

## **Variabilidade genética e aspectos funcionais de polimorfismos genéticos em genes de microRNA importantes no processo de desenvolvimento cerebral**

**ANDRESSA MARQUES-CARVALHO<sup>1</sup>; THAIS MARTINS-SILVA<sup>2</sup>; LUCIANA TOVO-RODRIGUES<sup>3</sup>**

*Universidade Federal de Pelotas – [andressa\\_kissner@hotmail.com](mailto:andressa_kissner@hotmail.com)*

*<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [thaismartins88@hotmail.com](mailto:thaismartins88@hotmail.com)*

*<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luciana.tovo@gmail.com](mailto:luciana.tovo@gmail.com)*

### **1. INTRODUÇÃO**

Um importante mecanismo relacionado à epigenética diz respeito à regulação da expressão gênica por microRNAs (miRNAs). Esses elementos moleculares constituem uma grande família de pequenos RNAs endógenos não codificantes, com papel na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional (FINNEGAN e PASQUINELLI, 2013). Os miRNAs são descritos como importantes para a manutenção do equilíbrio celular e estão envolvidos em diferentes etapas do desenvolvimento do organismo, de maneira que alterações em seu funcionamento estão associados com algumas doenças, como câncer (ESTELLER, 2011). Ainda, estão envolvidos em funções cerebrais como aprendizagem, memória, emoções e transtornos mentais (SALTA; DE STROOPER, 2012). No que diz respeito a regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), ZIATS; RENNERT (2014) identificaram um conjunto de miRNAs com padrões de expressão diferenciais espacial-temporal que podem regular essas mudanças. Os genes-alvo desses miRNAs são altamente relacionados na regulação transcricional, processos de neurodesenvolvimento e distúrbios do desenvolvimento neurológico, sugerindo que os miRNAs identificados sejam provavelmente núcleos de processos críticos de transição e desenvolvimento do cérebro.

Variantes genéticas dentro de miRNAs ou em seus sítios regulatórios são capazes de afetar a função dos miRNAs, podendo afetar sua biogênese e papel regulatório e, por consequência, podem ser fatores importantes envolvidos na etiologia de doenças, como as psiquiátricas (SETHUPARTHY; COLLINS, 2008). As variantes genéticas mais comuns no genoma humano são os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), considerados variações na sequência do DNA que envolvem a alteração de um único nucleotídeo. Na literatura, associação entre SNPs em miRNAs e transtornos psiquiátricos já foram demonstradas (ISSLER; CHEN, 2015). Considerando a importância de miRNAs para o desenvolvimento adequado do SNC (ZIATS; RENNERT, 2014) a avaliação de SNPs dentro desse conjunto de miRNAs é relevante para uma maior compreensão do papel desses miRNAs no desenvolvimento saudável e patológico do SNC.

Este trabalho visa descrever a viabilidade genética em populações de diferentes continentes e seus aspectos funcionais em genes de miRNA diferencialmente expressos durante o desenvolvimento cerebral, bem como descrever a variabilidade considerando diferentes etapas do desenvolvimento.

### **2. METODOLOGIA**

Empregou-se uma abordagem *in silico*. A identificação de polimorfismos e sua predição de funcionalidade foi realizada através de ferramentas de bioinformática específicas para o estudo de miRNAs. Ao total, 62 microRNAs

identificados por ZIATS; RENNERT (2014) foram incluídos no estudo. Estes foram investigados em três bancos de dados: (1) *PolymiRTS Database 3.0*, uma plataforma integrada para analisar o impacto funcional de polimorfismos genéticos em regiões de semente de miRNAs e sítios-alvo de miRNAs (BHATTACHARYA et al., 2014); (2) *miRNASNP 2.0*, banco de dados que tem por finalidade viabilizar informações sobre SNPs relacionados a miRNAs, incluindo SNPs em regiões pré-miRNAs, madura e semente em humanos e outras espécies (GONG et al., 2015); e (3) *dPORE*, um banco de dados que integra informações de regiões promotoras de genes de miRNAs humanos, permitindo explorar o efeito do SNP na regulação transcricional dos genes de miRNAs (SCHMEIER et al., 2011).

Quatro miRNAs foram excluídos das análises por inconsistência de anotação (miR-486, miR-3687, miR-3607 e miR-5096), restando 58 miRNAs incluídos na busca. Para o programa *dPORE*, foram incluídos os SNPs localizados no sítio promotor anotado pelo servidor *UCSC genome*. Após realizar a verificação de miRNAs nos bancos de dados específicos e identificar os SNPs relacionados a eles, estes foram acessados no projeto 1000 genomas e *Variant Effect Predictor* para identificação de frequência alélica nas populações continentais do projeto e anotação adequada. Aqueles SNPs sem frequência alélica descrita com inconsistência de código identificador entre os bancos acessados ou de anotação de alelos, foram excluídos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa STATA (versão IC/14.0) e *WinPepi*.

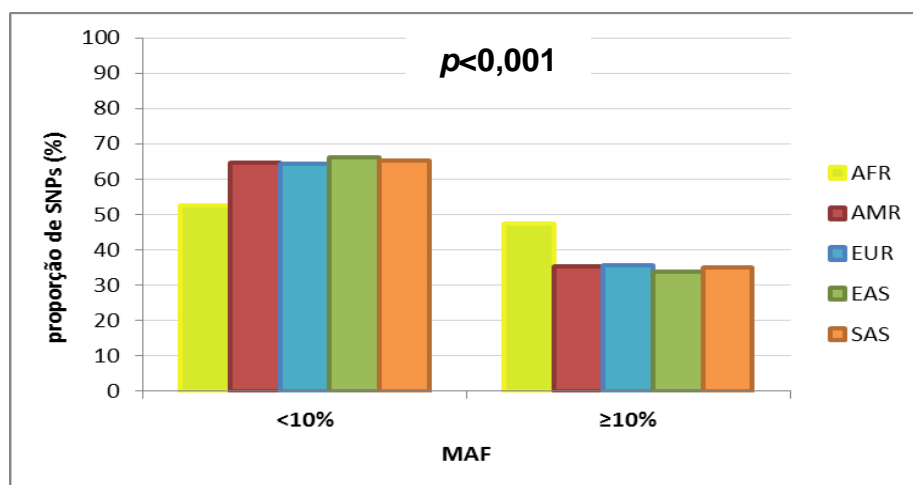
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 58 miRNAs submetidos à busca, todos foram localizados em pelo menos um banco de dados. Sendo 54 miRNAs identificados no *dPORE*, 35 miRNAs encontrados no banco de dados *miRNASNP* e 9 miRNAs, no *PolymiRTS*. A busca dos miRNAs retornou a identificação de 437 SNPs. Destes, 366 SNPs são regulatórios e foram identificados através do banco de dados *dPORE*, enquanto no banco de dados *miRNASNP* e *PolymiRTS* foi possível a identificação de 71 SNPs – estes em região transcrita do miRNA. Dentre os SNPs presentes em região transcrita, de acordo com a funcionalidade, 64,8% estão em região de pré-miRNA, 16,9% em região de semente e 18,3% na região madura do miRNA.

O banco de dados *dPORE* permite explorar o efeito do SNP na regulação transcricional dos genes de miRNAs. De acordo com esse programa, um mesmo SNP pode ser classificado em quatro efeitos: 1) sem alteração; 2) perda do sítio de ligação; 3) ganho de sítio de interação onde não havia; e 4) alteração do sítio de ligação – podendo alterar a proteína com que se liga ou afinidade pela proteína que interage no sítio. Do total de SNPs localizados em regiões regulatórias, a maioria teve um efeito predito como alteração funcional do sítio – sendo 18% responsável pela criação de sítio, 21,9% pela perda de sítio, 15,6% como modificados exclusivamente e 29,8% dos SNPs, foram descritos como tendo mais de uma funcionalidade relacionada à alteração. Apenas 14,8% foram descritos como não causando modificação. Isso sugere a influência do efeito desses SNPs na biologia dos genes de miRNAs, podendo afetar a regulação gênica conforme seu efeito.

De acordo com a variabilidade genética, os SNPs foram categorizados em relação a frequência do alelo de menor frequência (MAF) para as seguintes populações incluídas no projeto 1000 Genomas: Africanos, Americanos, Europeus, Leste Asiático e Sul Asiático, categorizados em  $MAF < 10\%$  e  $MAF \geq 10\%$ . Observa-se que as frequências alélicas dos SNPs são semelhantes entre as populações, com exceção da população africana. Pode se observar que

essa população contém mais variantes genéticas com  $MAF \geq 10\%$  que as demais populações (52,5%;  $p < 0,001$ ) (FIGURA 1). É possível que a população Africana se sobressaia em relação ao maior número de marcadores genéticos, com maior variabilidade, em decorrência de questões evolutivas, uma vez que é a população com maior tempo na história para desenvolver mutações e/ou recombinações no genoma (1000 GENOMES PROJECT).



**FIGURA 1** – Gráfico representando a proporção de SNPs para as cinco populações, de acordo com as duas categorias de MAF. \* Dados obtidos através do Projeto 1000 genomas

A população africana, assim como a maior proporção de SNPs com  $MAF \geq 10\%$  também apresenta o maior número de miRNAs que apresentam pelo menos um SNP com  $MAF \geq 10\%$ , abrangendo 81% dos miRNAs nessa categoria, enquanto a população americana e a população do sul asiático possuem 75,9%, os europeus 74,1% e a população do leste asiático 72,4% dos miRNAs com pelo menos um SNP com  $MAF \geq 10\%$ . Entretanto, conforme o Teste Exato de Fisher essa diferença não é significativa ( $p=0,857$ ).

Utilizando os dados de etapa de desenvolvimento específica identificados por ZIATS; RENNERT (2014), comparou-se essas etapas em relação a presença de miRNAs com pelo menos um SNP com  $MAF \geq 10\%$  (TABELA 1). Visou-se verificar se haveria miRNAs de maior variabilidade associado a alguma etapa.

**TABELA 1** – Proporção de miRNAs com SNP com  $MAF \geq 10\%$  para as cinco populações do Projeto 1000 Genomas nas três fases do desenvolvimento cerebral, de acordo com os dados de expressão diferencial apresentada por ZIATS; RENNERT (2014).

POPULAÇÃO	Infância → primeira infância (Total:50 miRNAs)		Primeira infância → infância tardia (Total:16 miRNAs)		Infância tardia → adolescência (Total:9 miRNAs)		Valor -p
	MAF ≥10%	MAF <10%	MAF ≥10%	MAF <10%	MAF ≥10%	MAF <10%	
Valor-p	0,927		1,000		0,987		
AFRICANOS	41 (82)	9 (18)	14 (87,5)	2 (12,5)	7 (77,7)	2 (22,2)	0,813
AMERICANOS	39 (78)	11 (22)	14 (87,5)	2 (12,5)	6 (66,6)	3 (33,3)	0,389
EUROPEUS	39 (78)	11 (22)	14 (87,5)	2 (12,5)	5 (55,5)	4 (44,4)	0,219
LESTE ASIÁTICO	37 (74)	13 (26)	15 (93,7)	1 (6,2)	6 (66,6)	3 (33,3)	0,146
SUL ASIÁTICO	39 (78)	11 (22)	14 (87,5)	2 (12,5)	6 (66,6)	3 (33,3)	0,389

De acordo com a TABELA 1, não há diferença entre as populações dentre as etapas do desenvolvimento ( $p=0,927$ ,  $p=1,000$   $p=0,987$  e para infância à primeira infância, primeira infância à infância tardia e infância tardia à adolescência, respectivamente). Bem como, as populações não diferem entre as etapas do desenvolvimento ( $p=0,813$ ,  $p=0,389$ ,  $p=0,219$ ,  $p=0,146$ ,  $p=0,389$ , para Africanos, Americanos, Europeus, Leste Asiático e Sul Asiático, respectivamente).

#### 4. CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos é possível concluir que os aspectos funcionais causados por SNPs em regiões regulatórias são de extrema importância visto que a grande maioria de SNPs causa determinado efeito, podendo assim alterar a regulação transcricional de genes de miRNAs. Em relação a variabilidade genética é possível concluir que a população africana é a mais flexível em relação as demais populações. Já em relação a etapas do desenvolvimento, não parece haver uma etapa que seja enriquecida em miRNAs de grande variabilidade. Trabalhos adicionais nessa área, com evidências *in silico* e *in vitro* e com a avaliação de outras regiões promotoras poderão adicionar informações importantes ao presente estudo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**dPORE** - miRNA: Dragon database on Polymorphic Regulation of human miRNA genes. Disponível em: <<http://www.cbrc.kaust.edu.sa/dpore/>> Acesso em: 10 dez. 2017.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics** v.12 p.861-874, 2011.

FINNEGAN, E. F. & PASQUINELLI, A.E. MicroRNA biogenesis: Regulating the Regulators. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** v.48, p. 51-68, 2013.

ISSLER, O. & CHEN, A. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience** v.16, p.201-212, 2015.

**miRNASNP\_v2**: microRNA-related single Nucleotide Polymorphisms database. Disponível em < <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/> >. Acesso em: 10 dez. 2017.

**PolymiRTS Database 3.0**: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. Disponível em <<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

SALTA, E.; DE STROOPER, E. Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders. **The Lancet Neurology** v.11, p189-200, 2012.

SETHUPATHY, P. & COLLINS, F.S. MicroRNA target site polymorphisms and human disease. **Trends in Genetic** v.24, p.489–497, 2008.

The 1000 Genomes Project Consortium, . A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature** v. 467, p. 1061-1073, 2010.

ZIATS, M.N. & RENNERT, O.M. Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. **Molecular Psychiatric** v.19, n.7, p.848-852, 2014.