

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

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

¹*Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – bianca_avila@ymail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – drieka_neske@yahoo.com.br*

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de microRNAs (miRNAs) e seus mecanismos de ação ampliou e esclareceu à 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, retendo 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 retém 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 µg/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 estrogénica 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, Sirotnik, 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 estrogénio 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 esteroidogênese (Li, Fang et al. 2015). A família miR-200 é uma das vários miRNAs que foram estudados para o diagnóstico e prognóstico 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 exossómicos 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 exossomas 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-Aguiar, 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. Mlyncek (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.