

PROSPECÇÃO DE miRNAs DE INTERESSE NA REPRODUÇÃO EQUINA

ALESSANDRA NEIS¹; FREDERICO SCHMITT KREMER²; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON¹

¹Grupo de Pesquisa em Genômica de Equinos (UFPEL) – alessandra_neis@hotmail.com

²Laboratório de Bioinformática e Proteômica (UFPEL) – fred.s.kremer@gmail.com

¹Grupo de Pesquisa em Genômica de Equinos (UFPEL) – primleon@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A da reprodução equina alavancou pesquisas com intuito de obter novos marcadores, testes de diagnóstico e novas biotécnicas, devido à uma importância do animal como indivíduo e valorização do mérito genético. A infertilidade, principalmente em éguas, representa um enorme desafio, tanto pela quantidade de disfunções relatadas (SNIDER, 2015) quanto pela complexidade genômica que possa estar envolvida. Algumas desordens reprodutivas de relevância em éguas são abortos, endometrites, disfunções ovarianas como folículos anovulatórios e cistos ovarianos e/ou endometriais, que possuem causas diversas e, em alguns casos, desconhecidas.

Os micro-RNAs (miRNAs) são RNAs endógenos de fita simples contendo em torno de 25 nucleotídeos que possuem função regulatória pós-transcricional, afetando principalmente a tradução proteica (AMBROS, 2004). Além do papel regulatório em condições fisiológicas, essas moléculas têm perfil de expressão diferencial em diversas desordens. Em mulheres, camundongos e bovinos existe conhecimento já adquirido relacionando o papel dos miRNAs à reprodução e viabilidade folicular (LI et al., 2015). Casos de infertilidade referentes à doenças, como síndrome do ovário policístico (SOP) (ROTH et al., 2014), endometriose (BURNEY et al., 2009) e falência ovariana prematura (FOP) (GUO; SUN; LAI, 2017), e falhas recorrentes da fertilização *in vitro* (KARAKAYA et al., 2015), já possuem relatos da influência dos miRNAs.

Os estudos experimentais com miRNAs em éguas fornecem dados apenas sobre folículos anovulatórios (DONADEU; SCHAUER, 2013), sendo os demais relacionados à fisiologia da ovulação, maturação e viabilidade folicular (SCHAUER et al., 2013). Assim, visto que é possível transpor dados já disponíveis de outras espécies, o presente trabalho tem como objetivo identificar novos miRNAs relacionados à infertilidade em éguas, a fim de ampliar a relação entre a genômica das desordens que afetam as fêmeas e sua relação com a capacidade reprodutiva.

2. METODOLOGIA

Para a busca dos miRNAs, foi realizada uma pesquisa no banco de dados Pubmed NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), relacionando aos dados obtidos experimentalmente em humanos, camundongos, equinos, bovinos e ovinos. A seleção dos miRNAs foi baseada no seu envolvimento na viabilidade folicular e reprodutiva, visando as patologias como: cistos ovarianos e endometriais e folículos anovulatórios. Para isso, foram utilizadas diferentes combinações das palavras-chave: “ncRNA”, “anovulatory”, “infertility”, “fertility”, “cyst”, “follicle”, “equine”, “bovine”, “human”, “women”, “ovine”, “murine”, “reproduction”, “disorder”.

Os ncRNAs que tem relação com os problemas de fertilidade foram elencados por sua função, gene-alvo relatado e espécie. O gene-alvo e sua função foram buscados no banco de dados GeneCards (SAFRAN et al., 2010). Tais dados servirão para verificar a compatibilidade de ncRNAs de outras espécies com os

equinos, trazendo a possibilidade de catalogar quais podem ter relação com a fertilidade e suas desordens, porém, muitas vezes sua função ainda permanece desconhecida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises bioinformáticas do genoma equino e da revisão de literatura na base de dados Pubmed NCBI, foram elencados os miRNAs que apresentaram maior potencial relacionado à fertilidade em éguas. Os miRNAs, seu gene-alvo e as espécies identificadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Seleção dos miRNAs de importância biológica na reprodução de fêmeas em diferentes espécies.

miRNA	Gene-alvo	Espécie	Referência
Família Let-7	MYC	<i>Homo sapiens</i>	LI et al., 2015
		<i>Ovis aries</i>	
		<i>Bos Taurus</i>	
		<i>Sus scrofa</i>	
mir-145	ACVR1, CCDN2	<i>Homo sapiens</i>	SIROTKIN et al., 2009; DONADEU; SCHAUER, 2013; MCBRIDE et al., 2012; HAILEMARIAM et al., 2014
		<i>Equus caballus</i>	
		<i>Ovis aries</i>	
		<i>Bos taurus</i>	
mir-125	AKT1, LIF, CDC25A, CDK6	<i>Homo sapiens</i>	SIROTKIN et al., 2009; MCBRIDE et al., 2012; HAILEMARIAM et al., 2014
		<i>Ovis aries</i>	
		<i>Bos taurus</i>	
mir-21	PTEN, RASA1, BTG2, FSHR, FMR1, FOXL2, FOXO3A, GDF9, NOBOX, OCT4, STAT3	<i>Homo sapiens</i>	KARAKAYA et al., 2015; DONADEU; SCHAUER, 2013; LI et al., 2015; MCBRIDE et al., 2012; HAILEMARIAM et al., 2014
		<i>Equus caballus</i>	
		<i>Mus musculus</i>	
		<i>Ovis aries</i>	
mi-503	AMH, INHBA, CYP17A1, CYP19A1, ZPS, GDF9, BMP15, CYCLIN D1, BCL-2, RAS, VEGF-A.	<i>Homo sapiens</i>	HIRAKAWA et al., 2016; SCHAUER et al., 2013; LI et al., 2015; MCBRIDE et al., 2012; HAILEMARIAM et al., 2014
		<i>Equus caballus</i>	
		<i>Mus musculus</i>	
		<i>Ovis aries</i>	
mir-23	STAR, CYP19A1, XIAP, CASP3	<i>Homo sapiens</i>	YANG et al., 2012; DONADEU; SCHAUER, 2013
		<i>Equus caballus</i>	

As desordens reprodutivas em éguas se dão por uma diversidade de fatores, sendo os aqui analisados: endometrite, desbalanceamento hormonal, cistos ovarianos ou endometriais e folículos anovulatórios. Visto a escassez de estudos em éguas (DONADEU; SCHAUER, 2013), ao comparar os miRNAs que atuam em disfunções reprodutivas de outras espécies, principalmente humanos e bovinos, é possível expandir a possibilidade de se encontrar biomarcadores.

3.1. let-7

A família de miRNAs let-7 foi uma das primeiras a serem descritas, e tem sua importância na reprodução por ser mais abundante no ovário de diversas espécies, embora em equinos ainda não tenham sido identificado experimentalmente (LI et al., 2015). Sua importância se dá pela manutenção das atividades ovarianas e foliculares e por ter diversos genes-alvo, sendo um deles o gene MYC, responsável pelo controle do ciclo celular.

3.2. mir-145

Este miRNA, mostrou-se diferencialmente expresso em casos de endometrite bovina (HAILEMARIAM et al., 2014), atuando na redução da liberação de progesterona nas células da granulosa em humanos (SIROTKIN et al., 2009), e foi

descrito em níveis elevados em folículos equinos subordinados e/ou anovulatórios (DONADEU; SCHAUER, 2013). Como genes-alvo, ACVR1 e CCDN2, o mir-145 tem papel crucial na transição G1/S do ciclo mitótico, especialmente em células da granulosa. O mir-145 foi selecionado por sua participação no ciclo celular, visto sua importância crucial no desenvolvimento folicular.

3.3. mir-125

O mir-125 apresentou expressão aumentada em casos de FOP (YANG et al., 2012), assim como em casos de SOP (ROTH et al., 2014). Em células da granulosa, relaciona-se ao estímulo à liberação de progesterona (SIROTKIN et al., 2009). Seus genes-alvo estão intimamente relacionados ao controle do ciclo celular (CDC25 e CDK6), inativação dos componentes apoptóticos (AKT1) e sinalização celular (LIF). Este miRNA destacou-se pela relevância nas atividades celulares mitóticas e apoptóticas, que uma vez prejudicadas trazem grande prejuízo ao desenvolvimento folicular.

3.4. mir-21

Este miRNA teve expressão diferencial detectada em casos de endometrite bovina (HAILEMARIAM et al., 2014), em mulheres com falhas recorrentes na fertilização *in vitro* (KARAKAYA et al., 2015) e apresentou-se elevado em folículos equinos anovulatórios (DONADEU; SCHAUER, 2013). Seus genes-alvo estão majoritariamente envolvidos na progressão do ciclo celular (GDF9, PTEN, BTG2, FOXO3, STAT3, OCT4, RASA1) e desempenham importante papel no desenvolvimento oocitário (GDF9, FHSR, FMR1, FOXL2 e NOBOX). O gene GDF9 possui maior influência sobre o desenvolvimento do folículo primordial, proliferação das células da granulosa e transição da fase G0/G1 para S e G2/M, também relacionado à SOP.

3.5. mir-503

O mir-503 mostrou expressão diferencial em casos de endometrite bovina (HAILEMARIAM et al., 2014), e suprimiu a proliferação das células em casos de endometriose (HIRAKAWA et al., 2016). Os genes-alvo deste miRNA estão relacionados à apoptose (BCL-2), controle do ciclo celular (CD1), tumorigênese, (RAS), proliferação vascular endotelial (VEGF-4), esteroidogênese (CYP19A1, CYP17A1, AMH, ZPS, INHBA) e desenvolvimento folicular (BMP15, ZPS, AMH). Sua ação na reprodução é de grande importância, influenciando o oócito e folículo em diversas etapas.

3.6. mir-23

Este miRNA induziu a apoptose das células de granulosa quando superexpresso em casos de FOP (YANG et al., 2012), assim como em folículos anovulatórios equinos, influenciando a qualidade, competência oocitária e síntese de esteróides (DONADEU; SCHAUER, 2013). Estas condições são comprovadas pelos genes afetados por esta molécula: CASP3 e XIAP relacionados a apoptose, e STAR e CYP19A1, à esteroidogênese, mostrando a importância de seu papel biológico e potencial utilização em estudos futuros.

Os miRNAs elencados demonstram potencial de biomarcadores para disfunções equinas uma vez que são relatados com frequência em distúrbios reprodutivos em outras espécies. Este estudo pode ser comprovado através de perfis transcriptômicos de miRNAs em éguas inférteis, como já é descrito para humanos (BURNEY et al., 2009) e bovinos (HAILEMARIAM et al., 2014). Outra possibilidade para a identificação de miRNAs é através de amostras biológicas, em um estudo caso-controle, ou de cultivo *in vitro* analisando a expressão de miRNAs em diferentes condições.

4. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos pelas análises bioinformáticas e nos bancos de dados, é possível delinear seis miRNAs de importância biológica para a reprodução de éguas, sendo estes: let-7, mir-145, -125, -21, -503 e -23. A partir disso, é enfatizada a relação entre a genômica e a infertilidade em éguas, já que muitos miRNAs descritos tem relação com enfermidades em outras espécies. Servindo de base para estudos futuros, será possível detectar novas causas genômicas associadas às falhas reprodutivas e obter potenciais biomarcadores da reprodução em fêmeas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–355, 16 set. 2004.
- BURNEY, R. O. et al. MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 625–631, 2009.
- DONADEU, F. X.; SCHAUER, S. N. Differential miRNA expression between equine ovulatory and anovulatory follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 45, n. 3, p. 122–125, 2013.
- GUO, Y.; SUN, J.; LAI, D. Role of microRNAs in premature ovarian insufficiency. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2017.
- HAILEMARIAM, D. et al. MicroRNA-regulated molecular mechanism underlying bovine subclinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 6, p. 898–913, 2014.
- HIRAKAWA, T. et al. MiR-503, a microRNA epigenetically repressed in endometriosis, induces apoptosis and cell-cycle arrest and inhibits cell proliferation, angiogenesis, and contractility of human ovarian endometriotic stromal cells. **Human Reproduction**, v. 31, n. 11, p. 2587–2597, 2016.
- KARAKAYA, C. et al. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 6, p. 1469–1476.e3, 2015.
- LI, Y. et al. MicroRNAs in ovarian function and disorders. **Journal of Ovarian Research**, 2015.
- MCBRIDE, D. et al. Identification of miRNAs associated with the follicular–luteal transition in the ruminant ovary. **REPRODUCTION**, v. 144, n. 2, p. 221–233, ago. 2012.
- ROTH, L. W. et al. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 3, p. 355–362, 2014.
- SAFRAN, M. et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2010, p. baq020, 5 ago. 2010.
- SCHAUER, S. N. et al. Involvement of miRNAs in equine follicle development. **Reproduction**, v. 146, n. 3, p. 273–282, 2013.
- SIROTKIN, A. V. et al. Identification of MicroRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 2, p. 415–420, maio 2009.
- SNIDER, T. A. Reproductive Disorders in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 389–405, 2015.
- YANG, X. et al. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. **REPRODUCTION**, v. 144, n. 2, p. 235–244, ago. 2012.