

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO PAPEL DE MICRORNAS NA REGULAÇÃO DO GENE IGF1 NA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Raquel Martins de FREITAS¹, Stela Mirla da Silva FELIPE¹ Francisca, Dalila Paiva Damasceno de LIMA¹, Tainá dos Santos CHAVES¹, Vitória Santos BEZERRA¹, Vânia Marilande CECCATTO¹

¹ Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará (ISCB/UECE), Av. Dr Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-Ce, CEP: 60.740-00; *E-mail: raquel.martins.rf@gmail.com

RESUMO

MicroRNAs (miRNA) são responsáveis pela regulação de uma grande variedade de processos biológicos através do silenciamento gênico pós transcricional. O gene IGF1 é correlacionado aos mecanismos de proliferação e crescimento, estando vinculado com desordens metabólicas como o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). A desregulação da expressão desse gene é correlacionada à ação de miRNAs. Ferramentas de predição de miRNAs simulam interações *in silico* através de dados estatísticos baseados em interações que ocorrem *in vivo*. O presente trabalho tem como objetivo avaliar através da predição *in silico* os miRNAs que apresentam maior probabilidade estatística de regular o gene IGF1 no contexto do DM2. Para realizar as predições foi utilizado a ferramenta de bioinformática miRabel, considerando prioritariamente miRNAs que apresentavam score < 0.05 e fossem validados em experimentos. A análise de predição resultou em um total de 1734 miRNAs, dos quais 99 estavam presentes em experimentos. Apenas quatro deles obtiveram score < 0.05, dos quais destacaram-se mir-130b-3p pelo melhor resultado estatístico e mir-29a-3p por estar relatado a sua interação com IGF1 em ensaios *in vitro*. Concluiu-se, que mir-130b-3p e mir-29a-3p são candidatos promissores para a regulação de IGF1 no contexto do DM2 pelo desempenho mostrado nas avaliações de predição e interação com vias metabólicas específicas do DM2.

Palavras-chave: miRNAs, IGF1, prediction analyses.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNA) are responsible for the regulation of a wide variety of biological processes through post transcription gene silencing. IGF1 gene is correlated to proliferation and growing, being linked to type 2 diabetes mellitus (T2DM). This gene expression dysregulation is correlated to miRNA action. MiRNAs prediction tools simulate interactions *in silico* based on *in vivo* interactions statistic data. The present work aims to evaluate through *in silico* prediction which miRNA has a higher statistical probability of regulate IGF1 gene in T2DM context. The predictions analyses were performed in miRabel bioinformatics tool, considering as priority miRNAs with score < 0.05 and experimentally valid. Prediction analyses resulted in 1734 miRNAs, of which 99 were experimentally validated. Only four obtained score < 0.05, standing out mir-130-3p with the best statistical result and mir-29a-3p for being related to interacting with IGF1 on *in vitro* assays. It was concluded, that mir-130-3p and mir-29a-3p were promising candidates for IGF1 regulation in the T2DM context considering its performance in the prediction evaluations and interactions to specific T2DM metabolic pathways.

Key words: miRNAs, IGF1, prediction analyses.

*Endereço para correspondência:
raquel.martins.rf@gmail.com

INTRODUÇÃO

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA não codificante de aproximadamente 22 nucleotídeos presentes na regulação de uma grande variedade de processos biológicos, através do processo de silenciamento gênico pós transcricional. Nesse mecanismo, a regulação ocorre pela inibição da tradução de um RNA mensageiro (mRNA) alvo através da mediação da degradação dessa molécula (XIONG et al., 2019).

O gene IGF1 (fator de crescimento semelhante a insulina 1) desempenha papéis importantes na proliferação, diferenciação, metabolismo energético e homeostase da glicose. Processos patológicos do sistema endócrino como o DM2 são associados ao IGF1 com regulação negativa. Nesse contexto, estudos correlacionam a desregulação da expressão de IGF1 a regulação mediada por miRNA (HAYWOOD et al., 2019; JUNG; SU, 2015).

A inibição de miRNAs que atuam no silenciamento de genes chave no desenvolvimento de doenças, pode ajudar na prevenção da progressão, ou mesmo, reverter de forma benéfica os processos maléficos provocados por essas doenças. Nessa perspectiva, essa abordagem se tornou uma proposta emergente de terapêutica molecular para diversas desordens (SIMONSON; DAS, 2015).

Para identificar possíveis genes alvos de miRNAs são usadas ferramentas de bioinformática de predição, as quais exploram características de interação entre miRNA e mRNA que ocorrem *in vivo* para simular possíveis interações *in silico*. Muitas dessas ferramentas estão disponíveis na web e usam parâmetros estatísticos específicos a características envolvidas na interação entre miRNA e mRNA. Acredita-se que a combinação entre ferramentas que se complementem seja interessante para a obtenção de resultados preditivos mais acurados (QUILLET et al., 2020).

A ferramenta de predição de miRNAs miRabel se baseia na agregação de diferentes metodologias *web-based* relacionadas a interação entre miRNA e mRNA, visando a obtenção de uma avaliação combinada e complementar. Outros aspectos usados são a predição da região 5'UTR e CDS. Através dessas variáveis a ferramenta cria um score de combinação e um ranking de miRNAs preditivos (JUNG; SU, 2015).

O presente trabalho visa avaliar através da predição *in silico* quais miRNAs apresentam maior probabilidade estatística de atuar na regulação do gene IGF1 e consequentemente seria um bom candidato para a investigação *in vitro* e *in vivo* do papel do IGF1 nos mecanismos desencadeadores do DM2 e a possível interação terapêutica entre os dois.

METODOLOGIA

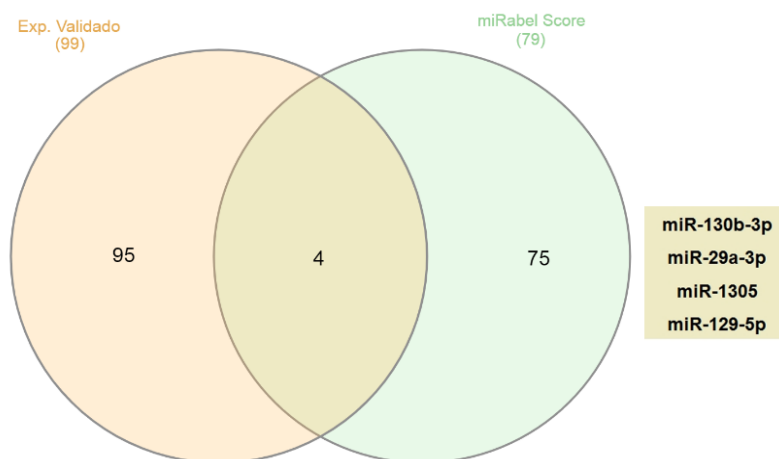
A análise de predição foi realizada através da busca de miRNAs que apresentam o gene IGF1 como alvo, e foi realizada com o uso da ferramenta de predição de miRNAs miRabel (<http://bioinfo.univ-rouen.fr/mirabel/>) (QUILLET et al., 2020). A avaliação levou em consideração o número total de miRNAs encontrados na predição e o *ranking* de miRNAs criado pela ferramenta. Para a construção do *ranking* foram selecionadas as predições em que obrigatoriamente os miRNAs fossem validados em experimentos de acordo com o banco de dados usado pela ferramenta e que obrigatoriamente apresentassem um score miRabel de agregação < 0.05 . E essa interação foi demonstrada através de um diagrama de Venn criado no InteractVenn (<http://www.interactvenn.net/>) (HEBERLE et al., 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A predição de miRNAs que apresentam o gene IGF1 como alvo gerou um resultado total de 1734 miRNAs. Dos quais apenas 99 foram relatados em experimentos validados, 95 obteve interação na região 5'UTR e 476 nos CDS. Levando-se em consideração o miRabel score 79 miRNAs apresentaram significância estatística < 0.05 para a interação com o IGF1.

Dentre os miRNAs que foram validados em experimentos e os que obtiveram um score de combinação entre as ferramentas < 0.05 , foram encontrados apenas 4 miRNAs (Figura 1). No geral, a regulação do IGF1 por miRNAs é correlacionada a inibição de processos celulares relacionados as funções do gene como é o caso dos processos de desenvolvimento, homeostase e envelhecimento (JUNG; SUH, 2015).

Figura 1. Correlação entre a predição de miRNAs de acordo com o miRabel Score e estão presentes em experimentos validados.



O ranking criado pelo miRabel com esses miRNAs (Tabela 1) que foram estatisticamente relevantes e validados em experimentos, demonstrou que mir-130b-3p se sobressaiu diante os outros miRNAs apresentados na predição com um miRabel score de 0,004. Esse miRNA foi relatado em estudos de diversos tipos de carcinomas, principalmente no tipo hepatocelular, através da regulação do gene PTEN (MIAO et al., 2017). Estudos descrevem o papel de regulação do mir-130b-3p de forma direta na inibição de IGF1 nos mecanismos patológicos que levam a fibrose pulmonar (LI et al., 2016).

Tabela 1. Top 5 miRNAs encontrados na predição apresentando IGF1 como alvo.

MiR	miRabel score	PITA	miRanda	SVMicrO	Target Scan	ExpVal	5'UTR	CDS
miR-130b-3p	0.004	460	2459	2027	45	YES	NO	NO
miR-29a-3p	0.01	1963	684	1446	1596	YES	NO	NO
miR-1305	0.01	280	2275	1476	4615	YES	NO	NO
miR-129-5p	0.02	1754	3958	848	4419	YES	NO	YES

O mir-130b-3p é relatado na literatura como um dos miRNAs que se encontram desregulados em pacientes com DM2 quando comparados a indivíduos saudáveis. Nesse contexto, esse miRNA é geralmente encontrado em níveis elevados em tecido adiposo e apresenta papel regulatório direto no processo de adipogênese (HE et al., 2017). No entanto, não foram encontrados relatos que correlacionam o mir-130b-3p diretamente a regulação do IGF1 *in vivo* no contexto do DM2.

O mir-29a-3p está presente nos mecanismos envolvidos na síndrome metabólica (MetS), sendo correlacionado a resistência à insulina e acúmulo de lipídeo via modulação direta do gene IGF1. Estudos *in vitro* desenvolvidos em células tratadas com mir-29a-3p antagonir demonstraram que inibição do miRNA provocou o aumento significativo do IGF1 (LIN et al., 2019).

Os demais genes do ranking apresentam papéis de regulação do IGF1 em diferentes processos biológicos. O mir-129-5p atua diretamente na regulação da apoptose e proliferação celular via IGF1R/Src/ERK/Egr-1 (ZHANG et al., 2019). O mir-1305 está envolvido no balanço da diferenciação de células pluripotentes (JIN et al., 2016). Não foram encontrados relatos de regulação do IGF1 mediada por esses miRNAs nos mecanismos que desencadeiam o DM2.

*Endereço para correspondência:
raquel.martins.rf@gmail.com

CONCLUSÃO

Nesse contexto, concluímos que a partir das análises dos parâmetros de predição, que os mir-130b-3p e mir-29a-3p são candidatos promissores para a regulação do IGF1. Ambos, apresentaram resultados estatísticos relevantes com relação aos demais. Além disso, foi observado que os dois miRNAs são encontrados em estudos sobre a regulação de mecanismos do diabetes do DM2, mas, apenas mir-29a-3p foi relatado no contexto pesquisado de regulação direta do IGF1 no DM2.

REFERÊNCIAS

- HAYWOOD, N. J. et al. **The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes.** Mol. Metabol. v. 19, n. October 2018, p. 86–96, 2019.
- HE, Yuqing et al. **A systematic study of dysregulated MicroRNA in type 2 diabetes mellitus.** International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 3, 2017.
- JIN, Shibo et al. **A Novel Role for miR-1305 in Regulation of Pluripotency-Differentiation Balance, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells.** Stem Cells, v. 34, n. 9, p. 2306–2317, 2016.
- JUNG, Hwa Jin e SUH, Yousin. **Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs.** Frontiers in Genetics, v. 5, n. JAN, p. 1–13, 2015.
- LI, Shuhong et al. **MiR-130b-3p modulates epithelial-mesenchymal crosstalk in lung fibrosis by targeting IGF1.** PLoS ONE, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.
- LIN, Xihua et al. **Urinary miRNA-29a-3p levels are associated with metabolic parameters via regulation of IGF1 in patients with metabolic syndrome.** Biomedical Reports, v. 10, n. 4, p. 250–258, 2019.
- MIAO, Yuan et al. **MicroRNA-130b targets PTEN to mediate drug resistance and proliferation of breast cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway.** Scientific Reports, v. 7, n. January, p. 1–12, 2017.
- O'BRIEN, Jacob et al. **Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation.** Frontiers in Endocrinology, v. 9, n. AUG, p. 1–12, 2018.
- QUILLET, Aurélien et al. **Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation.** Frontiers in Genetics, v. 10, n. January, p. 1–14, 2020.
- SIMONSON, B. e DAS, S. **MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet?** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, v. 15, n. 6, p. 467–474, 2015.