



# EXPRESSION DE MICRORNAS NA FIBRILHAÇÃO AURICULAR: CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO E AVALIAÇÃO DA REPERCUSSÃO FISIOPATOLÓGICA

Nuno Cortez-Dias<sup>1</sup>, Marina Costa<sup>4</sup>, Rita Carvalho<sup>4</sup>, Andreia Magalhães<sup>1</sup>, Gustavo Silva<sup>1</sup>, Carina Calisto<sup>2</sup>, Xavier Galego<sup>3</sup>, Ricardo Arruda Pereira<sup>3</sup>, Luís Carpinteiro<sup>1</sup>, João de Sousa<sup>1</sup>, Ângelo Nobre<sup>3</sup>, Fausto J. Pinto<sup>1</sup>, Francisco J. Enguita<sup>4</sup>

1 - Serviço de Cardiologia; 2 - Serviço de Patologia Clínica; 3 - Serviço de Cirurgia Cardiorádica, Hospital de Santa Maria (CHLN); 4 - Unidade de Biologia Celular, Instituto de Medicina Molecular (FML-UL)

## INTRODUÇÃO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificante que intervêm na regulação pós-transcricional da expressão génica

Estudos recentes têm implicado os miRNAs na fisiopatologia de doenças cardíacas, incluindo nos mecanismos de remodelagem eléctrica. Desconhece-se o seu envolvimento na fisiopatologia da fibrilhação auricular (FA)

## OBJECTIVOS

Investigar a participação dos miRNAs na fisiopatologia da FA através da comparação do padrão global de expressão de miRNA em função do ritmo e do volume auricular esquerdo .

## MÉTODOS

Análise do transcriptoma em amostras teciduais da aurícula esquerda colhidas durante cirurgia cardíaca: 5 com FA permanente, 5 com FA paroxística e 8 sem história de distritmia auricular.

	FA permanente	FA paroxística	Ritmo sinusal
Sexo	3 (60%)	2 (40%)	4 (50%)
Idade (anos)	75 (65-78)	73 (67-75)	63 (49-70)
Fatores de risco CV			
Hipertensão	3 (75%)	3 (60%)	5 (62%)
Diabetes mellitus	0	0	1 (12%)
Dilatação	3 (75%)	2 (40%)	5 (62%)
Doenças valvulares (gravidade > mod)			
Regurg. aórtica	0	0	3 (38%)
Regurg. mitral	4 (80%)	5 (100%)	6 (75%)
Estenose mitral	2 (40%)	1 (20%)	2 (25%)
Regurg. tricúspide	3 (60%)	0	1 (12%)
Dimensões cardíacas			
Volume AE (mL)	228 (132-278)	139 (134-152)	92 (80-103)
Volume AD (mL)	63 (57-67)	44 (38-48)	38 (29-44)
Volume VE (mL)	200 (171-230)	103 (93-104)	80 (79-100)

- Extracção do RNA (RNeasy Mini kit, QIAGEN)
- Avaliação da qualidade do RNA extraído (método RNA Integrity Number)
- Isolamento dos RNAs de "pequena dimensão"
- Sequenciação directa dos miRNAs de cada amostra (Next-Generation Sequencing com recurso à plataforma Illumina HiSeq 2500)
- Identificação dos miRNAs sequenciados pela análise de emparelhamento das suas sequências de nucleótidos com a biblioteca do genoma humano (miRBase 20) através do programa sRNAbench

## RESULTADOS

- Identificaram-se 2.514 miRNAs nas amostras de tecido auricular, tendo os 40 miRNAs mais abundantes representado 90% da quantidade total.
- 431 miRNAs apresentaram expressão  $\geq 10$  RPM, tendo constituído o objecto de estudo nas análises seguintes.

## 1. Comparação do perfil de expressão de miRNAs em função do ritmo cardíaco e volume auricular esquerdo

- Identificaram-se 42 miRNAs diferencialmente expressos no contexto de FA, exibindo simultaneamente variação da sua expressão com o ritmo cardíaco e correlação com o volume auricular esquerdo (vAE).
- Incluíram 6 miRNAs *down-regulated* (miR-135a-5p, miR-152-3p, miR-26a-5p, miR-28-5p, miR-301a-5p, miR-454-3p), estando os restantes *up-regulated*.
- Destacou-se o miR-891a, cujos níveis teciduais diferiram de forma significativa em função do ritmo cardíaco e exibiram correlação positiva forte com o vAE.

Figura 1. Associação dos níveis de expressão dos diferentes miRNAs ao ritmo cardíaco (testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) e correlação com o volume auricular esquerdo (testes de Pearson e Spearman).

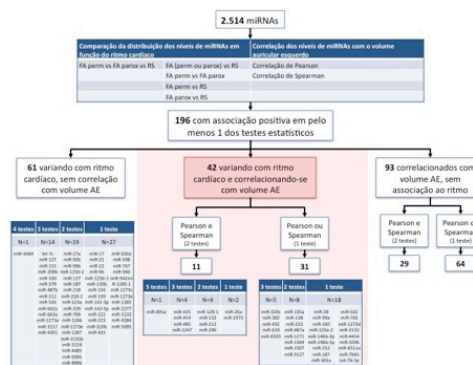
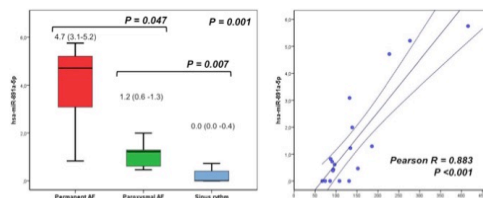


Figura 2. Distribuição dos níveis teciduais de miR-891a em função do ritmo cardíaco e sua correlação com o volume auricular esquerdo.



## 2. Análise dos genes-alvo previstos (mRNA/genos) dos 42 miRNAs diferencialmente expressos no contexto de FA

- Efectuou-se a predição bioinformática dos genes-alvo (miRWalk), identificando-se 13.542 genes de interesse num total de 29.641 interações miRNA/geno alvo.
- Atendendo a que acção dos miRNAs é redundante, é expectável que vários miRNAs diferencialmente expressos actuem em simultâneo sobre os genes-alvo biologicamente relevantes.
- 23 dos genes foram alvos simultâneos de pelo menos 9 dos miRNAs diferencialmente expressos, sugerindo a sua potencial relevância.

Figura 3. Diagrama de interações miRNA /genes-alvo. Os losângulos à periferia representam os 42 miRNAs e as bolas representam os seus genes-alvo distribuídos em círculos concêntricos de acordo com o número de miRNA de que presumivelmente são alvos: 1-7 no caso do círculo mais periférico; 8 para o círculo seguinte; 9 para o círculo mais interno; 10 para o círculo arco central e 11 para as duas bolas maiores à sua direita

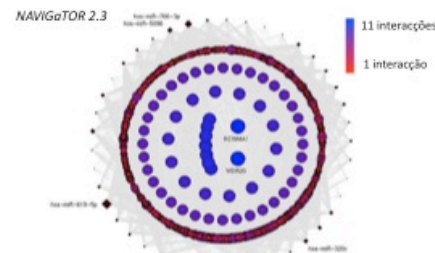


Tabela 2. Genes que constituíram alvos previstos simultâneos de  $\geq 9$  miRNAs e com acção biológica relacionável com a remodelagem eléctrica ou estrutural associada à FA

Gene	Acção biológica conhecida
KCNMA1	Canal de grande condutância de K <sup>+</sup> activado pelo Ca <sup>2+</sup> . Envolvido na regulação da excitabilidade celular e do automatismo do nódo sinusal
TAB1	Cinase ativadora de TGF $\beta$ 1. Reguladora da MAPK38 e da MAP3K7, mediando cascatas de sinalização intracelular induzidas pelo TGF $\beta$
PPM1B	Fosfatase de proteínas dependente de Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> . Reguladora negativa de vias de resposta ao stress - TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B
ARSB	Arissulfatase B. Degradação de glicosaminoglicanos nos lisossomas
TCF21	Factor de transcrição 21. Associado a vias de morfogénese cardíaca e de transdução do sinal MAPK
ASPH	Beta-hidroxilase de aspartato. Proteína junção do retículo sarcoplasmático, envolvida na homeostasia do Ca <sup>2+</sup> intracelular

## 3. Análise dos efeitos biológicos potenciais dos genes-alvo previstos (Ontology Analysis)

- Os alvos génicos potenciais identificados estão fortemente associados à regulação dos fluxos iónicos celulares, contração muscular, vias de sinalização celular, funções de organização e programação celular, resposta inflamatória e propensão trombótica.
- Incluíram genes reconhecidamente envolvidos na síndrome do QT longo, miocardiopatia dilatada, distúrbios eléctricos neurológicos, diabetes mellitus e trombofilias.

Figura 4. Diagramas de interações representando os genes-alvo previstos dos miRNAs diferencialmente expressos, qualificados com base na sua função celular identificada por análise de ontologia génica.

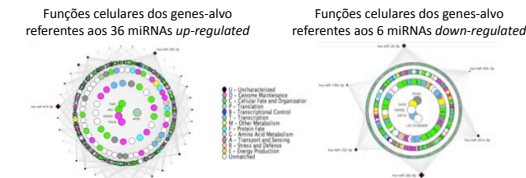
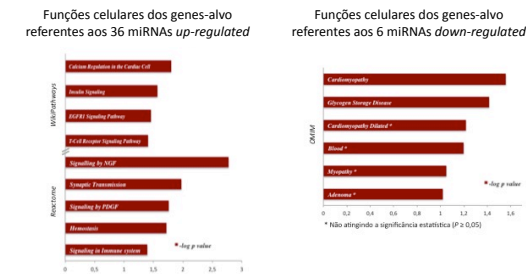


Figura 5. Comparação da proporção de genes-alvo relativos a cada via biológica com a sua proporção global no genoma humano (Enrichr), considerando apenas os alvos génicos previstos de pelo menos 2 dos miRNAs diferencialmente expressos.



## CONCLUSÕES

- A fibrilhação auricular e a dilatação auricular esquerda acompanham-se de modificações do perfil global de expressão de miRNAs.
- Identificámos um grupo de 42 miRNAs diferencialmente expressos com genes-alvo previstos potencialmente relevantes, o que sugere a implicação de alterações da regulação pós-transcricional da expressão génica na fisiopatologia desta arritmia.