4): 239.
- Friedländer, Marc R., Sebastian D. Mackowiak, Na Li, Wei Chen, and Nikolaus Rajewsky. 2012. "miRDeep2 Accurately Identifies Known and Hundreds of Novel microRNA Genes in Seven Animal Clades." *Nucleic Acids Research* 40 (1): 37–52.
- García-Moreno, Adrian, Raul López-Domínguez, Juan Antonio Villatoro-García, Alberto Ramirez-Mena, Ernesto Aparicio-Puerta, Michael Hackenberg, Alberto Pascual-Montano, and Pedro Carmona-Saez. 2022. "Functional Enrichment Analysis of Regulatory Elements." *Biomedicines* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030590>.
- Knierim, James J. 2015. "The Hippocampus." *Current Biology: CB* 25 (23): R1116–21.
- Langmead, Ben, and Steven L. Salzberg. 2012. "Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2." *Nature Methods* 9 (4): 357–59.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, and Simon Anders. 2014. "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2." *Genome Biology* 15 (12): 550.
- Machado, João P. D., Maria C. P. Athie, Alexandre H. B. Matos, Iscia Lopes-Cendes, and André S. Vieira. 2022. "The Transcriptome of Rat Hippocampal Subfields." *IBRO Neuroscience Reports* 13 (December): 322–29.
- Rouleau, Nicolas, Nirosha J. Murugan, and David L. Kaplan. 2023. "Functional Bioengineered Models of the Central Nervous System." *Nature Reviews Bioengineering* 1 (4): 252–70.
- Shang, Renfu, Seungjae Lee, Gayan Senavirathne, and Eric C. Lai. 2023. "microRNAs in Action: Biogenesis, Function and Regulation." *Nature Reviews. Genetics* 24 (12): 816–33.