

PERFIL DE MICRORNAS SÉRICOS EM CAMUNDONGOS INDUZIDOS A ESTROPAUSA RECEBENDO TERAPIA ESTROGENICA

BIANKA M. ZANINI¹; BIANCA M. DE AVILA²; DRIELE N. GARCIA³; JÉSSICA D. HENSE⁴; FABIÓLA G. DOS SANTOS⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – bianca_avila@ymail.com

³Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - fabiola.nutri2011@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – augusto.schneider@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de microRNAs (miRNAs) e seus mecanismos de ação ampliou e esclareceu a compreensão da regulação gênica. Eles são uma classe de reguladores epigenéticos, pequenos RNAs não codificantes, que se ligam aos seus mRNAs alvo levando ao silenciamento do RNA e supressão da tradução (McGinnis, Luense et al. 2015). Os miRNAs podem ser secretados em fluidos extracelulares e transportados para células-alvo por meio de vesículas, como exossomos (Makarova, Shkurnikov et al. 2016). Os miRNAs extracelulares funcionam como mensageiros químicos para mediar a comunicação célula-célula similarmente a hormônios endócrinos e abrem muitas possibilidades em termos de terapia com miRNAs (Fu, Ye et al. 2013).

Recentemente, a sensibilidade da regulação dos miRNAs ao estrogênio em diferentes tipos celulares foi demonstrada em alguns estudos (Gómez-Gómez, Organista-Nava et al. 2016, Jiang, Li et al. 2016, Micheli, Palermo et al. 2016). Isto torna os miRNAs diretamente influenciados pela menopausa. Um estudo demonstrou que miRNAs específicos diferiram com a idade em mulheres, incluindo miR-21 e miR-146^a (Kangas, Pöllänen et al. 2014). Os dados deste estudo sugerem que o estradiol pode ser um mediador da mudança no conteúdo de miRNA nos exossomos que, por sua vez, está associado à mudança no estado metabólico de saúde.

Os níveis de estrogênio reduzem drasticamente no momento da menopausa em mulheres, sendo sua reposição o único tratamento aprovado que alivia o amplo espectro de sintomas associados a menopausa (Baber, Panay et al. 2016). Porém os riscos e benefícios desta terapia ainda são controversos. A grande maioria das mulheres passa por uma transição natural para menopausa, restando o tecido ovariano inativo. No entanto, os modelos para indução desta condição em roedores são limitados. Uma possibilidade é a remoção cirúrgica dos ovários e a outra é o uso do composto 4-Diepóxido de vinilciclohexeno (VCD), que leva à falha gradual da função ovariana (Kappeler and Hoyer 2012). Isto resulta em animais depletados de folículos, mas que retêm o tecido ovariano residual, assim como ocorre em mulheres na menopausa.

Baseado nisso, o objetivo deste estudo foi identificar o perfil de miRNA séricos em camundongos induzidos a estropausa recebendo estradiol.

2. METODOLOGIA

O experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o número 0902860. Os camundongos (n=31), todos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 60 dias de idade, foram divididos em três grupos e mantidos sob condições controladas de temperatura e luz. Para realização do tratamento hormonal, 21 fêmeas foram tratadas diariamente com injeção intraperitoneal de VCD (160 mg/kg) durante 20 dias para induzir estropausa, enquanto que 10 fêmeas receberam placebo (óleo de gergelim) na mesma frequência. As 21 fêmeas que receberam VCD, foram divididas em grupo VCD controle (n=10) e VCD estradiol (n=11), que 61 dias após o final do tratamento com VCD, receberam placebo ou β -estradiol (5 μ g/kg; E8875-250mg, Sigma) dissolvido em óleo de gergelim, aplicado com injeções subcutâneas três vezes por semana, durante 90 dias. Para confirmar que os animais estavam em menopausa, 60 dias após o fim das injeções com VCD foi realizado citologia vaginal diariamente por um período de 5 dias e a menopausa foi confirmada pela não progressão do ciclo estral.

O sequenciamento dos miRNAs foi realizado a partir de exossomos extraídos do soro no momento da eutanásia. O RNA foi processado para construir bibliotecas de miRNA, sequenciado e analisado. A quantificação das bibliotecas foi realizada usando cutadapt e bowtie. miRNAs expressos diferencialmente foram analisadas usando Edge no software R. A análise funcional foi realizada utilizando Diana-TaRBase v.7.0 e miRPath v.3.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A menopausa foi confirmada pela aciclicidade e redução acentuada do número de folículos primordiais ($p < 0.001$). Detectamos um total de 402 miRNAs no soro dos animais CTL, VCD e VCD+E2. Os 10 miRNAs mais expressos no soro foram: miR-191-5p, miR-107-3p, miR-103-3p, miR-221-3p, miR-320-3p, miR-451a, miR-93-5p, mmu-let-7b-5p, miR-423-5p, miR-17-5p. Entre os miRNAs, diferentemente expressos: miR-200a-3p ($p=0.01$; FC=2.53) e 200b-3p ($p=0.003$; FC=2.14) regulados positivamente. Enquanto miR-5129-5p ($p=0.04$; FC=0.71), miR-874-3p ($p=0.00$; FC=0.61), miR23a-5p ($p=0.02$; FC=0.46), miR24-1-5p ($p=0.00$; FC=0.33), miR5107-5p ($p=0.04$; FC=0.22) e miR-6950-3p ($p=0.02$; FC=0.13) regulados negativamente no grupo VCD em comparação com fêmeas do grupo CTL. Esses miRNAs regulados negativamente não diferiram entre VCD-E2 e fêmeas CTL, indicando que E2 normaliza seus níveis. As regiões regulatórias de miR-23a contêm locais de ligação ao E2 (Huang, Wong et al. 2015). O fato de alguns miRNAs membros da família Let-7 serem induzidos por E2 é interessante e sugere que uma via comum está envolvida na expressão e ou processamento (Ma, Shen et al. 2021).

No entanto, o miR-122-5p ($p=0.00$; FC=0.72) e o miR-1843-5p ($p=0.03$; FC=0.56) foram regulados negativamente no VCD-E2 em comparação com o VCD e o grupo CTL. miR-200a-3p e miR-200b-3p estão relacionados ao câncer de ovário (2020) e são regulados pelo estradiol. miR-370-3p foi regulado positivamente em VCD-E2 e VCD.

Até agora, não havia evidências diretas sobre a relação desses miRNAs diferencialmente expressos em modelos de menopausa e terapia estrogênica em animais. O que temos na literatura são que os miRNAs são abundantes nos ovários humanos, camundongos e vacas, e desempenham um papel potencial na função ovariana (Ro, Park et al. 2007, Hossain, Ghanem et al. 2009, Sirotkin, Lauková et al. 2010). O que alguns autores sugerem é que os miRNAs podem controlar as funções reprodutivas pela liberação aumentada ou inibida de progesterona,

andrógeno e estrogênio em células de granulosa em humanos (Azhar, Dong et al. 2020).

A desregulação da expressão de miRNAs é observada em várias doenças incluindo câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos. Estas doenças são reincidentes em mulheres pós-menopausa. Assim como observamos miR-200a-3p e miR-200b-3p regulados positivamente (Kim and You 2022) comparando camundongos jovens e velhos também obteve o mesmo resultado. Esses miRNAs estão envolvidos na foliculogenese e esteroidogenese (Li, Fang et al. 2015). A família miR-200 é uma dos vários miRNAs que foram estudados para o diagnostico e prognostico de câncer de ovário e mama (Li, Fang et al. 2015). No tecido ovariano, os miR-200 são geralmente regulados positivamente em tumores ovarianos em comparação com o tecido ovariano normal (Choi and Ng 2017), o que vai de acordo com nossos resultados apresentados. Os níveis de expressão podem ser variáveis de acordo com os subtipos histológicos e estágios do câncer de ovário.

(Taylor and Gercel-Taylor 2008) assim como nós, utilizando exossomos, relataram que os níveis exossomáticos de miR-200 eram mais elevados em soros de pacientes com câncer de ovário do que em amostras de controles benignos. Em outro estudo, (Kobayashi, Salomon et al. 2014) comparou a abundância de miR-200 em exossomos produzidos por duas linhagens celulares com diferentes capacidades invasivas. As células SKOV-3 mais invasivas liberaram 2,7 vezes mais os exossomos quando comparadas as células OVCAR-3 menos invasivas, e as transcrições de miR-200s foram identificadas apenas nas células OVCAR-3 e seus exossomos. Com o envolvimento de apenas duas linhagens celulares. O estudo de Kobayashi não é conclusivo para associar a relação entre a invasão celular do câncer de ovário com o conteúdo de miR-200 nos exossomos secretados. Tomados em conjunto, os estudos atuais mostraram resultados promissores para os níveis séricos ou plasmáticos de miR-200 como biomarcadores diagnósticos e prognósticos.

4. CONCLUSÕES

Esses resultados sugerem que a menopausa tem impacto no perfil de miRNAs nos exossomos séricos. Estes miRNAs podem ser candidatos a uma nova terapia de substituição em mulheres na pos menopausa, a fim de reverter os efeitos negativos da menopausa na saúde da mulher.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (2020). "microRNA as Biomarker in Ovarian Cancer Management: Advantages and Challenges." DNA and Cell Biology **39**(12): 2103-2124.
- Azhar, S., D. Dong, W. J. Shen, Z. Hu and F. B. Kraemer (2020). "The role of miRNAs in regulating adrenal and gonadal steroidogenesis." J Mol Endocrinol **64**(1): R21-r43.
- Baber, R. J., N. Panay and A. Fenton (2016). "2016 IMS Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy." Climacteric **19**(2): 109-150.
- Choi, P. W. and S. W. Ng (2017). "The Functions of MicroRNA-200 Family in Ovarian Cancer: Beyond Epithelial-Mesenchymal Transition." Int J Mol Sci **18**(6).
- Fu, G., G. Ye, L. Nadeem, L. Ji, T. Manchanda, Y. Wang, Y. Zhao, J. Qiao, Y. L. Wang, S. Lye, B. B. Yang and C. Peng (2013). "MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion." Hypertension **61**(4): 864-872.

- Gómez-Gómez, Y., J. Organista-Nava, R. Ocadiz-Delgado, E. García-Villa, M. A. Leyva-Vazquez, B. Illades-Aguilar, P. F. Lambert, A. García-Carrancá and P. Gariglio (2016). "The expression of miR-21 and miR-143 is deregulated by the HPV16 E7 oncoprotein and 17 β -estradiol." *Int J Oncol* **49**(2): 549-558.
- Hossain, M. M., N. Ghanem, M. Hoelker, F. Rings, C. Phatsara, E. Tholen, K. Schellander and D. Tesfaye (2009). "Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary." *BMC Genomics* **10**(1): 443.
- Huang, F. Y., D. K. Wong, W. K. Seto, C. L. Lai and M. F. Yuen (2015). "Estradiol induces apoptosis via activation of miRNA-23a and p53: implication for gender difference in liver cancer development." *Oncotarget* **6**(33): 34941-34952.
- Jiang, C. F., D. M. Li, Z. M. Shi, L. Wang, M. M. Liu, X. Ge, X. Liu, Y. C. Qian, Y. Y. Wen, L. L. Zhen, J. Lin, L. Z. Liu and B. H. Jiang (2016). "Estrogen regulates miRNA expression: implication of estrogen receptor and miR-124/AKT2 in tumor growth and angiogenesis." *Oncotarget* **7**(24): 36940-36955.
- Kangas, R., E. Pöllänen, M. R. Rippo, C. Lanzarini, F. Prattichizzo, P. Niskala, J. Jylhävä, S. Sipilä, J. Kaprio, A. D. Procopio, M. Capri, C. Franceschi, F. Olivieri and V. Kovanen (2014). "Circulating miR-21, miR-146a and Fas ligand respond to postmenopausal estrogen-based hormone replacement therapy--a study with monozygotic twin pairs." *Mech Ageing Dev* **143-144**: 1-8.
- Kappeler, C. J. and P. B. Hoyer (2012). "4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity." *Syst Biol Reprod Med* **58**(1): 57-62.
- Kim, J. and S. You (2022). "Comprehensive analysis of miRNA-mRNA interactions in ovaries of aged mice." *Anim Sci J* **93**(1): e13721.
- Kobayashi, M., C. Salomon, J. Tapia, S. E. Illanes, M. D. Mitchell and G. E. Rice (2014). "Ovarian cancer cell invasiveness is associated with discordant exosomal sequestration of Let-7 miRNA and miR-200." *Journal of Translational Medicine* **12**(1): 4.
- Li, Y., Y. Fang, Y. Liu and X. Yang (2015). "MicroRNAs in ovarian function and disorders." *Journal of Ovarian Research* **8**(1): 51.
- Ma, Y., N. Shen, M. S. Wicha and M. Luo (2021). "The Roles of the Let-7 Family of MicroRNAs in the Regulation of Cancer Stemness." *Cells* **10**(9).
- Makarova, J. A., M. U. Shkurnikov, D. Wicklein, T. Lange, T. R. Samatov, A. A. Turchinovich and A. G. Tonevitsky (2016). "Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role." *Prog Histochem Cytochem* **51**(3-4): 33-49.
- McGinnis, L. K., L. J. Luense and L. K. Christenson (2015). "MicroRNA in Ovarian Biology and Disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**(9): a022962.
- Micheli, F., R. Palermo, C. Talora, E. Ferretti, A. Vacca and M. Napolitano (2016). "Regulation of proapoptotic proteins Bak1 and p53 by miR-125b in an experimental model of Alzheimer's disease: Protective role of 17 β -estradiol." *Neurosci Lett* **629**: 234-240.
- Ro, S., C. Park, D. Young, K. M. Sanders and W. Yan (2007). "Tissue-dependent paired expression of miRNAs." *Nucleic Acids Research* **35**(17): 5944-5953.
- Sirotkin, A. V., M. Lauková, D. Ovcharenko, P. Brenaut and M. Mlynec (2010). "Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis." *J Cell Physiol* **223**(1): 49-56.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "RETRACTED: MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." *Gynecologic Oncology* **110**(1): 13-21.