

ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO EXERCÍCIO EXAUSTIVO EM *Rattus norvegicus*

(Multivariate statistical analysis of expression of micrnas in the exhaustive exercise in rattus norvegicus)

Raquel Martins de FREITAS*; Stela Mirla da Silva FELIPE; Christina Pacheco Santos MARTIN; Jonathan Elias Rodrigues MARTINS; Vânia Marilande CECCATTO

Universidade Estadual do Ceará (UECE), Centro de Ciências da Saúde, Avenida Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP:60.740-000.

*E-mail: raquel.martins@aluno.uece.br

RESUMO

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA que atuam na regulação e silenciamento gênico em organismos eucariotos. Na atividade física a compreensão da expressão de microRNAs pode ser relevante para entendimento da sua fisiologia. Feito o transcriptoma do exercício exaustivo agudo em *Rattus norvegicus*, buscou-se analisar a expressão diferencial (através do valor obtido de *Fold-Change*) de microRNAs, com o auxílio de avaliação estatística multivariada, em ambiente R. Os métodos usados mostraram expressão de 71 miRNAs. Destes, destacaram-se 6 (por análise PCoA) e dois microRNAs: mir145 e mir186 (por análise de expressão diferencial, *EBseq*). Concluiu-se que com os métodos usados (PCoA, Permanova e Simper) foi possível analisar a expressão diferencial de microRNAs e destacar possíveis alvos de estudo para o exercício experimental extenuante.

Palavras-chave: MicroRNAs, Expressão Gênica, Estatística Multivariada.

SUMMARY

MicroRNAs are small molecules of RNA that act on the regulation and gene silencing in eukaryotic organisms. In physical activity the understanding of the expression of microRNAs may be relevant to understanding their physiology. The transcriptome of acute exhaustive exercise in *Rattus norvegicus* was used to analyze the differential expression (through the *Fold-Change* value obtained) of microRNAs, with the aid of multivariate statistical evaluation, in the R environment. The methods used showed expression of 71 miRNAs. Of these, six (by PCoA analysis) and two microRNAs: mir145 and mir186 (by differential expression analysis, *EBseq*) were highlighted. It was concluded that with the methods used (PCoA, Permanova and Simper) it was possible to analyze the differential expression of microRNAs and to highlight possible study targets for the strenuous experimental exercise.

Key words: MicroRNAs, Gene Expression, Multivariate Statistics.

INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos de origem endógena, que atuam regulando mecanismos de expressão gênica em plantas, animais e vírus. O mecanismo de ação é pós-

*Endereço para correspondência:

raquel.martins@aluno.uece.br

transcricional, o que causa a repressão da tradução. Apesar de sua importância, essas moléculas só foram ganhar notoriedade recentemente e acredita-se que compõem uma das classes mais abundantes de moléculas regulatórias em organismos pluricelulares. Diversos estudos evidenciam que essas moléculas são cruciais para a compreensão de processos de desenvolvimento de várias doenças, dentre elas: câncer, doenças neurodegenerativas, distrofias musculares etc. (ARDEKAN e NAEINI, 2010; ALEXANDER e KUNKEL, 2010).

O músculo esquelético tem uma capacidade eminente na resposta a intervenções ligadas ao exercício físico e a dieta; o treino físico estimula mudanças na expressão de genes, promovendo o aumento da estabilidade dos mRNA transcritos e a eficiência da transcrição. A prática de exercício físico media a saúde através da expressão gênica induzindo mudanças agudas e adaptativas, conduzindo uma melhoria fisiológica em processos moleculares como aqueles oxidativos e não-oxidativos, angiogênese, hipertrofia de miofibras cardíacas e esqueléticas (SOCI *et al.* 2017; HARGREAVES e CAMERON-SMITH, 2002; BOOTH *et al.*, 2002).

Os miRNAs apresentam características que os tornam peças-chaves para o controle da regulação adaptativa molecular induzida pelo exercício. Vários grupos de miRNAs reguladores de processos biológicos específicos para músculo esquelético e cardíaco foram identificados. Vários protocolos de treinamento físico usam esses grupos como biomarcadores para avaliar o melhoramento de processos específicos e na detecção prematura de anomalias relacionadas ao exercício de alta performance e de doenças em geral (LOMBARDI *et al.*, 2016; POLAKOVIČOVÁ *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015; KIRBY *et al.*, 2016).

A relação entre o exercício físico e a expressão de miRNAs é relevante para a compreensão de diversos processos fisiológicos que envolvem o músculo esquelético (DINIZ e WANG, 2016). No presente trabalho avaliou-se, através da produção de transcriptoma de músculo esquelético de *Rattus norvegicus* submetidos ao exercício exaustivo, a expressão diferencial de microRNAs e avaliação estatística multivariada em ambiente R.

METODOLOGIA

O experimento (Processo CEUA/UECE: 1592060/2014), consistiu primeiramente, no treinamento físico dos animais, os quais foram submetidos ao exercício físico extenuante, em esteira adaptada. Os animais foram divididos em dois grupos, Controle (n=4) e Treinado (n=4). O grupo C ficou na condição de sedentário. Os dois grupos passaram por adaptação à esteira. O grupo T foi submetido a uma sessão de corrida na esteira, com velocidade inicial de 0,5 Km/h e com aumento de 0,2 Km/h a cada três minutos, até a exaustão do animal. Após 24h, o músculo sóleo foi dissecado e submetido aos protocolos bioquímicos e RNA-seq.

Após processamento, em ferramentas de bioinformática, das sequências de mRNA, os miRNAs expressos obtidos no experimento foram selecionadas para análises de expressão diferencial no ambiente R, pacote EBseq (LENG *et al.*, 2013). Para verificar a

*Endereço para correspondência:

raquel.martins@aluno.uece.br

interação dos miRNAs com os genes alvos, foi utilizado o banco de dados miRBase. Foram realizadas também, as análises de estatística multivariada, PCoA (Análise de Coordenadas Principais / distância *Bray-curtis*) e PERMANOVA (Análise de Variância Multivariada Permutacional), com pacote *Vegan* (GOWER, 1966; BRAY e CURTIS, 1957; ANDERSON *et al.*, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 71 miRNAs expressos no sequenciamento. A análise de expressão diferencial no ambiente R, com o pacote *EBseq*, através dos valores de *Fold-Change* (FC) e *False Discovery Rate* (FDR) dos miRNAs, apresentou expressão diferencial significativa dos Mir145 e Mir186 (Tab. 1). Na tabela é possível verificar que o Mir186 mostrou FC maior, apesar de ambos serem significativos, com $p < 0.05$ e $FDR < 0.05$.

Tabela 1: Resultados dos miRNAs diferencialmente expressos no EBSeq.

Gene	Fold change	P	FDR
Mir186	2,35	$p < 0,05$	$FDR < 0,05$
Mir145	1,62	$p < 0,05$	$FDR < 0,05$

Na avaliação estatística com o método de PCoA, 6 miRNAs se destacaram: Mir3074, Mir3582, Mir24-2, Mir208b, Mir56 e Mir22 (Gráf. 1). Os resultados através da plotagem gráfica exibiram uma diferença entre os miRNAs expressos no grupo controle e treinado (Gráf. 1). Na análise de PERMANOVA ($p < 0.17$), as amostras não apresentaram diferença significativa.

Os genes de miRNA podem originar um par de miRNAs: 5p e 3p, o que torna a quantidade de genes alvos bastante extensa, o que indica que provavelmente esses miRNAs estão presentes na regulação de diversos processos fisiológicos (BHAYANI *et al.*, 2012). A busca pela interação dos transcritos desses miRNAs com outros genes foi realizada na base de dados [miRDB](#), a qual resultou na predição de uma grande variedade de genes alvos, foi encontrado que os transcritos de Mir186 possuem 776 genes alvos e os transcritos de Mir145 cerca de 425 genes alvos (WONG e WANG, 2014).

*Endereço para correspondência:
raquel.martins@aluno.uece.br

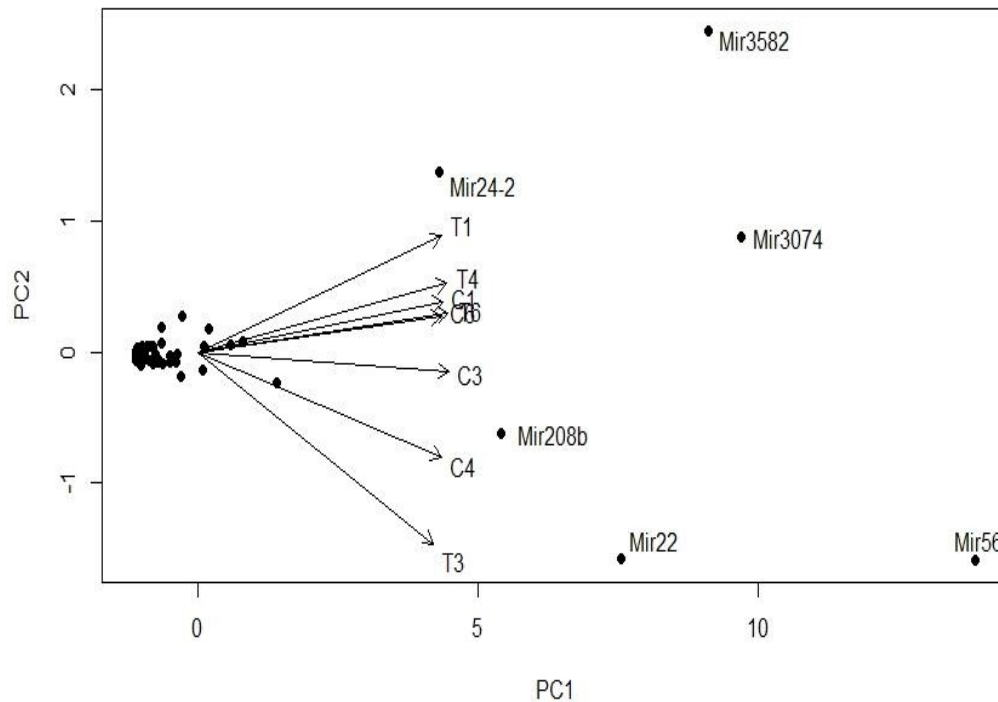


Gráfico 1: PCoA dos miRNAs diferencialmente expressos nas análises com PCoA.

CONCLUSÕES

No presente estudo foram identificados dois miRNAs, diferencialmente expressos, no exercício agudo extenuante em ratos. Esses microRNAs atuam regulando muitos genes que podem atuar em vias metabólicas moduladas pela atividade física. Estudos moleculares, como este, podem contribuir para o entendimento da fisiologia do exercício extenuante.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, M.S.; KUNKEL, L.M. Skeletal muscle microRNAs: their diagnostic and therapeutic potential in human muscle diseases. *Journal of Neuromuscular Diseases*, v.2, n.1, p.1-11, 2015.
- ANDERSON, M.; GORLEY, R.; CLARKE, R. *Permanova. Permutational multivariate analysis of variance, a computer program* Department of Statistics. University of Auckland, v.24, 2005.
- ARDEKANI, A.M.; NAEINI, M.M. The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, v.2, n.4, p.161, 2010.
- BHAYANI, M.K.; CALIN, G.A.; LAI, S.Y. Functional relevance of miRNA* sequences in human disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v.731, n.1, p.14-19, 2012.

*Endereço para correspondência:
raquel.martins@aluno.uece.br

- BOOTH, F.W.; CHAKRAVARTHY, M.V.; SPANGENBURG, E.E. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *The Journal of Physiology*, v.543, n.2, p.399-411, 2002.
- BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, v.27, n.4, p.325-349, 1957.
- DINIZ, G.P.; WANG, D.Z. Regulation of skeletal muscle by microRNAs. *Comprehensive Physiology*, v.6, n.3, p.1279-1294, 2011.
- GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, v.53, n.3-4, p.325-338, 1966.
- HARGREAVES, M.; CAMERON-SMITH, D. Exercise, diet, and skeletal muscle gene expression. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.34, n.9, p.1505-1508, 2002.
- KIRBY, T.J.; CHAILLOU, T.; MCCARTHY, J.J. The role of microRNAs in skeletal muscle health and disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, v.20, p.37, 2015.
- LENG, N. et al. EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNAseq experiments. *Bioinformatics*, v.29, n.8, p.1035-1043, 2013.
- LOMBARDI, G. et al. Circulating miRNA as fine regulators of the physiological responses to physical activity: Pre-analytical warnings for a novel class of biomarkers. *Clinical biochemistry*, v.49, n.18, p.1331-1339, 2016.
- POLAKOVIČOVÁ, M. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of exercise response. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n.10, p.1553, 2016.
- SOCI, U.P.R. et al. Exercise Training and Epigenetic Regulation: Multilevel Modification and Regulation of Gene Expression. In: *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment*. Springer, Singapore, p.281-322, 2017.
- WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *Journal of cellular physiology*, v.231, n.1, p.25-30, 2016.
- WONG, N.; WANG, X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*, v.43, n.1, p.146-152, 2014.