

ANÁLISE DE microRNA NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO E SEUS ALVOS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Introdução

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma desordem heterogênea e multifatorial caracterizada por dificuldades na interação e comunicação social e repertório restrito de interesses e atividades. A etiologia do TEA ainda é desconhecida, porém alguns fatores ambientais, como a exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA), contribuem para aumentar o risco do desenvolvimento do transtorno. Dessa maneira, a exposição pré-natal ao VPA é um método validado para indução de modelo animal de TEA.

Os microRNA (miRNA) compreendem um grupo de pequenos RNA não-codificantes que atuam como reguladores de diversos processos biológicos através da repressão da tradução de RNA mensageiros. Níveis alterados de alguns miRNA podem estar envolvidos com alterações proteicas presentes no TEA.

Tanto em pacientes como em modelos animais de TEA, foram relatadas alterações dos componentes da matriz extracelular (MEC), o que pode estar relacionado com alterações nos níveis de miRNA que regulam tais componentes.

Objetivo

Analisar o perfil de expressão de um conjunto de miRNA no sangue total no modelo animal de TEA e buscar alvos que estejam relacionados à matriz extracelular possivelmente associados com esse transtorno.

Método

Ratas Wistar prenhes receberam uma única injeção intraperitoneal (600 mg/kg) de VPA ou salina no dia embrionário 12,5 (E12,5), formando os grupos experimentais



Aos 30 dias pós-natal (P30), o sangue dos filhotes machos foi homogeneizado em reagente Trizol® e foi realizada a extração de RNA total. Na sequência, foi realizada a transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real, utilizando o método -ΔΔCt para calcular a expressão relativa dos miRNA selecionados neste estudo. Foram realizados testes t de Student, com p<0,05 para determinar a diferença significativa nos níveis de miRNA entre os dois grupos.

Resultados e Discussão

O programa GeNorm elencou miR181a-5p, miR181b-5p, miR124-5p, miR195-5p, miR132-3p e miR198-5p como os mais estáveis, sendo esses considerados os normalizadores. A expressão relativa do miR138-5p aumentou cinco vezes no grupo VPA, enquanto as expressões de miR199a-5p, miR125a-5p e miR25-3p aumentaram aproximadamente duas vezes (Figura 1). As alterações causadas pelo VPA nos níveis de miRNA podem estar relacionadas com algumas alterações da matriz extracelular (Figura 2). A reelina, um componente alterado no TEA, é um alvo validado do miR138-5p nos humanos e predito em ratos (Tabela 1), sua redução pode estar relacionada com neurogênese e migração celular alterados no TEA. Além disso, integrina α-5 é um alvo predito de miR25-3p em humanos. A MMP-9 é um alvo validado para miR125a-5p em ratos e possui papel importante sobre a morfologia e funcionamento de espinhos dendríticos (Figura 3). Modificações estruturais de espinhos dendríticos e da plasticidade sináptica devido a alterações dos níveis desses miRNA podem estar envolvidos com alguns sintomas associados ao TEA.

Tabela 1. Alvos validados e preditos envolvidos na funcionalidade da MEC.

miRNA alterados	Alvos validados	Alvos preditos (ratos)
miR25-3p	ITGB1(h)	CD69, Itga5
miR125a-5p	COL4A1 (h), LAMB1 (h), Mmp9 (r)	Itga9
miR138-5p	RELN (h)	Plxn2, Reln
miR199a-5p	CD44(h)	CD27, Bcam, Lamc1, Itga8, Itag3

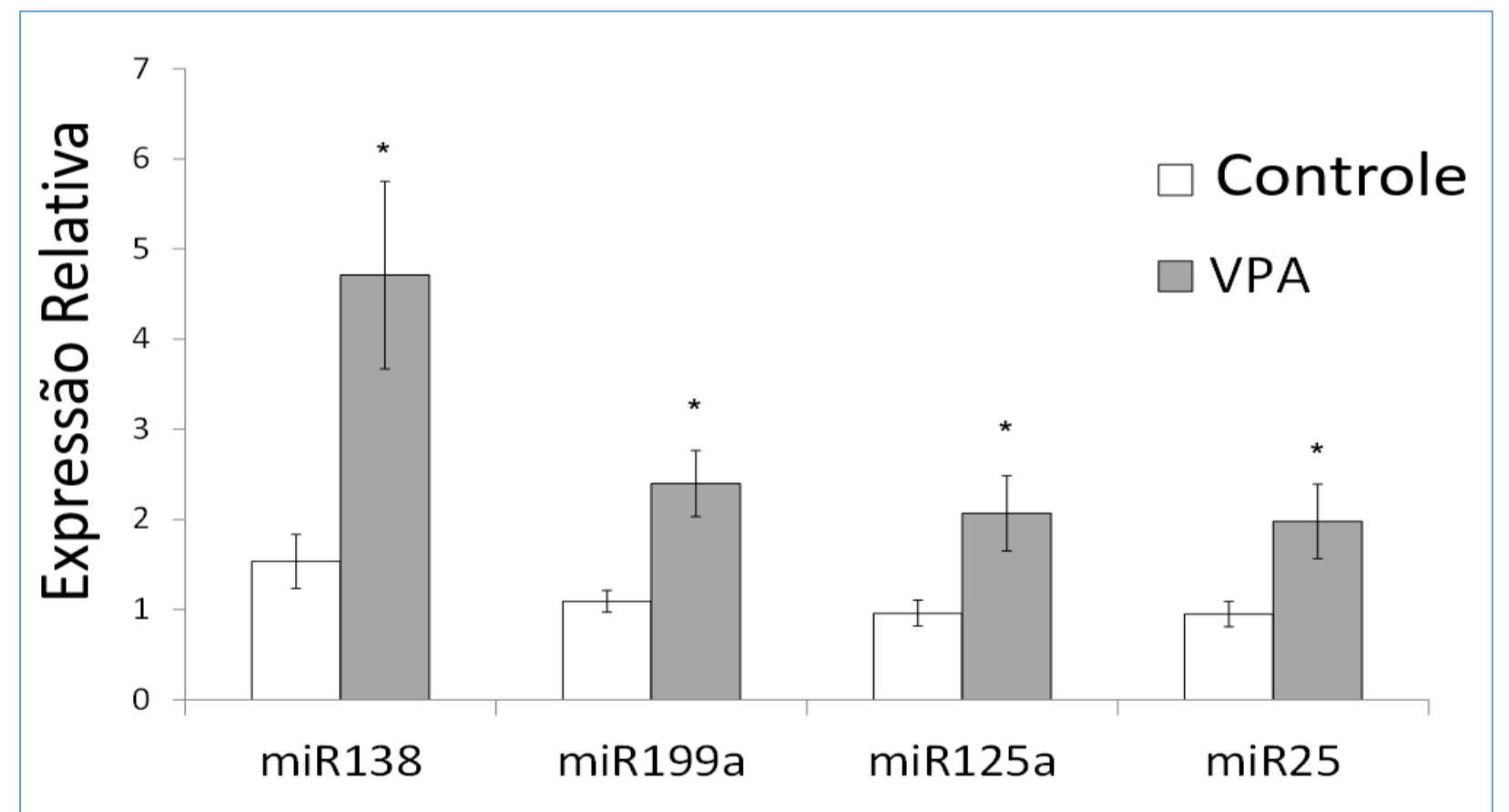


Figura 1. Expressão relativa de miR138-5p, miR199a-5p, miR125a-5p e miR25-3p no sangue de ratos de 30 dias expostos prenatalmente ao VPA comparado com grupo controle. Resultados expressos como média ± erro padrão. Análise Estatística teste t; *p < 0,05.

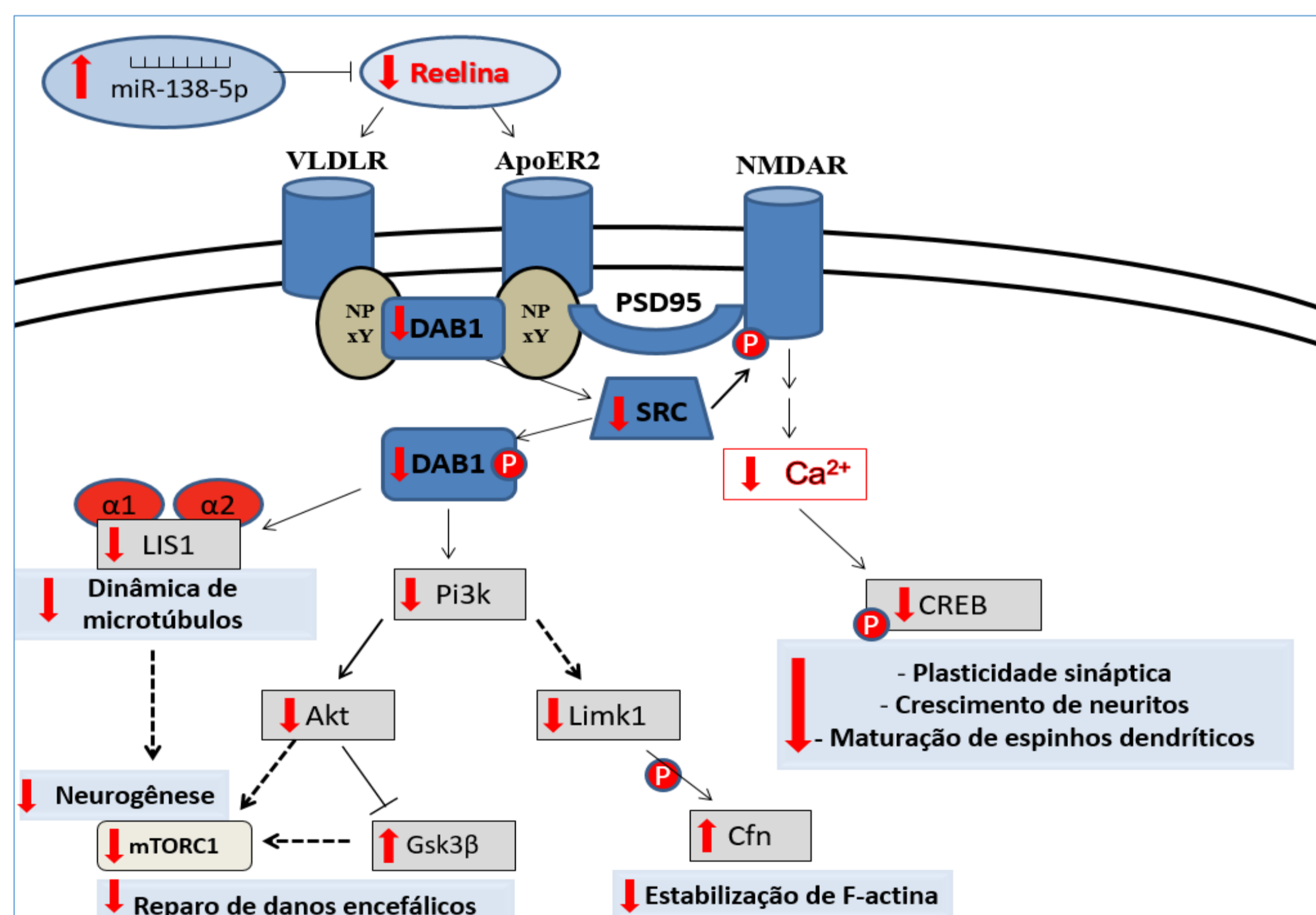


Figura 2. Vias regulatórias envolvidas pelo miRNA-138-5p no controle da sinalização dependente de reelina provavelmente alterada no TEA. Adaptado de Herz and Chen, *Nature Reviews Neuroscience*, 2006.

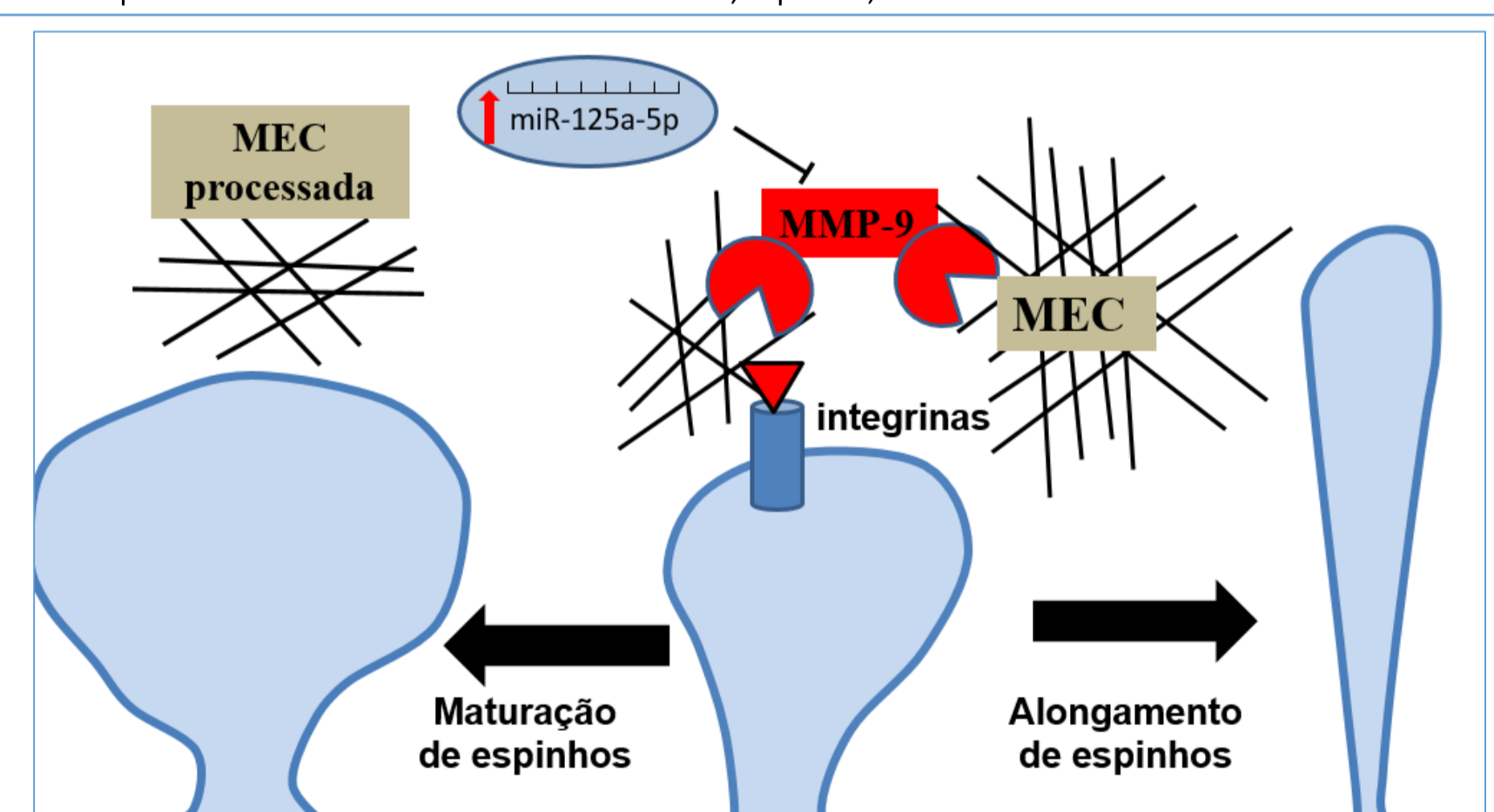


Figura 3. Envolvimento de miR-125a-5p nas mudanças morfológicas de espinhos dendríticos pela ação da MMP-9. Os níveis elevados de MMP-9 desencadeiam o alongamento e a diminuição da espessura de espinhos dendríticos durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Porém, em estágio adulto, a MMP-9 cliva proteínas desconhecidas da MEC liberando ligantes de integrinas que induzem o alargamento de espinhos durante a LTP. Adaptado de Levy *et al.*, *Front. Neuroanat.*, 2014.

Conclusão

Os alvos moleculares dos miRNA avaliados nesse trabalho são correlacionados com disfunções celulares possivelmente envolvidas na fisiopatologia do TEA, incluindo alteração da neurogênese, migração celular e maturação dos espinhos dendríticos. Nosso estudo sugere que o perfil de expressão de miRNA pode ser uma importante ferramenta para conduzir a identificação de defeitos funcionais e de sinalização da matriz extracelular provavelmente alterados no TEA.

Referências

- Bambini-Junior V. *et al.* *Brain Research*. 2011, 1408(0):8-16.
 Schneider, T. *et al.* *Neuropsychopharmacology*,. 2005. 30, pp. 80-89
 Ambros V. *Nature* 2004, 431(7006):350-355.
 Bartel, D.P., *Cell*. 2009. 136, 215-233
 Schmitt, G.M. *et al.* *Nature*. 2006. 439, 283-9.
 Chen, C. *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2005. 33, pp. e179-e179.
 Herz and Chen. *Nature Reviews Neuroscience* 2006. 7, :850-859
 Levy *et al.*, *Front. Neuroanat.* 2014. 8:16