

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

**ÁDAMO DAVI DIÓGENES SIENA**

**Análise da expressão de RNAs longos não-codificadores  
em linhagens celulares de melanoma em diferentes  
estágios de progressão tumoral**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2016**

**ÁDAMO DAVI DIÓGENES SIENA**

**Análise da expressão de rnas longos não-codificadores em  
linhagens celulares de melanoma em diferentes estágios de  
progressão tumoral**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr

RIBEIRÃO PRETO

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

*Siena, Ádamo Davi Diógenes*

Análise da Expressão de RNAs Longos Não-Codificadores em Linhagens Celulares de Melanoma em Diferentes Estágios de Progressão Tumoral. Ribeirão Preto, 2016.  
/ Ádamo Davi Diógenes Siena; Orientador. Wilson Araujo da Silva Jr. – Ribeirão Preto, 2016.

111 f.:il; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USPo, Área de concentração: Genética; Orientador: Araujo da Silva Jr., Wilson. para obtenção do título de Mestre em Ciências.

1. Melanoma. 2. Long noncoding RNA. 3. Progressão tumoral. 4. RNA-seq.
5. Câncer

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Siena, Ádamo Davi Diógenes

TITULO: Análise da Expressão de RNAs Longos Não-Codificadores em Linhagens Celulares de Melanoma em Diferentes Estágios de Progressão Tumoral.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.Dr \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **APOIO E SUPORTE FINANCEIRO**

Este trabalho bem como a sua apresentação em diversos congressos foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições e entidades:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

## DEDICO

À minha mãe, Benedita Inacio (*in memoriam*), por sua humildade, amor e apoio incondicionais às minhas escolhas.

Sentirei saudades de uma das minhas maiores dificuldades: a tentativa contínua de lhe fazer entender o que era Genética (ou o que se estuda em Biologia). E como no fim bastava tão bem minha empolgação e brilho nos olhos. Você deixou saudades.

***Vidole vitano,***

***Kipi bora***

“cinco dedos, qual o melhor?”

**Provérbio africano**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Wilson Araujo Silva Jr., pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa, pela orientação e contribuição para meu crescimento científico e profissional.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB), em especial à Adriana, Andrés, Anelisa, Anemari, Bruna, Daniele, Diana, Isabela, Jessica, Kamila, Luiza, Simone e Thais, pelo saudável e prazeroso ambiente de trabalho, cotidiano de aprendizado e pela amizade.

A Dra. Greice Molfetta, por sua paciência, amizade, ensinamentos e auxílio na solução dos problemas inerentes do cotidiano laboratorial.

À Cibele Cardoso, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer, pela sua disponibilidade e auxílio com as linhagens celulares quando solicitada.

Ao meu pai, Antonio Carlos Siena, por seu apoio durante toda minha vida e carreira profissional, por sempre me ensinar aquilo que a Academia não tem como objetivo e por sempre me lembrar de minhas raízes.

Ao meu irmão e sua esposa, Isaias Inacio Siena e Kelly Michelin Siena, por sempre me incentivarem a lutar pelos meus sonhos e por seu apoio em todos os momentos cruciais deste processo. Também aos meus sobrinhos, Fernandinho e Karoline, por sua admiração e respeito.

Aos amigos, em especial ao Bill, Daniel, David, Fábio e Henrique, pela parceria nos momentos de diversão e apoio nos momentos difíceis, tornando a caminhada mais leve e prazerosa.

A parceira de todos os momentos, Thais Coelho, por sua companhia em todos os momentos importantes, seu carinho, atenção e ajuda nos momentos difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte estrutural, logístico, administrativo e financeiro provido via CEPID, fundamental para a realização desta pesquisa.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo suporte estrutural, administrativo e logístico, fundamental para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Apoio Ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA), pelo suporte financeiro para realização de atividades acadêmicas.

## RESUMO

Siena, A. D. D. **Análise da Expressão de RNAs Longos Não-Codificadores em Linhagens Celulares de Melanoma em Diferentes Estágios de Progressão Tumoral**. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Evidências sugerem que somente cerca de 2% do genoma codifica proteínas, mas que a maior parte dos 80% restante possui atividade transcricional. Por não ser codificadora de proteínas, essa fração do genoma foi considerada como 'DNA lixo'. Entretanto, estudos mais recentes e análises pós-ENCODE vem demonstrando que parte significativa destes RNAs não-codificantes desempenham papéis importantes em processos biológicos essenciais e também em doenças. Os RNAs longos não codificadores (lncRNAs) embora tradicionalmente conhecidos pelo *imprinting* genômico, vem demonstrando diversos mecanismos de regulação da expressão gênica, principalmente em nível pós transcricional. Um destes lncRNAs que está envolvido principalmente com a metastase em câncer é o HOTAIR. O melanoma tem sido utilizado como modelo de progressão do câncer por suas etapas bem definidas e por isso já tem apresentado alguns lncRNAs envolvidos na melanomagenese e progressão do melanoma, tal como o HOTAIR. Assim, neste trabalho foi analisado a expressão de lncRNAs de amostras de melanócito e melanoma, sendo que as amostras malignas representam as principais fases de progressão deste tipo de câncer. Foram analisados os níveis de expressão relativa. Além disso, foi realizado a expressão diferencial dos grupos representativos do melanoma. Foram encontrados lncRNAs com valores de expressão e significância ( $p$ -ajustado  $<0,01$  e *fold change*  $>1$ ) que podem ser indicativos de expressão associada a progressão do melanoma. Os lncRNAs mais diferencialmente expressos foram avaliados quanto a sua capacidade de interação proteína-RNA e literatura científica disponível e então foram selecionados para posteriores ensaios funcionais.

Palavras chave: RNAs longos não codificadores, melanoma.

## ABSTRACT

Siena, A. D. D. **Analysis of long noncoding RNAs expression in melanoma cell lines at different stages of tumor progression.** 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Evidence suggests that only about 2% of the genome encodes protein, but most remaining 80% has transcriptional activity. Since they do not coding for proteins, this fraction of the genome was considered 'junk DNA', However, recent studies and post-ENCODE analysis has shown that significant part of these non-coding RNAs play important roles in essential biological processes and in disease. Long non-coding RNAs (lncRNAs) although traditionally known for genomic imprinting, has demonstrated several mechanisms of regulation of gene expression, especially at the post transcriptional level. One of these lncRNAs that is involved primarily with metastasis in cancer is HOTAIR. Melanoma has been used as a model of cancer progression by its well-defined steps, and so it has been presented some lncRNAs involved in melanoma progression and melanomagenese, as HOTAIR was demonstrated. In this work it was analyzed the expression of lncRNAs of melanocyte and melanoma samples, and malignant samples represent the main stages of progression of this type of cancer. Relative expression levels were analyzed. Furthermore, it was performed differential expression of representative melanoma groups. lncRNAs found with expression values and significance (p-adjusted <0.01 and fold change > 1) may be indicative of expression associated with melanoma progression. The lncRNAs more differentially expressed were evaluated for their ability to interact protein-RNA and available scientific literature and then were selected for further functional assays.

Keywords: Long noncoding RNAs, melanoma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização histológica da pele humana. ....	23
Figura 2 – Taxas de incidencia e mortalidade por 100,000 habitantes nos Estados Unidos da América. ....	25
Figura 3 – Modelo de progressão do câncer de pele tipo melanoma. Adaptado de Vultur, A. (2013). ....	27
Figura 4 – Representação da transcrição dos lncRNAs encontrados neste trabalho. ....	36
Figura 5 – Perfil do transcriptoma das 4 linhagens celulares de melanoma em conjunto com linhagem de melanócito. ....	50
Figura 6 - Proporção de ncRNAs encontrados nas linhagens celulares, por amostra. ....	51
Figura 7–Proporção e tipos diferentes de lncRNAs encontrados nas amostras de melanoma e melanócito. ....	53
Figura 8 – lncRNAs exclusivos e compartilhados entre as amostras. ....	54
Figura 9 – Níveis de expressão do lncRNA HOTAIR em diferentes linhagens de melanócito e melanoma obtido por qPCR. ....	56
Figura 10 – MA plots do transcriptoma representando a comparação entre dois grupos. ....	58
Figura 11 - Mapa de distâncias das amostras em relação a análise da expressão diferencial do transcriptoma total.....	59
Figura 12– Análise de componente principal (PCA) para todos os transcritos das amostras.....	60
Figura 13 – Número de lncRNAs superexpressos e subexpressos nas diferentes comparações realizadas ....	61
Figura 14 – Mapa de distâncias das amostras em relação a análise da expressão diferencial de lncRNAs. ....	62
Figura 15 – Volcano plots de lncRNAs diferencialmente expressos entre amostras de melanoma e melanócito. ....	66
Figura 16 – Perfil de expressão dos lncRNAs diferencialmente expressos para as amostras de melanoma e melanócito.....	67
Figura 17- Clusterização hierárquica entre MELC vs PRIM a partir dos os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos ....	68

Figura 18 - Clusterização hierárquica entre MELC vs MET a partir dos os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos. ....	69
Figura 19 - Clusterização hierárquica entre MELC vs MET a partir dos os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos. ....	69
Figura 20 – Análise de componente principal (PCA) para os lncRNAs. ....	70
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% tratada com SYBR® Safe DNA Gel Stain. ....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Incidência do melanoma no Brasil para o ano de 2014 nas diferentes regiões do Brasil, considerando Estados e capitais. ....	24
Tabela 2– Sequências dos primers utilizados na PCR semi quantitativa. ....	47
Tabela 3 – Reads obtidas e reads mapeadas ao genoma referencia, por amostra. ....	49
Tabela 4 – Quantidade de RNAs diferentes encontrados, por amostra. ....	52
Tabela 5 – Tipos de lncRNAs* encontrados nas amostras. ....	52
Tabela 6 – Número de reads das diferentes isoformas do HOTAIR nas amostras do estudo. ....	55
Tabela 7 – Abundância (FPKM) das diferentes isoformas do HOTAIR nas amostras de melanócito e melanoma. ....	56
Tabela 8 – Count reads para as diferentes isoformas do HOTAIR nas amostras de melanócito e melanoma, ....	57
Tabela 9 - Os 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos entre MELC x PRIM. ....	63
Tabela 10 - Os 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos entre MELC x MET ....	64
Tabela 11 - Os 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos entre MELC x MELN. ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3' UTR	Região 3' não traduzida
3prime_overlapping_ncRNA	RNA que suporta existência de transcritos curtos não-codificantes transcritas a partir da região 3' UTR
5' UTR	Região 5' não traduzida
Antisense	RNA que sobrepõe região genômica de transcrito codificador na cadeia oposta de DNA
CPNM (ou NMSC)	Câncer de pele não-melanoma
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IG RNA	RNA derivado de genes de imunoglobulinas
lincRNA	RNA longo não codificante oriundo de regiões intergênicas
lncRNA	RNA longo não codificador
miRNA	Micro-RNA
miscRNA	RNA miscelânea, predito ser não codificador por Rfam e miRBase
MM	Melanoma metastático
mRNA	RNA mensageiro
nt	Núcleotídeo(s)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pseudo RNA	RNA derivado de pseudogene
RT- qPCR	Reverse Transcriptase - quantitativa PCR
Retained_intron	RNA que sofreu splicing alternativo e manteve sequências intrônicas relativas a RNAs codificadores
RGP	Fase radial de crescimento
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA de nova geração
rRNA	RNA ribossômico

Sense_intronic	lncRNA transcrito de introns de genes codificadores que não sobrepõe nenhum exon
Sense_overlapping	lncRNA que contém um gene codificador em seu intron na mesma cadeia de DNA
snoRNA	Pequeno RNA nucléolar
snRNA	Pequeno RNA nuclear
TR RNA	RNA derivado de genes de cadeia variável do receptor de células T
tRNA	RNA transportador
VGP	Fase vertical de crescimento
3prime_overlapping_ncRNA	RNA que suporta existência de transcritos curtos não-codificantes transcritas a partir da região 3' UTR
5' UTR	Região 5' não traduzida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 A PELE HUMANA E OS MELANÓCITOS.....	20
1.2 CÂNCER E PROCESSO CARCINOGENICO.....	21
1.3 O CÂNCER DE PELE .....	23
1.4 MELANOMA.....	24
1.4.1 <i>EPIDEMIOLOGIA .....</i>	<i>24</i>
1.4.2 <i>PROGRESSÃO DO MELANOMA E METASTASE .....</i>	<i>26</i>
1.4.3 <i>MELANOMA EXTRA-CUTANEOS .....</i>	<i>27</i>
1.4.4 <i>FATORES DE RISCO .....</i>	<i>28</i>
1.4.5 <i>GENÉTICA DO MELANOMA.....</i>	<i>28</i>
1.5 O GENOMA HUMANO: COMPLEXIDADE E SEQUÊNCIAS GENÉTICAS NÃO CODIFICANTES.....	30
1.6 RNAs LONGOS NÃO CODIFICADORES (lncRNAs).....	35
1.7 RNAs LONGOS NÃO CODIFICADORES NA HOMEOSTASE DA PELE E INDUÇÃO DO MELANOMA.....	39
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....	42
3.2 CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES.....	42
3.3 RNA-SEQ.....	43
3.3.1 <i>EXTRAÇÃO DE RNA .....</i>	<i>43</i>
3.3.2 <i>ANÁLISE DE INTEGRIDADE DO RNA, CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO .....</i>	<i>43</i>
3.4 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA .....	44

3.4.1	CHAMADA DE BASES, MAPEAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANOTAÇÃO DE GENES E TRANSCRITOS .....	44
3.4.2	QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL .....	45
3.4.3	UTILIZAÇÃO DE DADOS PÚBLICOS E TRATAMENTO DE ARQUIVOS 46	
3.5	SINTESE DE cDNA E PCR EM TEMPO REAL- QUANTITATIVA (qRT-PCR). 46	
3.6	DESENHO DE PRIMERS E PADRONIZAÇÃO .....	47
3.7	PCR SEMIQUANTITATIVA (PCR-SQ).....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1	TRANSCRIPTOMA DE LINHAGENS CELULARES DE MELANÓCITO E MELANOMA .....	49
4.2	ANÁLISE DE DADOS - BIOINFORMÁTICA .....	49
4.2.1	ANÁLISE QUANTITATIVA DO TRANSCRIPTOMA E DA QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO .....	49
4.2.2	ANÁLISE QUANTITATIVA DE LNCRNAS .....	52
4.2.3	<i>lncRNAs</i> exclusivos e compartilhados entre as amostras .....	53
4.2.4	ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO LNCRNA HOTAIR. ....	54
4.2.5	UTILIZAÇÃO DE DADOS PÚBLICOS E REAGRUPAMENTO DE AMOSTRAS.....	57
4.2.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS .....	58
4.2.7	ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) PARA O TRANSCRIPTOMA.....	60
4.2.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>lncRNAs</i> .....	61
4.2.9	ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DE LNCRNAS .....	70
4.2.10	VALIDAÇÃO TÉCNICA POR PCR-SEMIQUANTITATIVA .....	71
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1	RNA-SEQ.....	72

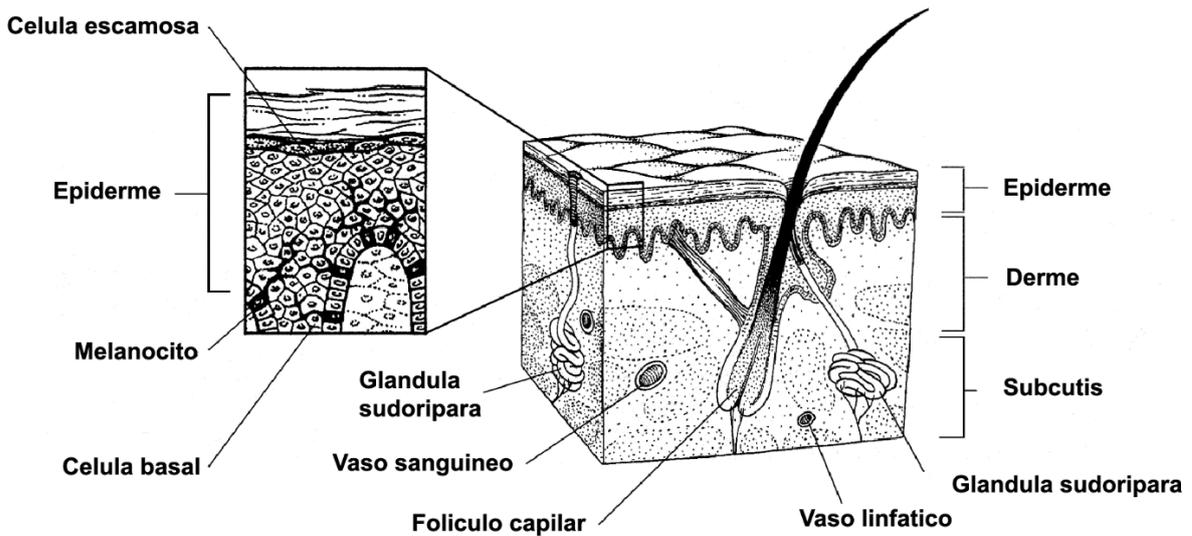
5.2	ANÁLISE DE DADOS QUANTITATIVOS DO TRANSCRIPTOMA DE MELANOMA E MELANÓCITOS .....	73
5.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO LNCRNA HOTAIR EM MELANOMA.....	76
5.4	LNCRNAS COMPARTILHADOS E EXCLUSIVOS .....	78
5.5	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES E TRANSCRITOS .....	78
5.6	EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE LNCRNAS .....	79
5.7	ANÁLISE EXPLORATORIA DE DADOS.....	80
5.8	SELEÇÃO DE LNCRNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PARA ESTUDOS FUNCIONAIS.....	81
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO I.....</b>	<b>107</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A PELE HUMANA E OS MELANÓCITOS

A pele humana adulta é composta por diversas células provenientes de diferentes origens embrionárias (BLANPAIN; FUCHS, 2006). Durante o desenvolvimento embrionário e brevemente após a gastrulação, a epiderme surge como uma monocamada de células progenitoras a partir de células da neuroectoderme que irão formar a epiderme estratificada, folículos pilosos, glândulas sebáceas e apócrinas (BLANPAIN; FUCHS, 2006). Os melanócitos, por sua vez, compõem um grupo heterogêneo de células no corpo humano, que possuem em comum o fato de serem derivados de células pluripotentes da crista neural embrionária (melanoblastos) e a capacidade de produção de melanina (CICHOREK et al., 2013).

Os melanócitos podem ser encontrados no sistema tegumentar, orelha interna, coração, sistema nervoso, olhos de organismos vertebrados e possivelmente em outros locais (HEARING; LEONG, 2006; CICHOREK et al., 2013). Melanócitos são responsivos a luz solar com o bronzeamento, e, em animais mais simples, com a camuflagem, além de possuir extrema versatilidade e formar uma rede foto-sensível que é capaz de ler as variações sazonais ambientais nos ciclos de luz, regular e ajustar o ritmo circadiano (IYENGAR, 2013). Já a pele, em sua totalidade, é considerada o maior órgão do corpo humano, com aproximadamente 20 tipos celulares diferentes (Figura 1), e possui diversas outras funções, tais como: a regulação da temperatura corporal e perda de água; estocagem de gordura; produção de vitamina D; proteção contra infecções e lesões por raios ultra-violetas (BRESSLER; BRESSLER, 1989; CHUONG et al., 2002; BLANPAIN; FUCHS, 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).



**FIGURA 1** – Organização histológica da pele humana. Representação das camadas que formam a pele e os diferentes tipos celulares que compõem este órgão. Figura adaptada de American Cancer Society (2015).

## 1.2 CÂNCER E PROCESSO CARCINOGENÉTICO

Câncer é uma denominação ampla para uma série de doenças que possuem em comum o fato de serem constituídas por um conjunto de células anormais, cuja divisão celular está fora de controle e que podem se espalhar para outros tecidos. De fato, o câncer pode ser considerado uma doença do genoma (YATES; CAMPBELL, 2012). O modelo clássico de carcinogênese é tido como um processo originado em uma única célula, susceptível a múltiplas e sucessivas expansões clonais, sendo guiadas pelo acúmulo de alterações genômicas (ou “mutações”) e que são selecionadas preferencialmente pelo ambiente tumoral (NOWELL, 1976; VOGELSTEIN; KINZLER, 1993; YATES; CAMPBELL, 2012). Segundo a teoria de Alfred Knudson (1971), são necessárias pelo menos duas dessas mutações para que o câncer se desenvolva (KNUDSON, 1971). Um pouco mais tarde, o trabalho de Peter Nowell (1976), expandiu a percepção de desenvolvimento e progressão tumoral como consequência de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, e que estas são requeridas no passo-a-passo para a expansão clonal de células tumorais e desenvolvimento do tumor (NOWELL, 1976).

As alterações genéticas, por sua vez, podem ser resultado de diferentes tipos de fatores, que podem ser distinguidos em dois principais grupos: fatores carcinogênicos externos, como o tabaco (HECHT, 1999), a radiação ultravioleta (DE GRUIJL, 1999; NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010) alguns tipos de alimentos e hábitos alimentares (LEE; DERAKHSHAN, 2013; BOUVARD et al., 2015); ou características biológicas intrínsecas, como mutações hereditárias patogênicas (WALSH; KING, 2007; LOEB; CATALONA, 2014), produção de ROS - espécies reativas de oxigênio (LIOU; STORZ, 2010; SALK; FOX; LOEB, 2010) ou desbalanço do sistema imunológico (FINN, 2008; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Mais tarde, foi observado que alguns tipos de tumores podem apresentar quantidades muito superiores de mutações não-sinônimas do que outros, tal como o melanoma ou o câncer de pulmão, relevando-se a importância dos mutagênicos na patogênese destes tumores – luz ultravioleta e tabaco, respectivamente (VOGELSTEIN et al., 2013).

Além de alterações moleculares em diferentes etapas do câncer, existem também alterações no micro-ambiente celular que permitem que o processo carcinogênico se instale e avance. No início do século XXI, em busca desta compreensão, Hanahan & Weinberg (2000) elencaram os seis principais tipos de alterações da fisiologia celular, que, coletivamente, explicariam os diversos genótipos do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Dez anos mais tarde, os mesmos autores adicionaram quatro novas características, baseados nos avanços do sequenciamento de nova geração (NGS) que renderiam então um quadro conceitual para compreensão da biologia do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Notavelmente, essas habilidades adquiridas são: (I) evasão de apoptose; (II) autossuficiência em fatores de crescimento; (III) insensibilidade a fatores anti-crescimento; (IV) suporte a angiogênese; (V) potencial replicativo ilimitado; (VI) invasão tecidual e metastase; (VII) desregulação de metabolismo energético; (VIII) prevenção contra destruição imunológica; (IX) mutação e instabilidade genômica e (X) inflamação promotora de tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

O processo metastático embora altamente ineficiente (poucas de várias células que migram do tumor primário possuem sucesso em colonizar locais distantes), é o responsável por cerca de 90% das mortes ocasionadas por câncer (MEHLEN; PUISIEUX, 2006), principalmente em situações em que estes são

resistentes a terapia convencional (FIDLER; KIM; LANGLEY, 2007). Deste modo, com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, é cada vez mais necessário meios de se entender os mecanismos subjacentes, detectar ou controlar o câncer em seus estágios menos agressivos, evitando-se assim um diagnóstico tardio e melhorando a sobrevivência dos pacientes (HIOM, 2015)

### 1.3 O CÂNCER DE PELE

O câncer de pele tem distribuição universal e trata-se do câncer de ocorrência mais frequente na população brasileira (INCA, 2014). Devido à diversidade de células presente na pele, este tipo de câncer é classificado de acordo com as células que dão origem a neoplasia. De modo geral, o câncer de pele pode ser dividido em dois tipos principais: do tipo melanoma e não melanoma. O câncer de pele não melanoma (*NMSK* – do inglês, *non melanoma skin cancer*) possui origem principalmente em células basais ou em células escamosas, sendo estes denominados como carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas, respectivamente (ALBERT; WEINSTOCK, 2003; REINHARD DUMMER, MARK R. PITTELKOW, KEIJI IWATSUKI, ADÈLE GREEN, 2011). No Brasil, o *NMSK* corresponde a aproximadamente 20% dos novos casos de câncer, contudo apresenta altos índices de cura e baixa taxa de mortalidade (INCA, 2002).

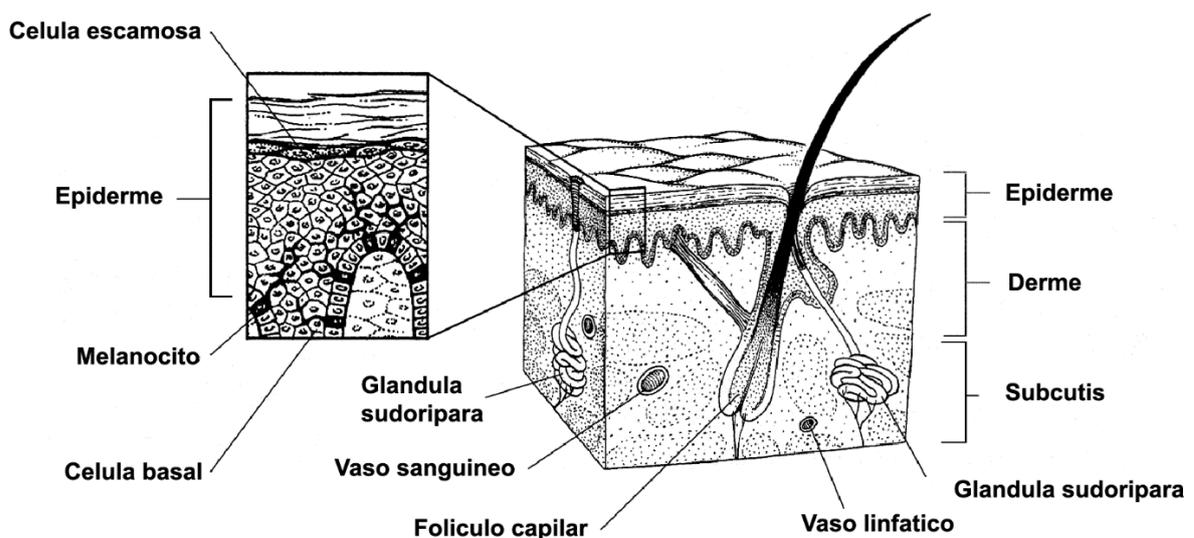


Figura 1 – Organização histológica da pele humana.

Representação das camadas que formam a pele e os diferentes tipos celulares que compõem este órgão. Figura adaptada de American Câncer Society (2015).

## 1.4 MELANOMA

### 1.4.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de pele do tipo melanoma é originário de alterações genéticas em melanócitos, possui baixa frequência – cerca de 5% dos casos de câncer de pele – mas apresenta uma alta letalidade, em torno de 80% (American Câncer Society, 2014; INCA, 2002; Miller e Mihm, 2006). A alta mortalidade associada ao melanoma se deve principalmente à sua capacidade de desenvolver metástases nos linfonodos regionais e órgãos longínquos, além de possuir eficiência terapêutica limitada (INCA, 2002; MacKie, Hauschild e Eggermont, 2009).

Nos Estados Unidos, estima-se que em 2014 serão contabilizados aproximadamente 76.100 novos casos de melanoma entre ambos os sexos, com estimativa de aproximadamente 9.710 mortes (SIEGEL et al., 2014). Já no Brasil, são estimados para o mesmo ano cerca de 5.890 novos casos de melanoma entre ambos os sexos (INCA, 2014), sendo que as maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na Região Sul (TABELA 1).

Tabela 1 – Incidência do melanoma no Brasil para o ano de 2014 nas diferentes regiões do Brasil, considerando Estados e capitais. Estimativa das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes. Tabela adaptada de INCA, 2014.

Região	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
NORTE	80	0,91	70	1,52	70	0,58	60	0,87
NORDESTE	440	1,65	150	2,54	330	1,12	120	1,47
CENTRO-OESTE	210	2,96	40	3,06	140	1,96	40	2,64
SUDESTE	1.310	3,19	530	5,32	1.510	3,49	750	6,7
SUL	920	6,55	160	9,23	880	6,03	180	8,9
TOTAL	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57

De modo geral, nas últimas décadas parece existir um aumento de 4-6% na incidência anual de melanoma em diversas regiões do planeta, como Europa, Oceania e América do Norte (REINHARD DUMMER, MARK R. PITTELKOW, KEIJI IWATSUKI, ADÈLE GREEN, 2011). A mortalidade do melanoma também acompanha o crescimento da incidência (Figura 2), sendo que as regiões do corpo mais afetadas pelo melanoma podem variar. A distribuição geral dos casos é mais presente em costas e ombros masculinos e lábios inferiores femininos (MAGNUS, 1981; OSTERLIND; HOU-JENSEN; MØLLER JENSEN, 1988; MÅSBÄCK et al., 1997; ANDERSEN; DAVIS, 2013); Contudo, em outro método possível de análise, cuja distribuição de melanoma é ajustada pela área de ocorrência, ambos os sexos apresentam maiores taxas de incidência na região facial (GREEN et al., 1993).

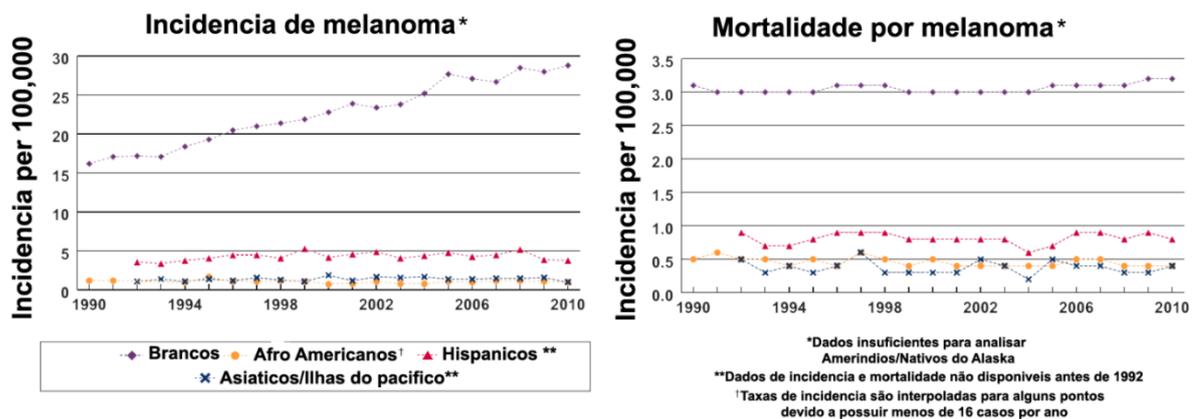


Figura 2 – Taxas de incidência e mortalidade por 100,000 habitantes nos Estados Unidos da América.

Adaptado de Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program and the National Center for Health Statistics (2015).

O melanoma é a doença com pior prognóstico dentre os tumores cutâneos e apresenta também grande impacto econômico (SOUZA et al., 2009). Nos Estados Unidos, por ano são gastos cerca de 2.4 bilhões de dólares no tratamento do melanoma (Câncer Trends Progress Report, 2010). Os gastos no Brasil envolvidos no diagnóstico e tratamento do melanoma, em seus diversos estágios, foram avaliados somente nas últimas décadas (NASER, 2011). O estudo de Souza et al.,

(2009) relatou que os estágios iniciais 0, I e II da doença compreendem aproximadamente 4,2% (no SUS) e 1,3% (convênios particulares) do custo total com a doença, já os estágios III e IV consomem 95,8% e 98,7%, respectivamente (SOUZA et al., 2009). Deste modo, percebe-se que o diagnóstico em estágios iniciais de melanoma além de aumentar a possibilidade de tratamento e cura, poderia reduzir consideravelmente os encargos tanto para o sistema público de saúde, como para o sistema privado (SOUZA et al., 2009).

#### **1.4.2 PROGRESSÃO DO MELANOMA E METASTASE**

O melanoma apresenta uma sequência de etapas bem definidas por evidências clínicas e histopatológicas, progredindo de lesões proliferativas benignas, passando por melanomas primários sem evidências de metástase, chegando a lesões invasivas primárias e, finalmente, metástase (HERLYN, 1990). De fato, as etapas de progressão e metástase do melanoma (Figura 3) é retratada em maiores detalhes pelo clássico modelo de Clark (CLARK et al., 1984). Neste modelo, são assumidos seis passos principais na tumorigênese do melanoma, sendo eles: (I) nevo melanocítico comum; (II) nevo melanocítico com hiperplasia melanocítico lentiginosa, ou seja, diferenciação aberrante; (III) nevo melanocítico com a diferenciação aberrante e atipia nuclear melanocítica, ou seja, a displasia melanocítica; (IV) fase de crescimento radial de melanoma primário (RGP); (V) fase de crescimento vertical de melanoma primário (VGP); e (VI) o melanoma metastático (MM) por fim (CLARK et al., 1984; HUSSEIN, 2004).

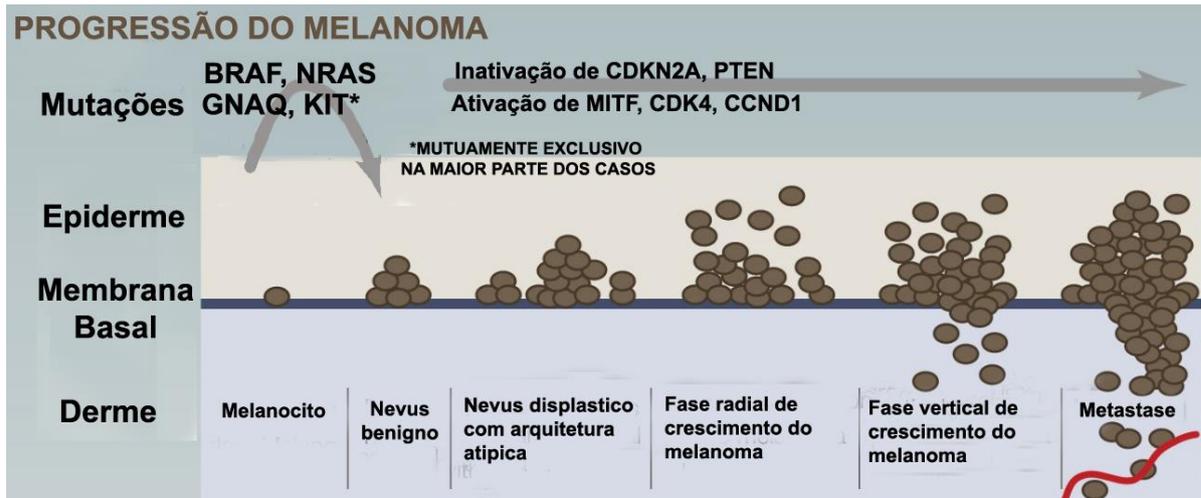


Figura 3 – Modelo de progressão do câncer de pele tipo melanoma. Adaptado de Vultur, A. (2013).

Contudo, a metástase e os mecanismos de progressão do melanoma são processos dinâmicos, que ainda estão revelando caminhos menos lineares e muito mais complexos do que se conhecia até então (DAMSKY; THEODOSAKIS; BOSENBERG, 2014). Essa perspectiva permite enxergar o modelo linear de melanoma e sua progressão como uma via para a malignidade, ao mesmo tempo em que surgem evidências da disseminação celular para longe da lesão primária precocemente e não como exclusividade de melanoma metastático (DAMSKY; THEODOSAKIS; BOSENBERG, 2014).

### 1.4.3 MELANOMA EXTRA-CUTÂNEOS

Melanomas que não se originam na pele (extra-cutâneos/não cutâneos) são tumores raros, totalizando entre 4% a 5% de todos os melanomas primários, e cujo desenvolvimento carece de associações com danos provocados pela exposição ao sol, história familiar ou nevos (popularmente conhecido como “pintas”) precursores (THOELKE et al., 2004; HUSSEIN, 2008). Existem ocorrências de melanomas extra-cutâneos em diversos locais, tais como seios nasais e paranasais, cavidade oral, órgãos genitais femininos, trato digestivo, esôfago, meninges e nos olhos (THOELKE et al., 2004).

Segundo Hussein (2008), os melanomas extra-cutâneos podem ser agrupados em quatro grupos principais: (I) melanomas oculares; (II) melanomas mucosais; (III) melanomas metastáticos; e (IV) melanomas de outros órgãos, que são

extremamente raros (HUSSEIN, 2008). Entre os melanomas extra-cutâneos, os mais comuns são o melanoma ocular e o melanoma mucosal, sendo que o primeiro possui maior taxa de ocorrência (chegando a 70% dos casos), e o segundo possui maior taxa de metástase (cerca de 95%), sendo maior até mesmo de que o próprio melanoma cutâneo (TAS et al., 2011; KERALIYA et al., 2015).

#### 1.4.4 FATORES DE RISCO

Em termos de fatores ambientais, a exposição a luz solar (predominantemente raios UV) apresenta dados consistentes de associação ao melanoma (PLEASANCE et al., 2010; BERGER et al., 2012), sendo possível notar uma flutuação nessa incidência de acordo com algumas características, tais como: pessoas com pele clara possuem em média 15% maiores chances de desenvolver melanoma (ARMSTRONG; KRICKER, 1993); migrantes de pele clara que migram de altas para baixas latitudes possuem taxas de melanoma maiores do que residentes nativos (WHITEMAN; WHITEMAN; GREEN, 2001); pacientes acometidos por Xeroderma Pigmentosum (XP) – uma doença genética associada a incapacidade de reparo no DNA por lesões induzidas pela luz ultra-violeta (UV) – possuem risco 1000 vezes maior de desenvolver melanoma do que as demais pessoas (KRAEMER et al., 1994); medidas fenotípicas de sensibilidade ao sol (pele clara, sardas ou facilidade de se “queimar” ao sol) indicam pelo menos duas vezes mais riscos de melanoma em todas as populações (BLISS et al., 1995); e além disso, existem estudos com modelos animais que associam intimamente a radiação UV ao desenvolvimento do melanoma (NOONAN et al., 2001; REINHARD DUMMER, MARK R. PITTELKOW, KEIJI IWATSUKI, ADÈLE GREEN, 2011).

#### 1.4.5 GENÉTICA DO MELANOMA

Dentre as alterações genéticas de alto risco para desenvolvimento de melanoma, podemos encontrar o gene supressor tumoral CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), que codifica dois transcritos para proteínas supressoras tumorais via *splicing* alternativo - através da utilização de promotores alternativos e exons iniciais – resultando em diferentes *Open Reading Frames* (ORFs) e nas proteínas sem homologia de aminoácidos p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup>(CHIN;

GARRAWAY; FISHER, 2006; HODIS et al., 2012). Esse gene, cuja deleção de seu *locus* (9p21) está associada ao melanoma familiar (CANNON-ALBRIGHT et al., 1992; NANCARROW et al., 1993; PETTY et al., 1993; HODIS et al., 2012) também pode apresentar mutações de linhagem germinativa (HUSSUSSIAN et al., 1994; GRUIS et al., 1995; HARLAND et al., 1997). Além disso, o gene CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4), que codifica o alvo primário da proteína p16<sup>INK4a</sup>, parece também estar envolvido com o melanoma familiar (ZUO et al., 1996). Contudo, mutações na linhagem germinativa do gene CDKN2A ainda são consideradas como o principal evento no desenvolvimento de melanoma familiar (CHIN; GARRAWAY; FISHER, 2006; PETERS, 2008).

Existem genes que também já foram associados com o melanoma não familiar, tal como genes envolvidos no reparo de DNA, da família gênica XP (REINHARD DUMMER, MARK R. PITTELKOW, KEIJI IWATSUKI, ADÈLE GREEN, 2011), que também estão relacionados ao Xeroderma Pigmentosum e possuem alta correlação com desenvolvimento de melanoma (KRAEMER et al., 1994; KRAEMER, 1997). Além disso, deleções ou mutações no gene supressor de tumor PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) também estão associadas ao desenvolvimento e progressão de melanoma (CELEBI et al., 2000; WU; GOEL; HALUSKA, 2003; DONG et al., 2014).

Dentre as alterações genéticas esporádicas, uma das principais descobertas foi à associação de mutações no gene BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) à melanomagenese – ou seja, a origem e desenvolvimento do melanoma (VULTUR; HERLYN, 2013). O gene BRAF encontra-se no *locus* 7q34 e codifica uma proteína quinase serina/treonina que atua na via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) transmitindo sinais externos para o núcleo celular, sendo já associado a diversos tipos de câncer (DAVIES et al., 2002; ASCIERTO et al., 2012). No melanoma maligno, mutações neste gene estão presentes em torno de 50% dos casos (DAVIES et al., 2002; KUMAR et al., 2003; ASCIERTO et al., 2012; HODIS et al., 2012; JANG; ATKINS, 2013; HÉLIAS-RODZEWICZ et al., 2015), sendo que a mutação mais frequente (cerca de 90%) encontra-se no códon 600 desta proteína (BRAF V600E), e que afeta os domínios quinase e a conformação ativa da proteína (DAVIES et al., 2002; ASCIERTO et al., 2012; MCCAIN, 2013). Mutações

em outros genes da família RAF (ARAF ou CRAF) aparentam não estar envolvidos no desenvolvimento do melanoma (FURUE; KADONO, 2016).

Além disso, cerca de 1/5 dos melanomas cutâneos apresentam mutações dominantes no gene NRAS (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) que resultam em ganho de função deste oncogene (LEE; CHOI; KIM, 2011; FUNCK-BRENTANO et al., 2016). Mutações nesse gene têm sido associadas com instabilidade cromossômica e cujos níveis de alelos mutantes estão aumentados durante a progressão metastática do melanoma (FUNCK-BRENTANO et al., 2016). A principal mutação neste gene é a substituição de uma leucina por uma glutamina na posição 61 da proteína, sendo que mutações em outras isoformas (HRAS ou KRAS) são consideradas raras em melanoma (WHITWAM et al., 2007; FURUE; KADONO, 2016).

### **1.5 O GENOMA HUMANO: COMPLEXIDADE E SEQUÊNCIAS GENÉTICAS NÃO CODIFICANTES**

Desde os primeiros achados sobre a herança e expressão de características biológicas (MENDEL, 1865) até os mais recentes estudos moleculares e novas tecnologias de sequenciamento de material genético (DERRIEN et al., 2012; SPICUGLIA et al., 2013; GUO et al., 2015), houveram significativos avanços. Em destaque, estão as características e funções de DNA, RNA e proteínas, e as relações que estes possuem entre si. Uma das principais conjunturas a integrar esses conceitos foi o Dogma Central da Biologia Molecular, que define o sentido do fluxo da informação genética como sendo DNA → RNA → PROTEÍNA (CRICK, 1970). Nesta perspectiva, podemos observar o DNA como responsável por armazenar a informação genética, a proteína como efetora das atividades celulares, e o RNA apenas como um intermediário carregando informação de uma molécula a outra (MATTICK; MAKUNIN, 2006). Existe, portanto, este viés histórico em que vemos proteínas e o DNA como principais componentes da célula e do genoma, principalmente pela relativa facilidade em identificar e estudar genes codificantes de proteínas e seus produtos (DERRIEN et al., 2012).

Ainda antes da elaboração do Dogma Central da Biologia Molecular, um raciocínio pode ter influenciado a nossa percepção acerca das moléculas celulares,

quando foi elaborada a teoria “um gene – uma enzima”, em que um trecho de DNA, para ser considerado como gene, deveria possuir capacidade de codificar uma única proteína (BEADLE; TATUM, 1941). Hoje, sabemos que um gene pode dar origem a mais de uma proteína (LANDER et al., 2001; HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUMINTERNATIONAL, 2004), que uma proteína funcional pode ser composta por polipeptídios de diferentes genes (SOWMYA; ANITA; KANGUEANE, 2011; HARDISON, 2012), e que muitos genes não possuem como função a produção de proteínas (CONSORTIUM, 2004; DERRIEN et al., 2012; HARROW et al., 2012).

É importante ressaltar o papel de alguns tipos de RNAs que, embora não codifiquem proteínas, são bastante conhecidos por atuarem no processo de síntese de proteínas, direta ou indiretamente, tais como: RNAs ribossômicos (rRNAs), que participam da formação do complexo de tradução de proteínas; RNAs transportadores (tRNAs), que carregam aminoácidos e paream-se especificamente por trinças no mRNA para a síntese polipeptídica; pequenos RNAs nucleares (snRNAs), envolvidos em diversos processos e principalmente no mecanismo de *splicing* de pre-mRNAs para formação de mRNAs maduros; e pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) que atuam no processamento e modificação química de rRNAs (HOLLEY et al., 1965; LERNER; STEITZ, 1979; MATTICK; MAKUNIN, 2006; ALBERTS, 2015).

A complexidade do genoma humano ficou evidente quando, há menos de duas décadas atrás, surpreendentemente foi revelado que o genoma humano possui aproximadamente 22.000 genes codificantes de proteínas – o que representa apenas 2% de cerca de 3 bilhões de nucleotídeos contidos no DNA (Human Genome Sequencing ConsortiumInternational, 2004; Lander et al., 2001). Quando o genoma humano é comparado com o de outros organismos, podemos notar certa variação no número de genes codificantes de proteínas: alguns eucariotos apresentaram números muito próximos do genoma humano, tal como o mamífero *Mus musculus* ou a Brassicaceae *Arabidopsis thaliana*, em que cada um possui aproximadamente 25.000 genes (BEVAN; WALSH, 2005; GUÉNET, 2005); outros eucariotos apresentam números de genes menores, tal como o nematódeo *Caenorhabditis elegans* com cerca de 19.000 genes ou o artrópode *Drosophila melanogaster* com 13.000 genes, respectivamente (ADAMS et al., 2000; HILLIER et al., 2005); e ainda outros eucariotos mais simples que apresentam números muito maiores de genes

codificantes, tal como o protozoário *Paramecium tetraurelia* com aproximadamente 40.000 genes ou o microcrustáceo *Daphnia pulex* com pelo menos 30.000 genes (AURY et al., 2006; COLBOURNE et al., 2011).

A caracterização do conjunto de genes humanos, em condições de saúde e doença, embora recente na história da genética, sempre encontrou-se cadenciada pela limitação tecnológica e metodológica. Essa limitação, contudo, tentou ser superada recentemente pela utilização de novas tecnologias de sequenciamento – como o sequenciamento de nova geração (NGS) – e análises realizadas por novas abordagens e ferramentas de bioinformática (MEYERSON; GABRIEL; GETZ, 2010; ZHANG et al., 2011). Com estes novos dados provenientes de tecnologias emergentes, houveram indagações sobre o papel desempenhado pelo restante do genoma e que foi atribuído a essas regiões não codificantes. Estes segmentos de DNA não codificante, por muito tempo ficaram conhecidos como “DNA lixo”, conceito originalmente proposto por Susumu Ohno (OHNO, 1972), e genericamente utilizado para descrever regiões que não estavam envolvidas na produção de proteínas e das quais não se tinha conhecimento sobre suas funções (GERSTEIN et al., 2007).

Neste sentido, um dos projetos de maior impacto foi o projeto ENCODE (*The Encyclopedia Of DNA Elements*), com algumas importantes constatações (CONSORTIUM, 2004). Entre as principais novidades, estão: (I) definição de que a maior fração do genoma humano (80,4%) participa, no mínimo, de um evento relacionado a RNA e/ou cromatina; (II) primatas possuem elementos específicos e com evidencia de seleção negativa, predizendo capacidade funcional; (III) muitas variantes que são não codificantes, e estão presentes em sequências genômicas individuais, também se encontram em regiões funcionais anotadas pelo projeto ENCODE; (IV) e que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que estão associadas com doenças, marcadamente por estudos GWAS (*Genome-wide association study*), são enriquecidos dentro de elementos funcionais não codificantes (CONSORTIUM, 2004; BIRNEY et al., 2007; BERNSTEIN et al., 2012). Além disso, outros estudos chegaram a resultados similares e que podem suportar os dados do projeto ENCODE, além de sugerir que grande parte da transcrição pervasiva genômica possa ter funcionalidade (BIRNEY et al., 2007; KAPRANOV et al., 2007; BERRETTA; MORILLON, 2009; CLARK et al., 2011; DJEBALI et al., 2012).

Além do ENCODE, outros estudos baseados na tecnologia de sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-seq) demonstraram que transcritos de regiões não codificantes são majoritários entre os RNAs (excetuando-se rRNA) de células humanas (KAPRANOV et al., 2010; ST. LAURENT; WAHLESTEDT; KAPRANOV, 2015). Além disso, devido às novas metodologias já citadas, foi possível que novos conjuntos de dados de transcriptomas se expandissem, principalmente de consórcios genômicos como o *Functional Annotation of Mammalian Genome* – FANTOM (FORREST et al., 2014), ou o *Genotype-Tissue Expression* – GTEx (LONSDALE et al., 2013).

É cada vez maior o número de evidências sobre a função que RNAs não codificantes de proteínas (ncRNAs) possuem na regulação da expressão gênica em diversos níveis, e seu papel fundamental nos processos celulares e desenvolvimento do organismo, sendo portanto também conhecidos como RNAs regulatórios (EDDY, 2001; ERDMANN et al., 2001; MORRIS; MATTICK, 2014). Os ncRNAs possuem diversas características que os tornam moléculas regulatórias ideais, tal como possuírem mobilidade, síntese e degradação rápidas, capacidade de se ligar a proteínas estruturais ou regulatórias, bem como ao DNA e outros RNAs através da complementaridade de bases (BERRETTA; MORILLON, 2009). Além disso, é sugerido que a transcrição *per se* tem atuação importante na regulação da expressão gênica ao alterar a conformação da cromatina (BERRETTA; MORILLON, 2009).

Dentre os RNAs regulatórios, o grupo que mais teve destaque em eucariotos até então foi o de *small RNAs* (sRNAs), por terem evoluído como maneira de proteger o genoma de ameaças internas e externas, e assim suprimir materiais genéticos indesejados (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009). Os sRNAs são classificados em três tipos: small interfering RNA (siRNA), PIWI-interacting RNA (piRNA) e microRNA (miRNA), e são definidos de acordo com seu comprimento (de até 30 nt), sua associação com proteínas Argonautas (AGO) e quanto a sua função (ISHIZU; SIOMI; SIOMI, 2012; HA; KIM, 2014). Os siRNAs são derivados de dsRNA (RNA de cadeia dupla, do inglês *RNA double stranded*) possuem em média 21 nucleotídeos (nt) de comprimento e atuam na supressão pós-transcricional de transcritos e transposons, além de defesa antiviral (HA; KIM, 2014). Já os piRNAs são derivados de elementos intergênicos repetitivos no genoma, conhecidos como piRNA *clusters*, possuem tamanho variável (24 – 30 nt) e sua principal função é silenciar elementos

transponíveis em linhagens germinativas (ISHIZU; SIOMI; SIOMI, 2012; HA; KIM, 2014). Os miRNAs são gerados a partir de pequenos *hairpins* de RNA, possuem cerca de 22 nt de comprimento, e sua principal atividade é regular negativamente os níveis de mRNAs alvos (GUO et al., 2010; AMERES; ZAMORE, 2013).

Notavelmente, os miRNAs tem chamado a atenção da comunidade científica mundial nas ultimas décadas por seu papel na modulação da expressão gênica (AMERES; ZAMORE, 2013). Para a efetiva regulação da expressão gênica, os miRNAs não atuam isoladamente, mas participam da composição do complexo ribonúcleoproteico RISC (do inglês - *RNA-induced silencing complex*). Assim, eles atuam como 'guias' através principalmente do pareamento de suas bases na região 3'UTR do mRNA alvo, permitindo a ação de proteínas AGO e do complexo RISC na repressão traducional, deadenilação e decaimento de mRNA (AMERES; ZAMORE, 2013; HA; KIM, 2014). O seu modo de agir, contudo, é dependente do tipo de complementaridade das sequências do mRNA alvo e do miRNA: se o pareamento acontecer de modo parcial poderá induzir a repressão traducional ou instabilidade do mRNA, enquanto que o pareamento completo leva o mRNA a degradação (HE; HANNON, 2004). Desde sua descoberta em *C. elegans*, há mais de duas décadas (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993) até o presente momento, são conhecidos 1881 miRNAs anotados no genoma humano (<http://www.mirbase.org/>, acessado em 20/03/2016), e sua caracterização em doenças, tal como doenças relacionadas ao sistema imunológico ou neurogenerativas, é cada vez mais detalhado (LI; KOWDLEY, 2012).

O papel dos miRNAs como oncogenes ou genes supressores de tumor e sua atuação no desenvolvimento de tumores é bem estabelecido (ZHANG et al., 2007). Já são descritos diversos tipos de miRNAs cuja inibição pode estimular o crescimento celular e inibição de apoptose (CHENG et al., 2005). Atualmente, a desregulação da expressão de miRNAs e o processo tumoral são extremamente correlacionados, para diversos tipos de câncer, tais como: glioblastoma (MIZOGUCHI et al., 2013), câncer de mama (IORIO et al., 2005) e de pulmão (LIN; YU; YANG, 2010), carcinoma de tiróide (HE et al., 2005), câncer colorretal (SCHETTER; OKAYAMA; HARRIS, ) e de próstata (WALTER et al., 2013), entre diversos outros (CALIN; CROCE, 2006; RUAN; FANG; OUYANG, 2009; HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014; LIN; GREGORY, 2015).

## 1.6 RNAs LONGOS NAO CODIFICADORES (lncRNAs)

Dentre os RNAs regulatórios, os RNAs longos não-codificadores (em inglês, *long noncoding RNAs* - lncRNAs) se mostram cada vez mais envolvidos na regulação da expressão gênica, tal como o lncRNA XIST (do inglês, *X inactive specific transcript*), que é um dos mais estudados, e atua em mecanismos epigenéticos da compensação de dose em mamíferos (BROWN et al., 1991; PRENSNER; CHINNAIYAN, 2011). Existem outros exemplos bem conhecidos, tal como os lncRNAs AIR (*antisense of IGF2R non-protein coding RNA*), que atua regulando um *cluster* de genes autossômicos do cromossomo 17 (SLEUTELS; ZWART; BARLOW, 2002), e H19 (H19, *imprinted maternally expressed transcript*), que atua no crescimento celular (GABORY et al., 2009), sendo ambos importantes para o *imprinting* genômico (NAGANO et al., 2008; CHEN; DHUPELIA; SCHOENHERR, 2009).

De modo genérico, os lncRNAs podem ser definidos como transcritos endógenos que apresentam tamanho >200 nt de comprimento, e que não tenham sido preditos como portadores de região codificadora de proteínas (Derrien et al., 2012). Em sua maior parte, os lncRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (também ocorre pela RNA polimerase III), sofrem *splicing*, poliadenilação na região 3' (cauda poli-A) e recebem capeamento (cap 5') de 7-metil-guanosina na extremidade 5' (NIE et al., 2012).

Na era pós-ENCODE, para melhor entendimento sobre a biogênese e função dos lncRNAs foram realizados estudos de caracterização dos aspectos biológicos e genômicos por meio de comparação com genes codificantes de proteínas (MERCER; MATTICK, 2013; MUDGE; FRANKISH; HARROW, 2013; ULITSKY; BARTEL, 2013). Deste modo, foram elencadas as principais semelhanças entre estes tipos de transcritos, tais como: vias de síntese, perfis de modificação de histona, *splicing*, influência de pressão seletiva (principalmente em regiões promotoras) e comprimentos de exons/introns; além do mais, as diferenças mais marcantes presentes em lncRNAs, como: predominância no núcleo e cromatina, padrão de expressão em menor quantidade e mais específica nos tecidos (GUTTMAN et al., 2009; CABILI et al., 2011; DERRIEN et al., 2012).

A classificação de lncRNAs, particularmente, carece de classificação conceitual não ambígua, levando a desafios de anotação e interpretação dos dados obtidos do transcriptoma (ST. LAURENT; WAHLESTEDT; KAPRANOV, 2015). Embora sejam relativamente recentes os estudos realizados com lncRNAs, até o presente momento são anotados 15941 genes de lncRNAs humanos, que podem ser encontrados e analisados no banco de dados públicos GENCODE – versão 24, (<http://www.genencodegenes.org/stats/archive.html#a24>, acessado em 14/11/2015). Deste total, somente cerca de 180 lncRNAs (~1%) foram anotados funcionalmente (<http://lncrnadb.org/>, acessado em 25/03/2016). Estes números reforçam os desafios que existem na análise destes lncRNAs, quando comparados com os transcritos codificantes de proteínas (AMARAL et al., 2011; MUDGE; FRANKISH; HARROW, 2013; CHU; SPITALE; CHANG, 2015; QUEK et al., 2015). Os 5 principais tipos de lncRNAs encontrados nas amostras deste trabalho, e sua possível representação genômica encontra-se abaixo (Figura 4).

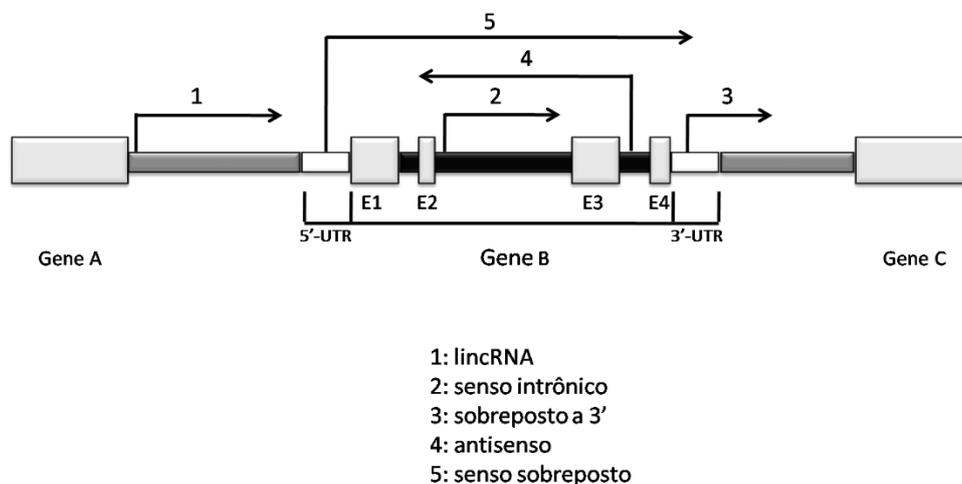


Figura 4 – Representação da transcrição dos lncRNAs encontrados neste trabalho. As caixas brancas largas simbolizam os genes (Exons) e as caixas mais finas representam os introns. As setas indicam origem e sentido da transcrição.

Embora muitos lncRNAs tenham sido identificados, é difícil afirmar que tenham sido completamente anotados para todos os organismos, bastando observar a crescente anotação destes conforme os anos (<http://www.genencodegenes.org/stats/archive>, acessado em 14/11/2015). Os

lncRNAs já foram identificados em diversos organismos com relativa abundância, desde eucariotos invertebrados como *C. elegans* (NAM; BARTEL, 2012) e levedura (YAMASHITA; SHICHINO; YAMAMOTO, 2016), bem como em organismos vertebrados como *Danio rerio* (PAULI et al., 2012), *Gallus gallus* (LI et al., 2012), e em camundongo (GUTTMAN et al., 2009). Estes estudos com modelos animais, além de se tratarem de uma viabilidade para avaliação de mecanismos moleculares *in vivo*, são úteis para estudos sobre doenças e papel evolutivo dos lncRNAs (PONTING; OLIVER; REIK, 2009; CHODROFF et al., 2010; KARRETH et al., 2011; PAULI et al., 2012). Neste sentido, os lncRNAs podem constituir uma característica ancestral do sistema regulatório dos metazoários que evoluíram antes mesmo da divergência entre os clados de poríferos e eumetazoários (GAITI et al., 2015)

Com isso, embora teoricamente recentes, os lncRNAs se revelaram como uma fundamental parte da informação genômica dos organismos (MORRIS; MATTICK, 2014), e que já demonstraram papéis fundamentais em muitos processos biológicos. Entre os principais mecanismos de atuação estão: interação com outros fatores e formação dos complexos de modificação de cromatina (KHALIL et al., 2009; TSAI et al., 2010; GUTTMAN et al., 2011); competição endógena com mRNA por sítios alvo de reconhecimento e ligação de miRNA (CESANA et al., 2011; KARRETH et al., 2011; SALMENA et al., 2011; SUMAZIN et al., 2011; TAY et al., 2011); auxílio no recrutamento de RNA para vias de degradação (GONG; MAQUAT, 2011); e atuação como isca para fatores de transcrição ou de *splicing* (KINO et al., 2010; TRIPATHI et al., 2010).

Deste modo, por meio de ampla expressão e versatilidade, os lncRNAs podem ser considerados reguladores chaves da expressão gênica, bem como exercem importante influência no desenvolvimento do câncer (NIE et al., 2012). A atuação dos lncRNAs na biogênese do câncer como responsável pela função oncogênica ou de supressor tumoral já foi relatada diversas vezes (HUARTE; RINN, 2010; PRENSNER; CHINNAIYAN, 2011). Dentre os lncRNAs já relatados como oncogênicos, pode ser destacado o lncRNA MALAT1 (*metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*), que possui ~ 8,5 kb e desempenha papel fundamental na proliferação celular, migração e invasão (JI et al., 2003). Este lncRNA está superexpresso nos tumores de pulmão, próstata, fígado cólon e mama (JI et al., 2003; LUO et al., 2006; LIN et al., 2007; GUFFANTI et al., 2009; SCHMIDT et al.,

2011; NIE et al., 2012). Além disso, outros como o lncRNA PRNCR1 (*prostate cancer non-coding RNA1*) ou o PCGEM1 (PCGEM1, *prostate-specific transcript*), estão altamente expressos em amostras de câncer de próstata (SRIKANTAN et al., 2000; CHUNG et al., 2011).

Já para os transcritos supressores tumorais, um dos lncRNAs mais estudados é o MEG3 (*maternally expressed 3*), que é um regulador positivo da proteína P53 (*tumor protein p53*), e cuja expressão está inativada em tumores de glândula pituitária (CHUNHAROJRITH et al., 2015), meningioma (ZHANG et al., 2010) e carcinoma de tireóide (WANG et al., 2015). Além disto, existem outros lncRNAs relacionados a proteína P53, como lincRNA-p21, que apresenta aumento de sua expressão ao ser induzido por P53 responsiva a danos no DNA (HUARTE et al., 2010; HALL et al., 2015). Outro lncRNA associado a danos no DNA é o PANDA (P21 *associated ncRNA DNA damage activated*), que não pode ser ativado na ausência de P53, pois esta se liga diretamente ao locus do gene CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), promovendo a parada do ciclo celular e regulando o controle do crescimento celular (WANG; CHANG, 2011). Existem muitos lncRNAs relacionados a carcinogênese e, como observado até o momento, os mecanismos de ação são diversos. Caracterizar os domínios de interação de lncRNAs, bem como compreender os mecanismos destes na tumorigênese, metástase e progressão do câncer são desafios que requerem maiores investigações (NIE et al., 2012).

Portanto, embora o genoma dos mamíferos seja transcrito de modo pervasivo e a funcionalidade para os lncRNAs ainda seja controversa, existem lncRNAs bem estudados que permitem inferir importantes funções e processos mecanísticos destas moléculas (KUNG; COLOGNORI; LEE, 2013). Além disso, mesmo que a maior parte dos lncRNAs seja transcrita, existem poucos destes com funções ou características descritas (KUNG; COLOGNORI; LEE, 2013). Assim, existe muito a se conhecer ainda sobre este tipo de transcrito e ainda há muito para ser compreendido sobre a complexa biologia dos lncRNAs (GLOSS; DINGER, 2015).

## 1.7 RNAs LONGOS NÃO CODIFICADORES NA HOMEOSTASE DA PELE E A INDUÇÃO DO MELANOMA

Recentemente, o número de estudos voltados para identificação e caracterização de lncRNAs no câncer de pele, revelaram importantes atuações destas moléculas no desenvolvimento deste tipo de câncer. Segundo Hombach & Kretz (2013), podemos dividir lncRNAs entre aqueles envolvidos com a manutenção da homeostase da pele e aqueles que regulam a transição para estados enfermos (HOMBACH; KRETZ, 2013).

Na manutenção da homeostase, o lncRNA ANCR (*anti-differentiation ncRNA*) apresenta papel regulatório na repressão do programa de diferenciação epidermal, mantendo um estado indiferenciado na camada basal da epiderme (KRETZ et al., 2012). A propósito, já foi demonstrado que o bloqueio da expressão de ANCR endógeno resulta na diferenciação de osteoblastos, enquanto sua superexpressão inibe esta diferenciação (ZHU; XU, 2013). Além disto, o lncRNA TINCR (*terminal differentiation-induced ncRNA*) também já foi apresentado como controlador da diferenciação epidermal por mecanismos pós-transcricionais, através da interação com mRNAs de genes importantes, determinantes em doenças cutâneas (KRETZ et al., 2013).

Já no caso de lncRNAs envolvidos em doenças, um dos primeiros identificado em melanoma é o lncRNA BANCR (*BRAF-activated non-coding RNA*), que está altamente expresso em melanomas malignos (LI et al., 2014). Este lncRNA possui 693 pb, está localizado no cromossomo 9 e sua repressão através de siRNA reduz a migração de células de melanoma (FLOCKHART et al., 2012; LI et al., 2014). Além disso, o lncRNA intrônico SPRY4-IT1 é derivado do gene SPRY4 (*sprouty RTK signaling antagonist 4*) e foi encontrado em baixa expressão em melanócitos humanos normais, mas se apresenta enriquecido em células tumorais de melanoma, sendo relacionado a invasão, proliferação e apoptose destas células (KHAITAN et al., 2011; MAZAR et al., 2014).

Como descrito anteriormente, os recentes avanços tecnológicos culminaram na descoberta de novos lncRNAs envolvidos em processos biológicos, bem como em diversos tipos de câncer. Com este crescente cenário, os lncRNAs envolvidos no surgimento e progressão de diversos tipos de câncer, e mais recentemente, no melanoma, começaram a ser revelados. Portanto, a análise de lncRNAs no

transcriptoma de modelos de progressão tumoral de melanoma passa a ser uma maneira eficiente de identificação de lncRNAs envolvidos no processo tumorigênico e metastático.

Levando em consideração a existência de lncRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica em situações de saúde e de câncer, hipotetizamos que devem existir de novos lncRNAs que possam estar associados ao surgimento e progressão do melanoma.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a expressão de lncRNAs que possam estar associados aos mecanismos de desenvolvimento do câncer, em linhagens celulares de melanoma humano em diferentes estágios de um modelo *in vitro* de progressão do câncer.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar quantitativamente a expressão de lncRNAs em linhagens celulares de melanócitos, melanoma primário e melanoma metastático;
- Identificar os níveis de expressão do lncRNA HOTAIR e verificar se este lncRNA está correlacionado com a progressão deste modelo de melanoma para estágios mais avançados;
- Avaliar e selecionar lncRNAs que estejam diferencialmente expressos em linhagens celulares de melanócito e melanoma e com potencial envolvimento em processos biológicos relacionados ao câncer para realização de estudos funcionais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Este trabalho foi aprovado em comitê de ética específico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP/USP sob o número CAAE 42991615.8.0000.5440 e dispensa de termo de consentimento livre e esclarecido por trabalhar com linhagens celulares já estabelecidas (Apêndice I).

#### 3.2 CULTIVO DE LINHAGENS CELULARES

Para realização deste estudo foram utilizadas linhagens celulares que representam as principais fases do modelo de progressão do melanoma. Estas linhagens celulares são provenientes do instituto Wistar (The Wistar Institute, Philadelphia) e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer (FMRP-USP). As etapas da progressão do melanoma e as respectivas linhagens celulares que representam o modelo são: melanócito (MELC) composto pela linhagem primária FM308, extraída de prepúcio de neonato sem displasia; melanoma primário (PRIM), em que constam as linhagens celulares WM35, WM1552 e WM902; e melanoma metastático (MET), representado pela linhagem WM9.

As linhagens celulares de melanoma foram cultivadas em meio composto TU (80% de meio de cultura MCDB-153, 20% de meio de cultura Leibovitz's L-15, 5µg/mL de Insulina e 1.6mM de CaCl<sub>2</sub>) suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. A linhagem de melanócito foi cultivada em meio para cultivo de melanócitos MEDIUM 254 CF (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), e mantida sob as mesmas condições de umidade e temperatura.

### 3.3 RNA-SEQ

#### 3.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit de extração *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (QIAGEN, Venlo, Holanda)*, seguindo as orientações do fabricante. A quantificação inicial das amostras de RNA bruto foi realizada utilizando 2µL de RNA bruto para análise de densidade óptica, e sua pureza foi atestada pela razão 260/280nm, sendo estas medidas realizadas no espectrofotometro NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). O RNA bruto foi ainda submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% para verificar possível degradação, atestada pela visualização de bandas específicas (RNA 18S e 28S).

#### 3.3.2 ANÁLISE DE INTEGRIDADE DO RNA, CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO

Para análise da integridade do RNA, foi realizada a quantificação através do Sistema RNA QuantiFluor (Promega Corporation), em que corantes fluorescentes se ligam ao RNA e permitem a quantificação de pequenas frações de RNA em solução, sendo utilizado principalmente por se tratar de método extremamente sensível para aplicações da biologia molecular. Foi utilizado 300ng de RNA para avaliação de sua integridade através do equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este equipamento atribui às amostras um valor de integridade do RNA – *RNA Integrity Number (RIN)* – baseado nos valores obtidos por eletroforese realizada em *chip*, e cujo software analisa fluorescência versus tamanho/migração, resultando em um eletroferograma para cada amostra. Somente amostras com RIN  $\geq 7$  foram utilizadas para a preparação da biblioteca, que foi construída utilizando o kit de preparo de amostra *TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Illumina Inc.)*.

Esta plataforma e subsequente protocolo são amplamente utilizados para esta finalidade e apresentam bons resultados quando comparados a outros (LEVIN et al., 2010). A partir do RNA total extraído das linhagens foi realizado a fragmentação e depleção do rRNA utilizando-se seleção *RiboZero* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Em seguida foi sintetizado o DNA complementar (cDNA), utilizando

hexâmeros randômicos e a enzima *Superscript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA). O cDNA foi purificado utilizando-se esferas paramagnéticas (*AMPure XP beads*, Beckman Coulter). Foram ligados adaptadores e realizada uma PCR para enriquecer seletivamente os fragmentos de cDNA na biblioteca.

A clusterização foi realizada utilizando o equipamento com sistema automatizado *cBot*. A clusterização pelo *cBot* amplifica isotermicamente fragmentos de cDNA que foram capturados por oligonúcleotídeos adaptadores complementares que estejam covalentemente ligados à superfície da *flowcell*. As bibliotecas diluídas e clusterizadas foram sequenciadas com o TruSeq SBS kit v5, *single-read* de 72 ciclos em equipamento *Genome Analyzer Iix*. Todos os equipamentos e reagentes utilizados para o RNA-seq foram obtidos de Illumina Inc., San Diego, CA, USA, e foram utilizados de acordo com seus protocolos de utilização (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

### 3.4 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

#### 3.4.1 CHAMADA DE BASES, MAPEAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANOTAÇÃO DE GENES E TRANSCRITOS

As imagens obtidas pelo sequenciador foram tratadas e convertidas para arquivos com sequências de nucleotídeos e informações de qualidade das bases nitrogenadas (arquivos do formato “.bcl”). Através do software CASAVA v.1.8 (*Illumina*) os arquivos “.bcl” foram convertidos para arquivos “FASTQ” que são compatíveis com os algoritmos de mapeamento. Em seguida, foi utilizada a ferramenta “FASTQC” para controle e verificação da qualidade dos dados de sequências.

Desta forma os dados brutos foram devidamente processados e alinhados com o genoma de referência hg19 (UCSC) utilizando o algoritmo “*Tophat*” v.2.0.3 (Trapnell, Pachter and Salzberg, 2009). O TopHat alinha as *reads* de RNA-Seq com o genoma de referência utilizando o alinhador de *reads* curtas *Bowtie2* (Langmead and Salzberg, 2012) e analisa os resultados de mapeamento para identificar junções de *splicing* entre os éxons. O arquivo de saída será no formato “.BAM” (SAM tools; Li et al., 2009), e este conterá toda a informação do alinhamento realizado.

A anotação dos transcritos, isto é, associação de sequências genéticas (dados brutos das amostras) às IDs de genes e transcritos de bancos de dados, foi baseada nos dados públicos do projeto GENCODE *Release 19* (GRCh37). O consórcio GENCODE para anotação definitiva de elementos funcionais no genoma humano é considerado um dos principais projetos de anotação do genoma humano (HARROW et al., 2006). Através do download de arquivos “.gtf” que possuem dados de localização genômica para cada transcrito ou gene, foi possível identificar em cada amostra os transcritos já conhecidos. O GENCODE possui em seu completo banco de dados um conjunto de genes anotados (ANEXO I) automaticamente e/ou manualmente pelos grupos ENSEMBL e HAVANA/VEGA, respectivamente (HUBBARD, 2002; WILMING et al., 2008; HARROW et al., 2012).

### 3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Após mapeamento das *reads*, foi utilizada a ferramenta *HTSeq count* (ANDERS; PYL; HUBER, 2014), que processa dados de RNA-seq através da contagem de *reads* que não sobrepõem os genes, para estimar as abundâncias dos transcritos. Foi utilizada a ferramenta *SAMtools* (LI et al., 2009) para conversão dos arquivos no formato “BAM” para “SAM” – formato *input* padrão para o *HTSeq count*. Esta abordagem pode fazer com que os valores possam ser menores do que aqueles relatados por outros instrumentos. De fato, esta característica é importante, pois esta ferramenta é primariamente indicada para utilização em expressão diferencial de genes. Deste modo, torna-se necessário o descarte de *reads* ambíguas para evitar que o sinal diferencial em um gene apareça em outro gene que se sobrepõe (<http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/count.html>).

Para este estudo, a análise da expressão diferencial e processamento dos dados foram realizados utilizando pacotes disponíveis na linguagem de programação estatística R versão 3.2.2 (R Core Team, 2015). O pacote utilizado para manipulação e obtenção desses dados foi o *DESeq2*, que encontra-se disponível na plataforma *Bioconductor* (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Este pacote permite testar a expressão diferencial pelo uso de modelos generalizados de distribuição binomial negativa e estimar a dispersão e *fold change* logarítmico (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014).

### 3.4.3 UTILIZAÇÃO DE DADOS PÚBLICOS E TRATAMENTO DE ARQUIVOS

Para viabilizar a significância estatística de determinadas análises, foi realizado o *download* de dados públicos do repositório público internacional *Gene Expression Omnibus* (GEO). Esta plataforma arquiva e distribui livremente dados de microarranjo, sequenciamento de última geração e outros tipos de dados genômicos funcionais de alto rendimento submetidos pela comunidade científica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, acessado em 22/10/2015). Foram baixados dados de sequências nucleotídicas de linhagens celulares de melanócito (n=1), melanoma primário (N=1) e melanoma metastático (N=6). Essas linhagens celulares de melanoma são bem estabelecidas, sendo representante do melanoma primário a linhagem celular A375 e do melanoma metastático A2058, c32, MalMe3M, SKMEL28, SKMEL5 e WM2664. Todos estes dados são provenientes do trabalho de Pawlikowski *et al.* (2013), e estão disponíveis on-line.

Os dados provenientes do repositório foram transferidos para nosso servidor central no formato “.sra “. Para possibilitar a utilização destes dados com as amostras deste trabalho foi necessário realizar a conversão dos arquivos para o formato “.fastq”, sendo então compatíveis com os passos seguintes a serem realizados posteriormente. Esta conversão foi realizada utilizando-se a ferramenta SRA Toolkit (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?cmd=show&f=software&m=software&s=software>, acessado em 03/10/2015). É válido lembrar que a escolha destes dados levou em consideração a compatibilidade de plataformas utilizadas em ambos os trabalhos, bem como a escolha da metodologia de sequenciamento.

### 3.5 SÍNTESE DE cDNA E PCR EM TEMPO REAL- QUANTITATIVA (qRT-PCR).

Para quantificação dos valores relativos de abundância do lncRNA HOTAIR foi utilizado RNA total (de acordo com a concentração de cada amostra) para transcrição reversa e produção de volume final de 25ul de cDNA em concentração de 500 ng/ul, através do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Assim, foi preparado o cDNA para realização de qRT-PCR realizada

em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham). Foram utilizadas sondas provenientes da Life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) para o Hotair. As amostras e o controle endógeno foram realizadas em duplicatas. O controle endógeno utilizado foi HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*). O seguinte ciclo foi utilizado: 95°C (10 minutos), seguidos de 40 ciclos de 95°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto).

### 3.6 DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE PRIMERS

Foi selecionado um mRNA e dois lncRNAs encontrados nas amostras (incluindo um diferencialmente expresso) para validação da expressão nas amostras de melanoma. Os primers para estes lncRNAs foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer3* (KORESSAAR; REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012) e testados quanto à capacidade de especificidade e pareamento com a ferramenta computacional In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Estes padrões utilizados permitem otimizar o design de primers para os alvos (APÊNDICE B e C). As sequências dos primers estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2– Sequências dos primers utilizados na PCR semi quantitativa.

NOME DO GENE	ID DO GENE	ID DO TRANSCRITO	SEQUENCIA
SSU72 (codificante)	ENSG00000160075	ENST00000291386	F: 5'-gactcacgtgaagcttccag-3' R: 5'-acaggtatgtcgggaagtgc-3'
SSU72 (intron_retained)	ENSG00000160075	ENST00000378726	F: 5'-aggggagaggtctgggtaga-3' R: 5'-acaggtatgtcgggaagtgc-3'
AC017074 (lincRNA)	ENSG00000227359	ENST00000424612	F: 5'-agagtcccacctcaaagca-3' R: 5'-actgaactgggaggcagag-3'
TUBB (controle)	ENSG00000196230	ENST00000327892	F: 5'-tcaacactttctcagtgaacg-3' R: 5'-agtgccagtgccaactcatc -3'

### 3.7 PCR SEMIQUANTITATIVA (PCR-SQ)

Foi utilizada a técnica da PCR-SQ para verificar a expressão parcial dos transcritos selecionados e validação dos achados. Foi realizada a diluição seriada de cDNA das amostras WM35 e WM1552 em água esteril e estas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1,5%). Embora esta técnica não permita uma quantificação absoluta (tal como uma qPCR), é possível estimar a amplificação das moléculas em cada amostra, pois o produto de PCR final é relativo à fase exponencial (em que o número de cópias é função da quantidade inicial de moléculas). Foram realizadas diluições seriadas, iniciando com a diluição de 20 µL de cDNA em 20 µL de H<sub>2</sub>O estéril, homogeneizando, retirando 20 µL e repetindo o procedimento até obter as diluições para 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. Após a última diluição o volume final excedente foi descartado.

A PCR foi realizada utilizando-se 12,5 µL do mix JumpStart REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich Company), 1,5 µL de primer *forward*, 1,5 µL de primer *reverse*, e 7,5 µL de H<sub>2</sub>O. O seguinte ciclo foi utilizado para a realização da PCR: 95°C (10 minutos), seguidos de 40 ciclos de 94°C (5 minutos), 94°C (1 minuto), temperatura de *annealing* (1 minuto), 72°C (1 minuto) e 72°C (5 minutos).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TRANSCRIPTOMA DE LINHAGENS CELULARES DE MELANÓCITO E MELANOMA

#### 4.2 ANÁLISE DE DADOS - BIOINFORMÁTICA

##### 4.2.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DO TRANSCRIPTOMA E DA QUALIDADE DO SEQUENCIAMENTO

A acurácia da chamada de bases foi avaliada pela escala de qualidade Phred, e, então, as reads foram mapeadas com o genoma referência, obtendo-se média de mapeamento de 93,1% do total de reads obtidas (Tabela 3).

Tabela 3 – Reads obtidas e reads mapeadas ao genoma referência, por amostra.

<b>Reads</b>	<b>FM308</b>	<b>WM35</b>	<b>WM1552</b>	<b>WM902</b>	<b>WM9</b>
<b>Input</b>	56615826	55502396	58453123	77051232	130360832
<b>Mapped</b>	53208928	52863166	55531941	73128789	112623682
<b>Total</b>	94.0%	95.2%	95.0%	94.9%	86.4%

A partir das *reads* mapeadas, primeiramente foi realizado a quantificação dos transcritos. Para facilitar a análise e compreensão dos dados, foram feitas triagens através de filtros personalizados e agrupamentos dos transcritos semelhantes. Deste modo, inicialmente houve separação dos RNAs codificantes dos transcritos ncRNAs.

Na análise do transcriptoma, foi encontrado um maior número de mRNAs em relação aos ncRNAs, sendo totalizado um valor absoluto 329873 e 172215 transcritos, respectivamente (Figura 5). Na fração dos RNAs não codificadores de proteínas, os lncRNAs estão majoritários em abundância quando comparados com os demais ncRNAs, chegando a somar 95% dos transcritos dessa fração (Figura 5). No gráfico de pizza da esquerda há a comparação dos RNAs codificantes (em preto) versus ncRNAs (em cinza). No gráfico de pizza da direita podemos ver a identificação

da fração respectiva de cada tipo de ncRNA encontrado nas amostras, com destaque para o valor mais abundante de lncRNAs.

Para a análise mais bem detalhada da composição do transcriptoma não codificante das linhagens celulares, os transcritos foram separados entre lncRNAs e “*small*s ncRNAs - sRNAs”. O grupo de sRNAs é composto por: pequenos RNAs nucleares (snRNAs); pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs); microRNAs (miRNAs); RNAs ribossômicos (rRNAs) e RNAs miscelânea (miscRNA). Todos esses *small*s ncRNAs foram avaliados em conjunto com demais transcritos de menor importância para este trabalho como *pseudo\_RNAs*, *IG\_RNAs* e *TR\_RNAs* (Figura 5). Nesta avaliação, houve prevalência da expressão de *pseudo\_RNAs* (em média 88,2%), seguido pela expressão de *miscRNAs* (em média 5,6%) e com os demais transcritos em relativas baixas abundâncias (Figura 6 e Tabela 4). Entre os lncRNAs, podemos observar a prevalência do tipo *retained\_intron* nas linhagens celulares sendo seguido em abundância pelo transcrito do tipo antisense e lincRNA. Os demais tipos de RNAs foram encontrados em abundâncias relativamente menores.

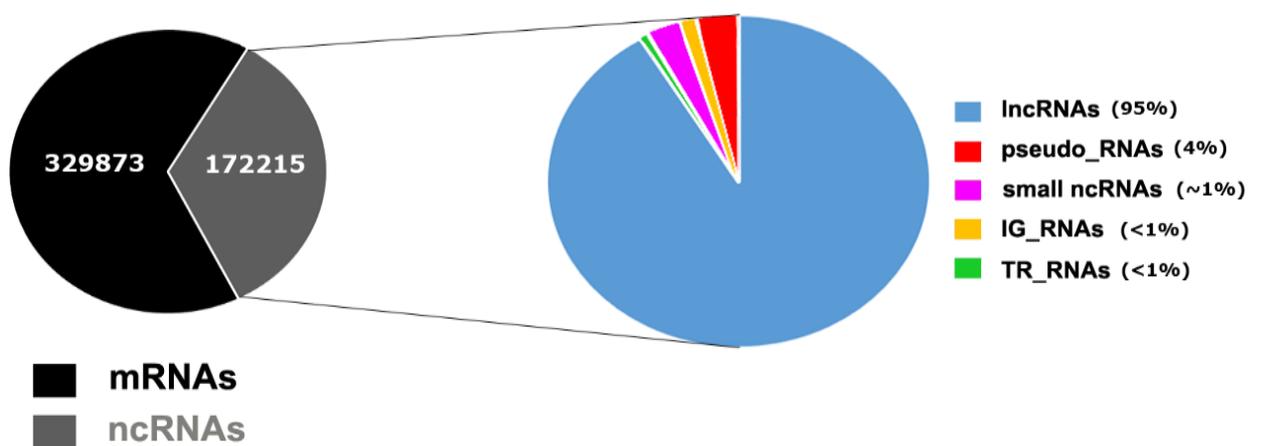


Figura 5 – Perfil do transcriptoma das 4 linhagens celulares de melanoma e uma linhagem de melanócito.

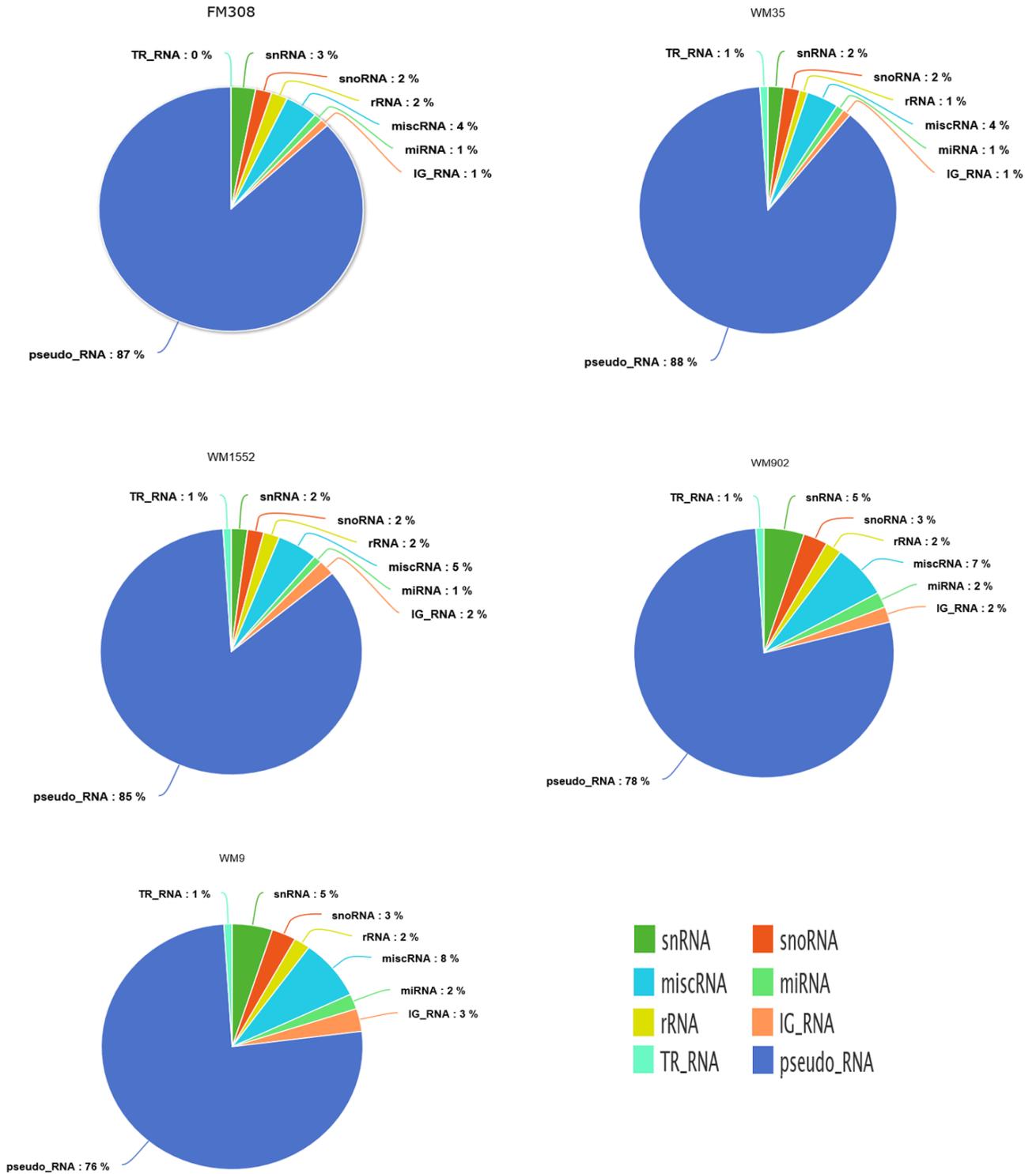


Figura 6 - Proporção de ncRNAs encontrados nas linhagens celulares, por amostra. A fração mais abundante é de miRNAs, possuindo valores acima de 75% em todas as amostras.

Tabela 4 – Quantidade de RNAs diferentes encontrados, por amostra. Valores representam número de IDs únicos para cada tipo de RNA encontrado.

	snRNA	snoRNA	rRNA	miscRNA	miRNA	IG_RNA	pseudo_RNA	TR_RNA
<b>FM308</b>	34	27	23	55	10	8	1088	2
<b>WM35</b>	33	21	20	51	13	20	1160	7
<b>WM902</b>	91	56	28	128	39	42	1420	11
<b>WM1552</b>	38	26	23	81	15	36	1326	19
<b>WM9</b>	117	69	35	164	48	58	1613	19

#### 4.2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DE LNCRNAs

A análise da fração de ncRNAs permitiu identificar a presença majoritária de lncRNAs (Figura 5). As diferentes classes de lncRNAs foram identificadas de acordo com a anotação para tipos de transcritos utilizada pelo GENCODE/ENSEMBL/VEGA e então analisadas entre as amostras.

Dentro da classe lncRNAs, foi observado a prevalência em número de transcritos do tipo *retained\_intron*, com um total de 109815 transcritos. O segundo mais abundante tipo de transcrito encontrado foi do tipo *antisense*, com 28562 transcritos, seguido pelos demais tipos de transcritos e suas respectivas quantificações: *lincRNA* (23152), *sense\_intronic* (1675), *sense\_overlapping* (871) e *3prime\_overlapping\_ncrna* (65) (Figura 7).

Tabela 5 – Tipos de lncRNAs\* encontrados nas amostras.

	3prime_overlapping_ncrna	antisense	lincRNA	Retained_intron	sense_intronic	sense_overlapping
FM308	12	4882	3472	21165	292	140
WM35	13	5063	3576	21527	248	151
WM902	13	6176	5147	22119	387	185
WM1552	12	5750	4778	22368	338	186
WM9	15	6691	6179	22636	410	209

\*Classificação baseada no GENCODE

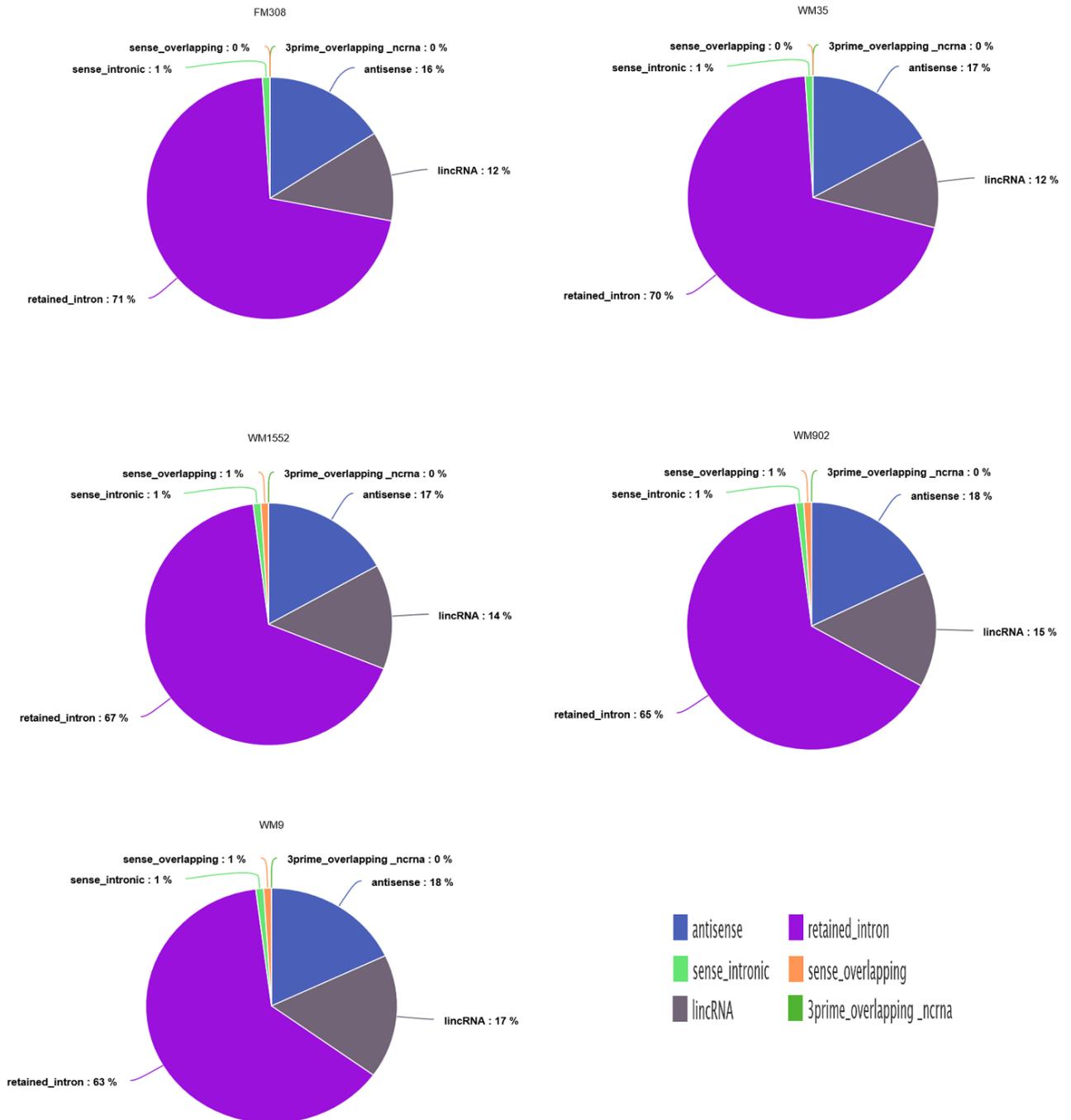


Figura 7–Proporção e tipos diferentes de lincRNAs encontrados nas amostras de melanoma e melanócito.

### 4.2.3 lincRNAs exclusivos e compartilhados entre as amostras

Para identificar lincRNAs exclusivos e compartilhados entre as amostras foram analisados todos os transcritos expressos e produzido o diagrama de Venn. O resultado encontrado foi de que todas as amostras apresentaram expressão de transcritos exclusivos (Figura 8). As linhagens celulares e suas respectivas

quantificações de lncRNAs exclusivos foram: FM308 (362), WM9 (1032), WM35 (349), WM902 (65) e WM1552 (1550). Um total de 25448 lncRNAs foram compartilhados entre todas as amostras de melanoma e melanócito. As linhagens celulares de melanoma (excetuando-se o melanócito) apresentaram 1698 lncRNAs compartilhados. O maior número de lncRNAs compartilhados entre duas amostras é o das linhagens mais avançadas de melanoma (WM9 e WM902), com um total de 1769 lncRNAs compartilhados.

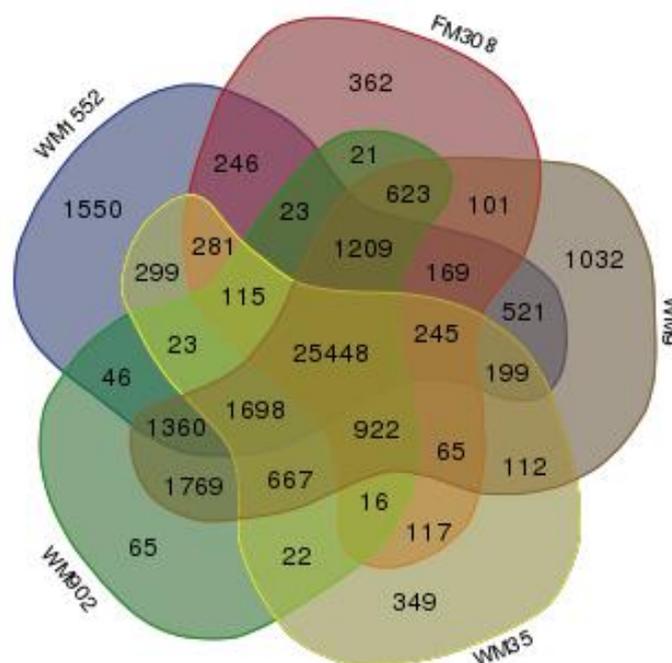


Figura 8 – lncRNAs exclusivos e compartilhados entre as amostras.

#### 4.2.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO LNCRNA HOTAIR

O lncRNA HOTAIR (*HOX transcript antisense RNA*) vem sendo amplamente estudado e aparece em altos níveis de expressão em diversos tipos de câncer, sendo envolvido com o processo de invasão e progressão tumoral, metastase e prognóstico ruim tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (WU et al., 2014). O gene HOTAIR está localizado no *cluster* do gene homeobox C (HOXC) no cromossomo 12, sendo co-expresso com os genes HOXC. O lncRNA HOTAIR é repressor do gene homeobox D (HOXD) e notavelmente promotor de metastase em câncer de mama devido a sua interação com o Complexo Repressivo Polycomb 2 (PRC2) através de metilação (H3K27me3)

de histonas (RINN et al., 2007; GUPTA et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Nosso grupo demonstrou recentemente o papel do HOTAIR em linhagens celulares tumorais e sua capacidade de desencadear a transição epitelio-mesenquimal (EMT), provendo *insights* sobre os mecanismos de ação deste lncRNA (PÁDUA ALVES et al., 2013). Em revisão a literatura, foi encontrado em trabalhos anteriores que o HOTAIR também possui associação ao melanoma (TANG et al., 2013).

A análise comparativa da expressão do HOTAIR no RNA-seq e sua abundância foi estimada por duas ferramentas bioinformáticas diferentes: HTSeq, que retornou baixos valores de *count reads* para as amostras (Tabela 6); e Cufflinks, que apresentou valores de abundância relativa (*Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped* – FPKM) também em níveis relativamente baixos para as isoformas de HOTAIR (Tabela 7).

Segundo o banco de dados do Ensembl, o gene HOTAIR apresenta 5 isoformas. Destas, apenas uma apresentou expressão relativamente alta: trata-se do transcrito ENST00000424518.1, que possui 2421 pb e 7 exons, sendo considerado a maior isoforma do gene HOTAIR. Se analisarmos a expressão desta isoforma (mais relevante devido a sua abundância) nas amostras por HTSeq, e arbitrariamente atribuirmos um limiar de expressão relativa acima de 25 *count reads*, será possível observar todas as amostras de melanoma estão acima deste valor e o melanócito permanece com valor muito baixo (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de *count reads* das diferentes isoformas do HOTAIR nas amostras do estudo.

ENSEMBL ID	<u>Linhagens celulares</u>				
	FM308	WM35	WM1552	WM902	WM9
ENST00000424518.1	2	36	28	69	76
ENST00000425595.1	0	0	1	2	2
ENST00000439545.1	0	0	0	5	5
ENST00000453875.1	0	0	0	0	0
ENST00000455246.1	0	0	0	0	0

Tabela 7 – Abundância relativa normalizada (FPKM) das diferentes isoformas do HOTAIR nas amostras de melanócito e melanoma.

ENSEMBL ID	Linhagens celulares				
	FM308	WM35	WM1552	WM902	WM9
ENST00000424518.1	0.0120703	0.414033	0.231938	0.327005	0.24327
ENST00000425595.1	-	0.176054	0.127027	0.228906	0.13606
ENST00000439545.1	-	0.082129	-	4,77E-15	1,15E-18
ENST00000453875.1	-	8,03E-03	1,00E-13	7,56E-04	4,59E-04
ENST00000455246.1	-	3,22E+00	6,99E-02	2,70E-01	2,72E-01

Deste modo, para confirmar a baixa expressão relativa de HOTAIR, foi realizada uma PCR real time (RT- qPCR) nas linhagens celulares utilizadas neste estudo e adicionalmente foram utilizadas outras 5 linhagens de melanoma que seguem o mesmo modelo de progressão tumoral, para efeitos comparativos somente nesta análise (Figura 9). Os valores de *fold change* ( $fold\ change=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) do HOTAIR obtidos pela RT-qPCR demonstraram estar de acordo com os dados de baixa expressão relativa obtidos pelo RNA-seq (Tabela 6 e Tabela 7).

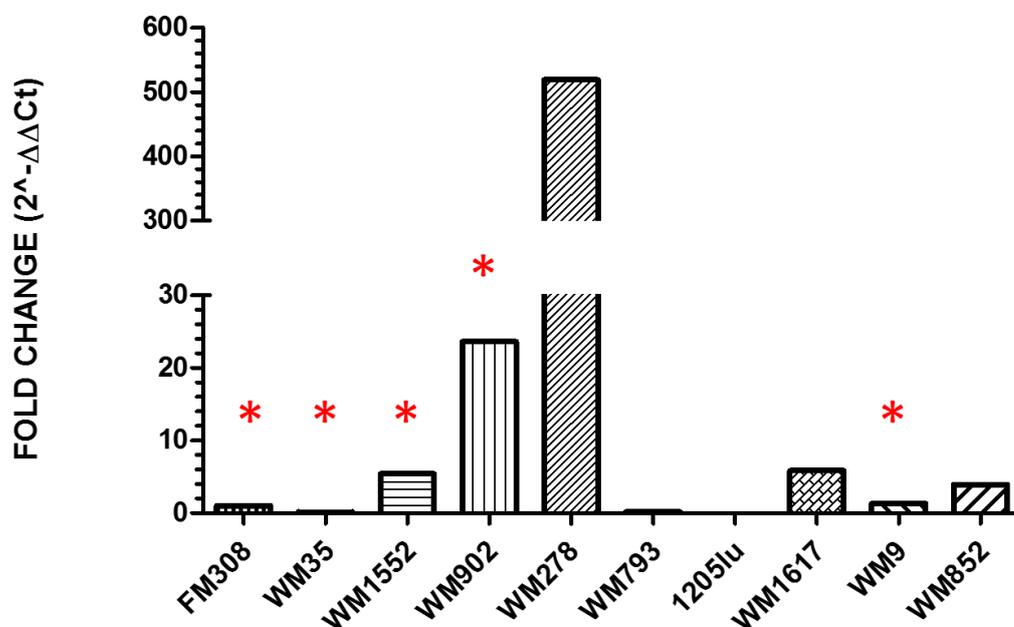


Figura 9 – Níveis de expressão do lncRNA HOTAIR em diferentes linhagens de melanócito e melanoma obtido por RT-qPCR ( $fold\ change=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os asteriscos em vermelho correspondem as linhagens celulares utilizadas no RNA-seq neste estudo e as demais são apenas para efeito comparativo.



#### 4.2.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TRANSCRITOS

Primeiramente, foram analisados os dados do transcriptoma total. Para realizar a expressão diferencial dos transcritos nas linhagens celulares, foram utilizados os valores da quantificação de transcritos obtidos pelo *HTSeq*. Foram considerados transcritos diferencialmente expressos aqueles que apresentaram aos requisitos de significância ( $p$ -value ajustado =  $padj < 0.01$ ) e nível de expressão ( $Fold\ change = 1 < \log_2 Fold\ change < -1$ ). Foi mantida a seguinte divisão dos grupos: melanócitos (MELC), melanoma primário (PRIM) e melanoma metastático (MET). Para efeitos de comparação, foi realizado o agrupamento do grupo melanoma primário com melanoma metastático, dando origem ao grupo melanoma geral (MELN). Para uma visão geral desta etapa do experimento, foi verificada a relação entre intensidade dos níveis de expressão dos transcritos e a diferença média entre os dois conjuntos de dados em comparação (Figura 10).

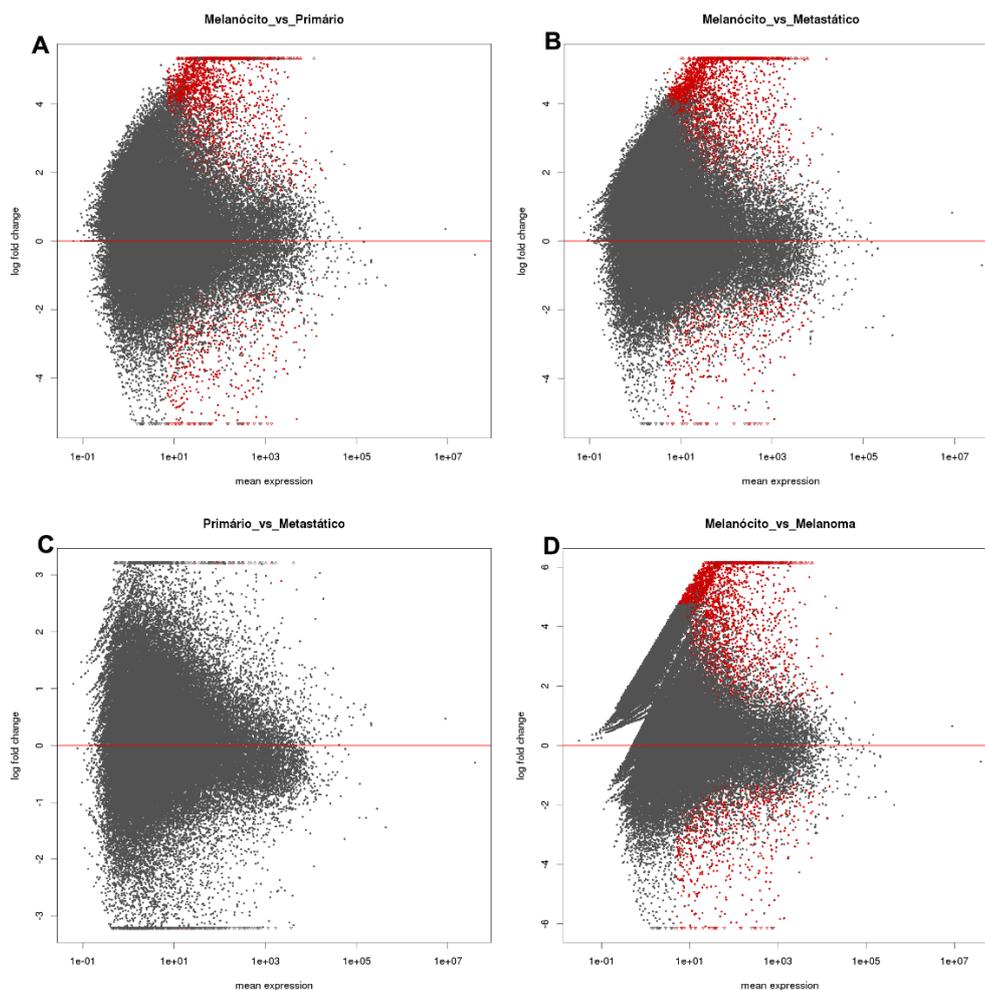


Figura 10 – MA plots do transcriptoma representando a comparação entre dois grupos. No eixo X, o valor médio da quantificação e no eixo Y a diferença entre eles. Cada transcrito é representado por um ponto. Pontos vermelhos =  $padj < 0.01$ .

Para cada comparação, foram observados os seguintes valores de expressão diferencial: MELC x PRIM, com 1003 transcritos superexpressos e 114 subexpressos; MELC x MET, com 1232 transcritos superexpressos e 116 subexpressos; MELC x MELN, apresentando 1251 transcritos superexpressos e 241 subexpressos; e PRIM x MET, com um total de 8 transcritos superexpressos e 4 subexpressos. Para verificar a distancia entre as amostras dos diferentes grupos, foi utilizada a medida de distância dos valores obtidos da expressão diferencial dos transcritos. Assim, foi aplicada uma função que retornou uma matriz de distância Euclideana a partir do calculo da matriz de expressão diferencial (Figura 11). Para garantir contribuição aproximadamente igual de todos os transcritos, estes foram utilizados em dados transformados de *rlog*.

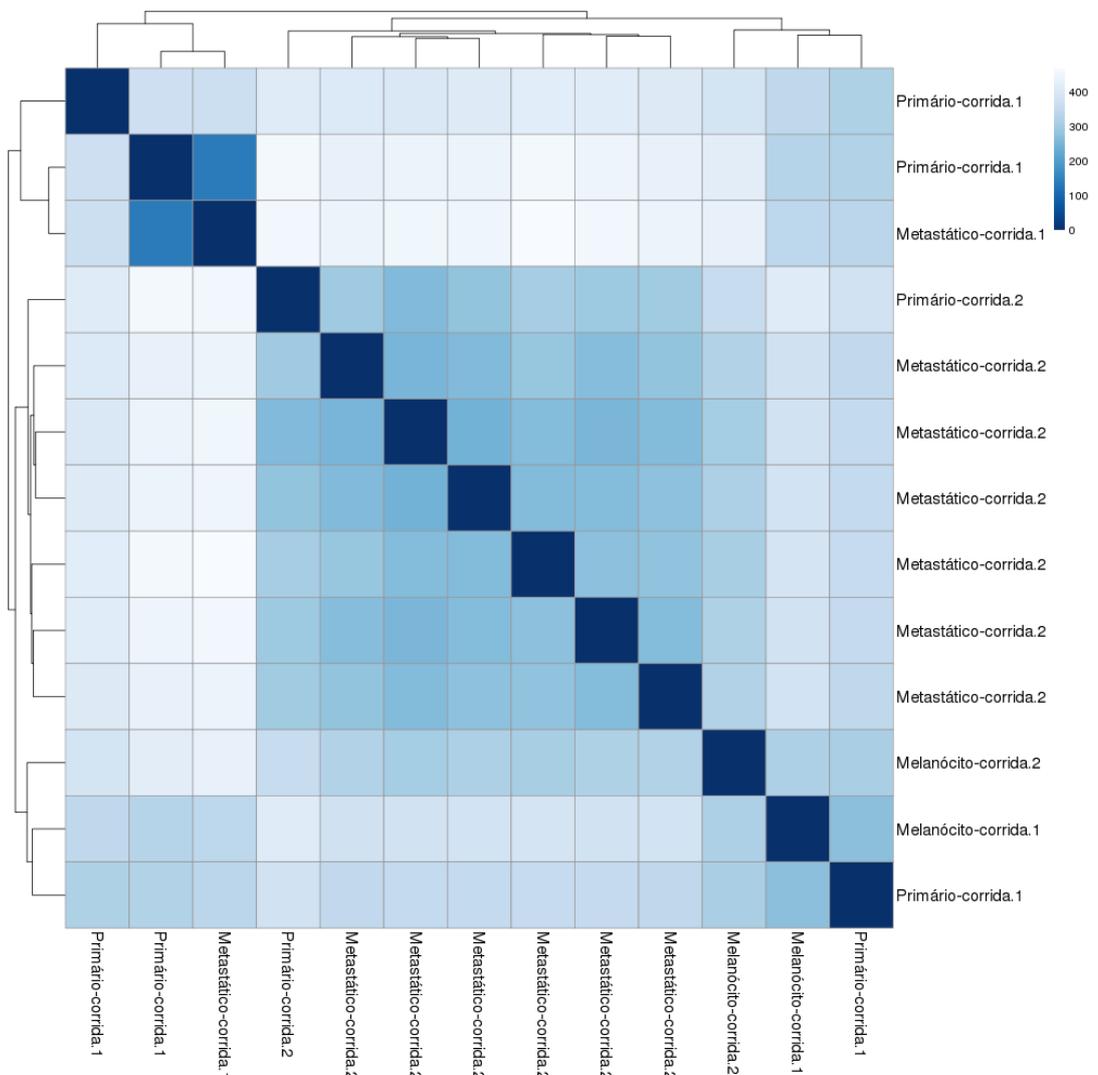


Figura 11 - Mapa de distâncias das amostras em relação a análise da expressão diferencial do transcriptoma total. “Corrida” remete a origem dos dados de RNA-seq. Corrida 1: RNA-seq realizado pelo presente estudo. Corrida 2: dados obtidos de repositório público.

#### 4.2.7 ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) PARA O TRANSCRIPTOMA

Foi realizada a Análise de Componente Principal para o transcriptoma total, levando em consideração a origem dos dados das amostras (Figura 12). Para esta análise, foram mantidos os 3 grupos (melanócitos, melanoma primário e melanoma metastático) e foi assumido a existência de dois experimentos (corridas) distintos. Este outro método de visualização de distância amostra por amostra é baseado em método de ordenação em que as amostras são dispersas em duas direções. Foram considerados os primeiros 500 transcritos com maior variância para construção do gráfico. Embora tenha havido certa dispersão, houve consenso entre as amostras de melanoma metastático que permaneceram agrupadas (círculos e triângulos verdes).

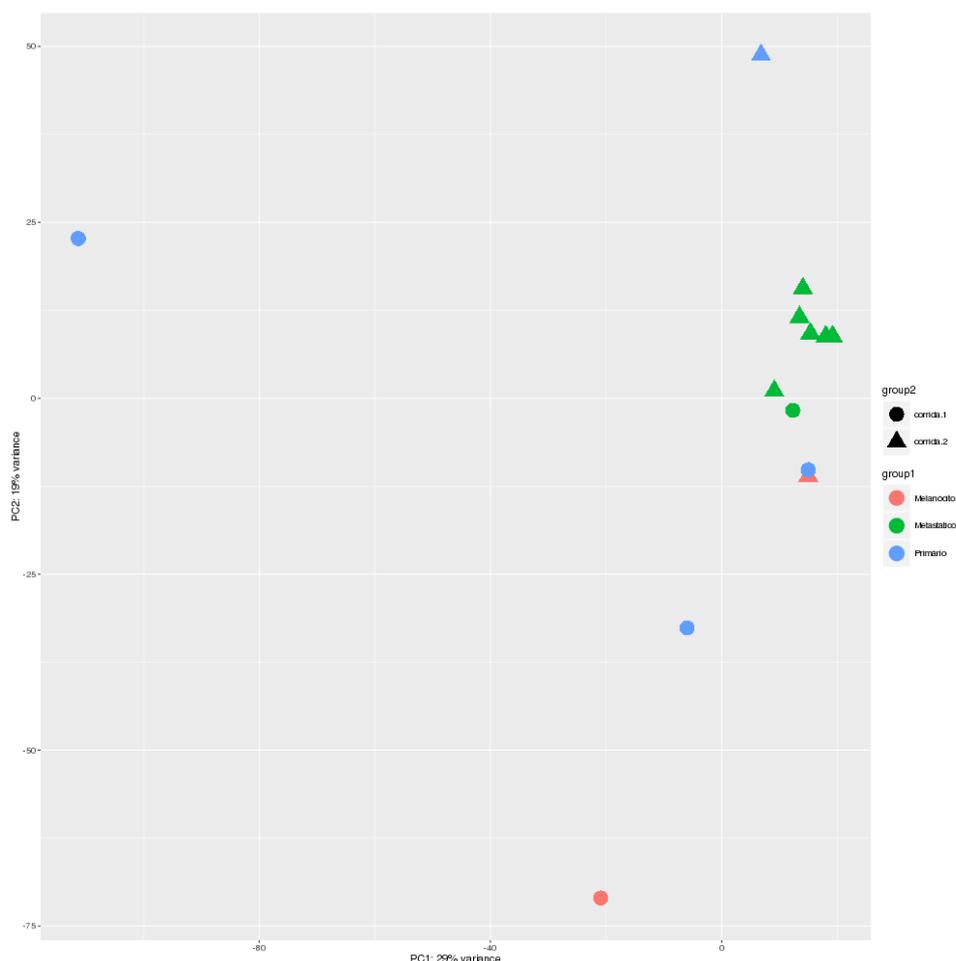


Figura 12– Análise de componente principal (PCA) para todos os transcritos das amostras. Cada círculo ou triângulo representa uma amostra. São consideradas as “corridas” como foram utilizadas para construção de mapa de distância.

#### 4.2.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE LNCRNAs

Para cada comparação entre os grupos, foi verificada a quantidade de lncRNAs diferencialmente expressos encontrados (FIGURA 13). Foram encontrados as seguintes quantidades de lncRNAs diferencialmente expressos para cada comparação: MELC x PRIM, apresentaram 84 lncRNAs superexpressos e 21 subexpressos; MELC x MET, com 96 lncRNAs superexpressos e 19 subexpressos; e MELC x MELN, que apresentaram 110 lncRNAs superexpressos e 52 subexpressos. Para a comparação entre PRIM x MET, não houveram lncRNAs diferencialmente expressos diante dos critérios de expressão e significância utilizados.

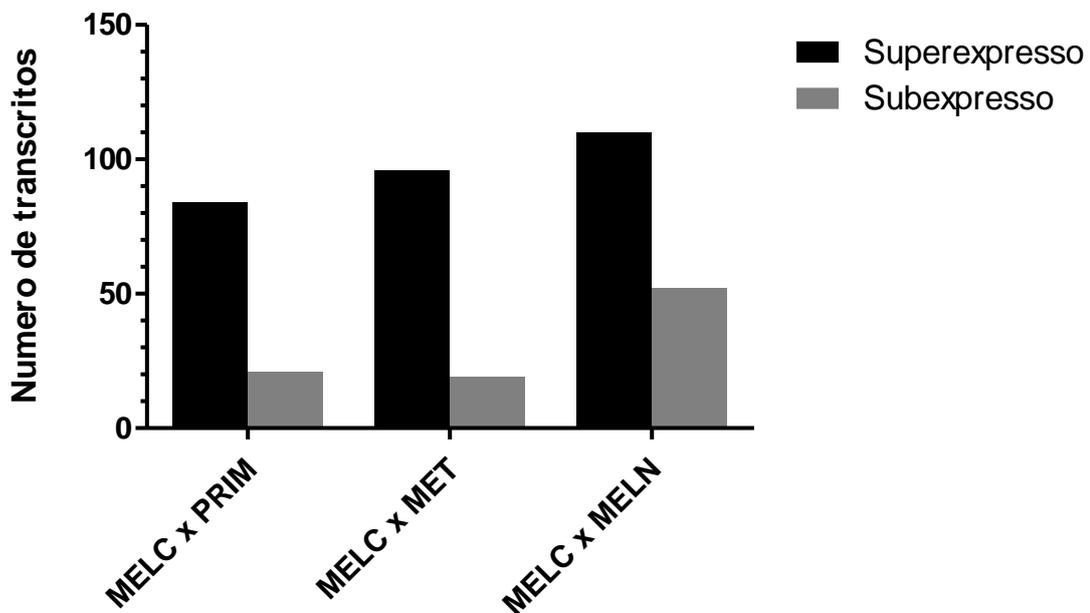


Figura 13 – Número de lncRNAs superexpressos e subexpressos nas diferentes comparações realizadas entre amostras de melanocitos e melanoma.

Para fins comparativos entre o transcriptoma total e da fração dos lncRNAs, foi realizado o cálculo da distância euclidiana para os lncRNAs diferencialmente expressos (Figura 14). Deste modo, foi gerado o mapa abaixo com as distâncias baseadas nos dados de expressão de lncRNAs, semelhante ao apresentado na Figura 11.

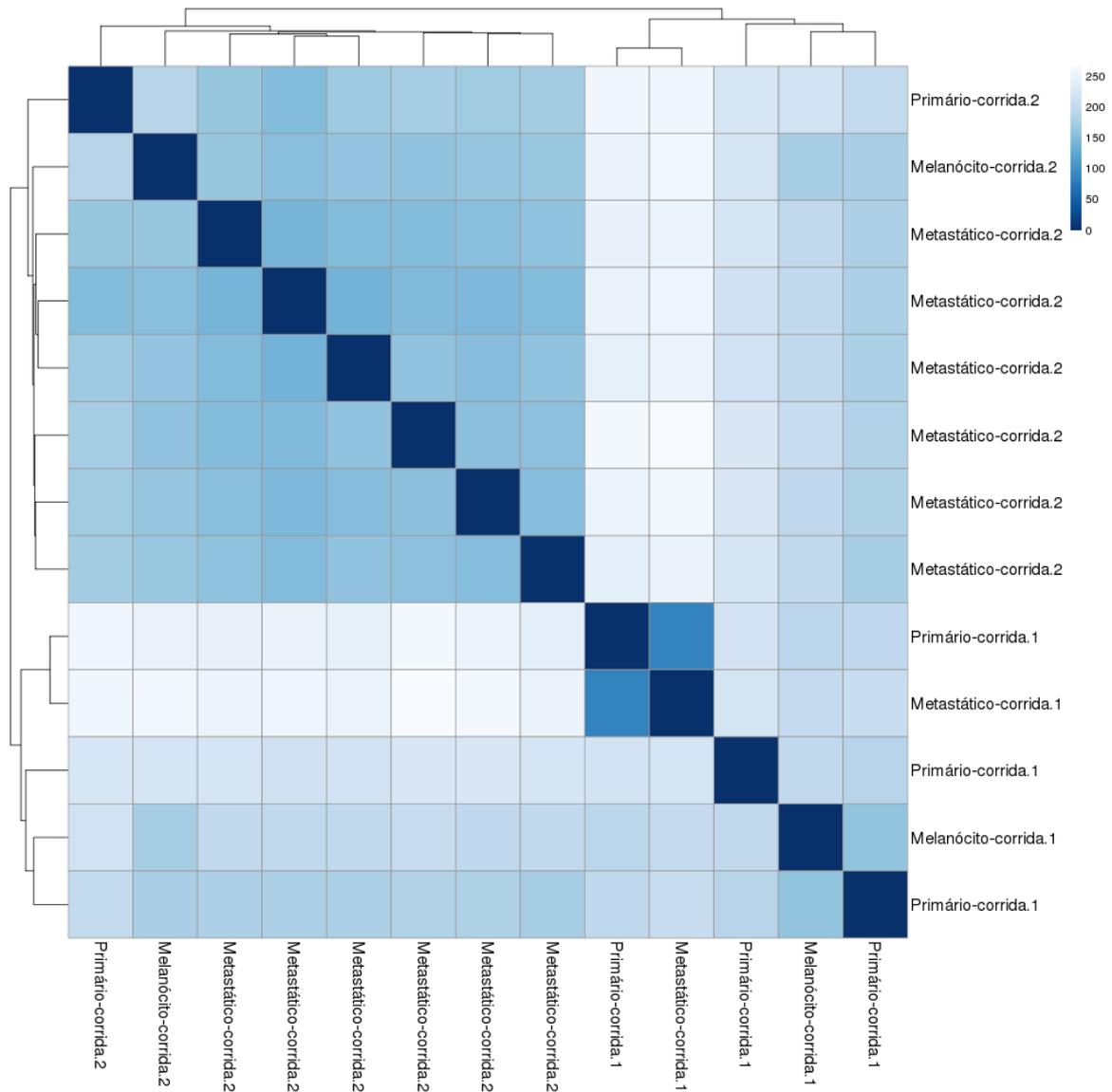


Figura 14 – Mapa de distâncias das amostras em relação a análise da expressão diferencial de lncRNAs. “Corrida” remete a origem dos dados de RNA-seq. Corrida 1: RNA-seq realizado pelo presente estudo. Corrida 2: dados obtidos de repositório público

De modo geral, ao analisarmos os lncRNAs diferencialmente expressos, podemos notar que alguns transcritos aparecem superexpressos/subexpressos mais de uma vez, mesmo diante das diferentes comparações, tal como é possível observar na análise dos 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos, baseados em *fold change*, de cada uma das comparações (TABELAS 9, 10 e 11).

Tabela 9 - Os 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos entre MELC x PRIM. Com *fold change* > 2 e *p-value* ajustado < 0.01 para a comparação entre melanócito e melanoma primário (MELC x PRIM). Os lncRNAs considerados mais diferencialmente expressos foram escolhidos com base nos valores de *fold change*.

lncRNAs superexpressos			lncRNAs subexpressos		
ENSEMBL ID	Fold change	Pvalue adj	ENSEMBL ID	Fold change	Pvalue adj
ENST00000447898.1	8,93	2,54E-11	ENST00000425350.1	-7,34	2,32E-06
ENST00000431094.2	8,90	1,21E-10	ENST00000354432.3	-6,74	4,35E-06
ENST00000552602.1	8,87	1,32E-10	ENST00000498454.1	-6,40	1,48E-03
ENST00000418499.3	7,62	6,04E-09	ENST00000452288.1	-6,20	3,17E-03
ENST00000606343.1	7,26	3,40E-05	ENST00000378726.1	-5,97	1,37E-16
ENST00000483525.1	7,03	5,86E-06	ENST00000558212.1	-5,88	3,52E-04
ENST00000547285.1	6,95	8,90E-06	ENST00000538219.1	-5,58	9,42E-04
ENST00000603265.1	6,82	8,21E-05	ENST00000520082.1	-5,36	1,43E-05
ENST00000607166.1	6,82	1,85E-05	ENST00000474002.1	-5,35	7,22E-03
ENST00000598917.2	6,67	6,91E-06	ENST00000424612.1	-5,35	3,55E-06
ENST00000380970.2	6,58	3,27E-04	ENST00000379053.4	-5,23	2,08E-04
ENST00000608286.1	6,44	8,09E-05	ENST00000478268.1	-5,01	1,42E-03
ENST00000452148.2	6,41	4,51E-04	ENST00000524355.1	-4,93	4,00E-05
ENST00000432361.1	6,37	1,00E-04	ENST00000430683.1	-4,65	7,05E-05
ENST00000550570.1	6,36	1,68E-04	ENST00000569976.1	-4,58	2,48E-03
ENST00000550805.1	6,34	1,65E-04	ENST00000557371.1	-4,38	3,12E-03
ENST00000606790.1	6,30	4,18E-04	ENST00000569999.1	-4,22	5,25E-03
ENST00000436484.1	6,30	7,81E-05	ENST00000607680.1	-2,97	4,96E-05
ENST00000548875.1	5,94	6,49E-04	ENST00000531840.1	-2,82	9,47E-03
ENST00000443766.3	5,88	9,45E-04	ENST00000506052.1	-2,79	7,18E-03
ENST00000495990.1	5,78	5,74E-04	ENST00000566542.1	-2,37	8,67E-03
ENST00000548271.1	5,77	9,15E-04			
ENST00000605955.1	5,77	3,82E-03			
ENST00000425974.1	5,73	9,94E-05			
ENST00000400192.4	5,71	6,81E-05			
ENST00000591280.1	5,69	5,89E-03			
ENST00000446205.2	5,69	3,94E-04			
ENST00000446789.2	5,67	5,17E-03			
ENST00000547399.1	5,67	4,29E-03			
ENST00000334298.3	5,57	8,59E-03			

Tabela 10 - Os 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos entre MELC x MET. Com *fold change* > 2 e *p-value* ajustado <0.01 para a comparação entre melanócito e melanoma metastático (MELC x MET). Os lncRNAs considerados mais diferencialmente expressos foram escolhidos com base nos valores de *foldchange*.

lncRNAs superexpressos			lncRNAs subexpressos		
ENSEMBL ID	Fold change	Pvalue adj	ENSEMBL ID	Fold change	Pvalue adj
ENST00000418499.3	7,97	1,54E-10	ENST00000512959.1	-7,47	8,87E-05
ENST00000447898.1	7,91	3,40E-09	ENST00000418335.1	-6,72	4,12E-05
ENST00000552602.1	7,82	1,13E-08	ENST00000354432.3	-5,89	7,28E-06
ENST00000431094.2	7,73	1,46E-08	ENST00000378726.1	-5,78	8,85E-18
ENST00000547285.1	7,23	2,06E-06	ENST00000425350.1	-5,56	3,71E-04
ENST00000483525.1	7,22	1,52E-06	ENST00000558212.1	-4,97	7,93E-04
ENST00000608286.1	6,80	3,42E-05	ENST00000606262.1	-4,90	8,32E-03
ENST00000598917.2	6,74	6,83E-07	ENST00000424612.1	-4,85	7,55E-06
ENST00000550570.1	6,69	3,72E-05	ENST00000379053.4	-4,07	4,24E-03
ENST00000550805.1	6,59	4,30E-05	ENST00000569976.1	-3,86	3,18E-03
ENST00000432361.1	6,52	6,57E-05	ENST00000592870.1	-3,52	2,20E-03
ENST00000442621.1	6,39	2,36E-04	ENST00000591226.1	-2,88	6,35E-03
ENST00000603265.1	6,38	2,36E-04	ENST00000543998.1	-2,81	8,51E-03
ENST00000400755.3	6,34	1,69E-04	ENST00000607047.1	-2,43	7,65E-03
ENST00000425974.1	6,34	3,75E-06	ENST00000566542.1	-2,25	8,78E-03
ENST00000606790.1	6,28	4,36E-04	ENST00000433688.1	-2,22	3,62E-03
ENST00000548271.1	6,24	1,81E-04	ENST00000534386.2	-2,03	2,52E-03
ENST00000607166.1	6,20	9,68E-05	ENST00000301453.3	-1,90	9,15E-03
ENST00000400192.4	6,19	9,27E-06			
ENST00000443766.3	6,14	3,99E-04			
ENST00000456896.1	6,06	2,07E-03			
ENST00000439804.1	6,04	2,29E-03			
ENST00000548875.1	6,01	4,25E-04			
ENST00000380970.2	5,99	9,63E-04			
ENST00000566974.1	5,96	1,77E-03			
ENST00000446205.2	5,91	1,64E-04			
ENST00000435682.1	5,87	1,98E-03			
ENST00000552584.1	5,85	1,45E-03			
ENST00000587344.1	5,79	4,94E-03			
ENST00000436484.1	5,78	3,01E-04			

Tabela 11 - Os 30 lncRNAs mais diferencialmente expressos entre MELC x MELN. Com *fold change* > 2 e *p-value* ajustado  $p_{adj} < 0.01$  para a comparação entre melanócito e melanoma geral (MELC x MELN). Os lncRNAs considerados mais diferencialmente expressos foram escolhidos com base nos valores de *foldchange*.

lncRNAs superexpressos			lncRNAs subexpressos		
ENSEMBL ID	Fold change	Pvalue adj	ENSEMBL ID	Fold change	Pvalue adj
ENST00000447898.1	9,32	1,58E-07	ENST00000512959.1	-8,36	2,87E-06
ENST00000552602.1	9,29	1,93E-07	ENST00000418335.1	-7,66	9,29E-07
ENST00000431094.2	9,22	2,66E-07	ENST00000425350.1	-7,02	1,40E-06
ENST00000418499.3	8,54	5,88E-10	ENST00000569275.1	-6,96	2,58E-09
ENST00000547285.1	8,16	2,86E-05	ENST00000567056.1	-6,56	4,08E-05
ENST00000483525.1	8,15	2,76E-05	ENST00000452288.1	-6,50	2,72E-04
ENST00000603265.1	8,14	4,64E-05	ENST00000354432.3	-6,45	3,35E-08
ENST00000380970.2	7,98	8,20E-05	ENST00000459790.1	-5,95	1,07E-03
ENST00000606790.1	7,85	1,29E-04	ENST00000378726.1	-5,93	1,36E-23
ENST00000334298.3	7,79	1,81E-04	ENST00000526436.1	-5,82	3,75E-03
ENST00000608286.1	7,77	1,31E-04	ENST00000445997.1	-5,75	3,73E-05
ENST00000606343.1	7,77	1,48E-04	ENST00000558212.1	-5,68	3,49E-05
ENST00000550570.1	7,65	1,79E-04	ENST00000424612.1	-5,18	1,06E-07
ENST00000550805.1	7,53	2,52E-04	ENST00000606262.1	-5,01	3,77E-03
ENST00000598917.2	7,50	8,14E-06	ENST00000538219.1	-4,89	5,16E-04
ENST00000432361.1	7,48	3,10E-04	ENST00000580967.1	-4,79	9,73E-06
ENST00000607166.1	7,43	3,30E-04	ENST00000478268.1	-4,77	6,06E-04
ENST00000392227.2	7,19	1,03E-03	ENST00000379053.4	-4,76	2,41E-04
ENST00000443766.3	7,12	9,32E-04	ENST00000437088.1	-4,55	2,42E-03
ENST00000400755.3	7,09	1,00E-03	ENST00000461286.3	-4,40	1,34E-03
ENST00000548271.1	7,00	1,20E-03	ENST00000522158.1	-4,37	6,07E-03
ENST00000548875.1	6,97	1,32E-03	ENST00000569976.1	-4,12	7,22E-04
ENST00000456627.1	6,97	1,97E-03	ENST00000520082.1	-4,10	9,78E-04
ENST00000452148.2	6,93	1,59E-03	ENST00000399760.2	-3,94	9,06E-03
ENST00000436484.1	6,88	5,54E-05	ENST00000418372.1	-3,74	2,94E-03
ENST00000605955.1	6,85	1,52E-03	ENST00000557371.1	-3,72	4,70E-03
ENST00000457339.1	6,68	2,98E-04	ENST00000592368.1	-3,71	9,70E-03
ENST00000425974.1	6,59	1,73E-06	ENST00000442605.1	-3,61	2,94E-03
ENST00000566974.1	6,56	4,54E-03	ENST00000578408.1	-3,44	8,25E-03
ENST00000446205.2	6,51	1,15E-04	ENST00000399096.2	-3,41	3,36E-03

Foram gerados *volcano plots* (FIGURA 9) para os lncRNAs utilizando o critério de  $\log_2(\text{foldchange}) > 1$  e  $-\log_{10}(p \text{ value}) < 0.05$ . Deste modo, foram realizadas todas as possíveis comparações entre os grupos definidos, sendo estas: melanócito e melanoma geral (MELC x MELN); melanócito e melanoma primário (MELC x PRIM); melanócito e melanoma metastático (MELC x MET); e melanoma primário e

melanoma metastático (PRIM x MET). Para a comparação PRIM x MET, não houveram transcritos que atendessem aos critérios de seleção e sua representação grafica não foi gerada.

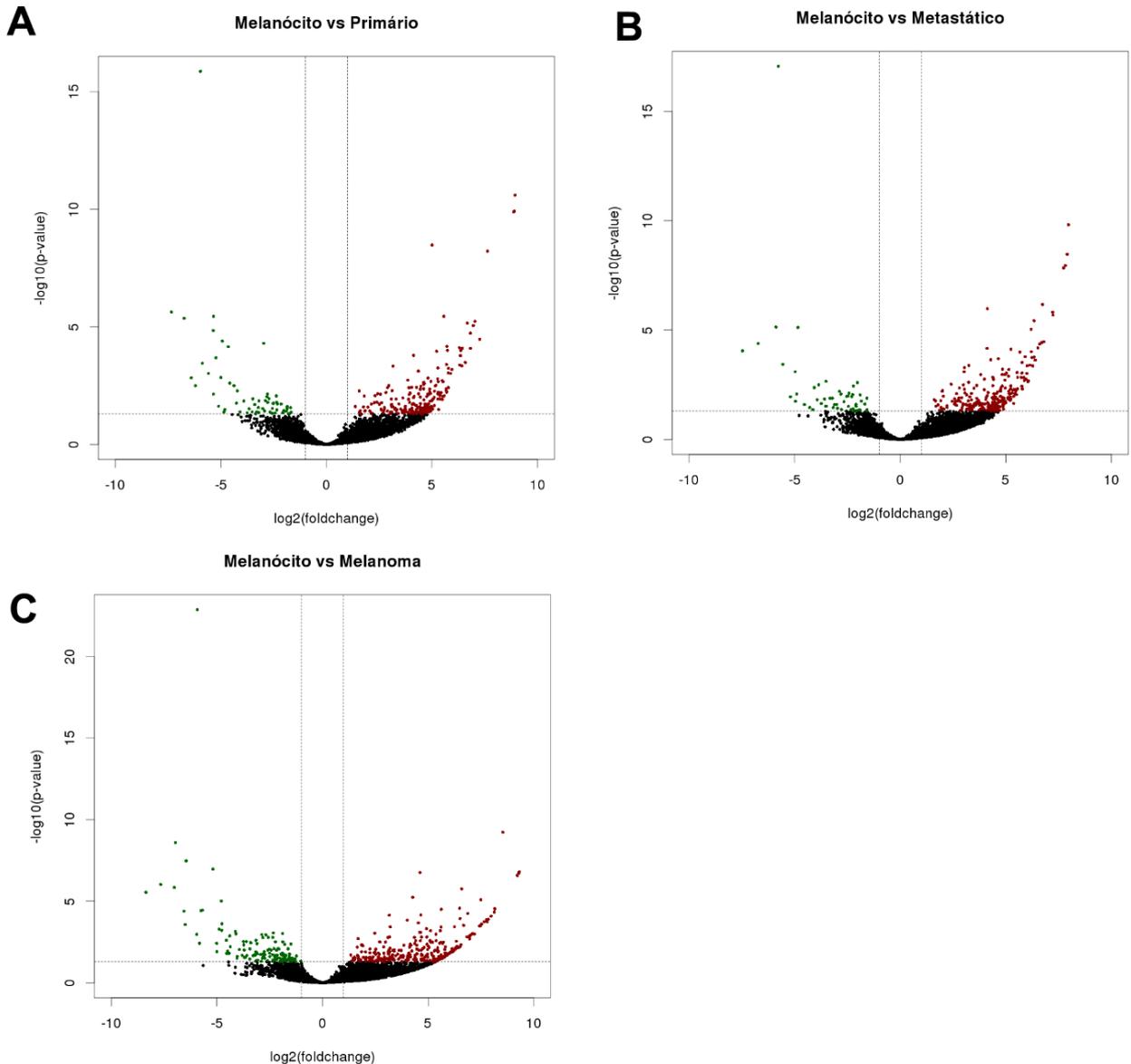


Figura 15 – Volcano plots de lncRNAs diferencialmente expressos. Cada ponto em vermelho representam um transcrito superexpresso e os pontos verdes representam genes subexpressos. A) Comparação entre MELC x PRIM; B) Comparação entre MELC x MET; C) Comparação entre MELC x MELN.

Foi gerada a clusterização hierárquica e dendogramas dos lncRNAs diferencialmente expressos, utilizando a metodologia de distancia Euclideana para as amostras e correlação de Pearson para os transcritos. Deste modo, utilizando a função 'heatmap.2' no pacote de dados 'gplots' (em ambiente de computação

estatística R) foi obtido o *heatmap* abaixo (FIGURA 16). Nesta figura, cada coluna representa uma amostra e cada linha corresponde a um lncRNA diferencialmente expresso. As cores do *heatmap* indicam variações na escala de *row Z-score*, sendo que o verde indica menores valores, o preto níveis intermediários e o vermelho representa valores mais altos. Foram considerados os critérios de significância  $p$ -ajustado ( $p_{adj} < 0.01$ ) e *fold change* ( $fold\ change \geq 2$ ).

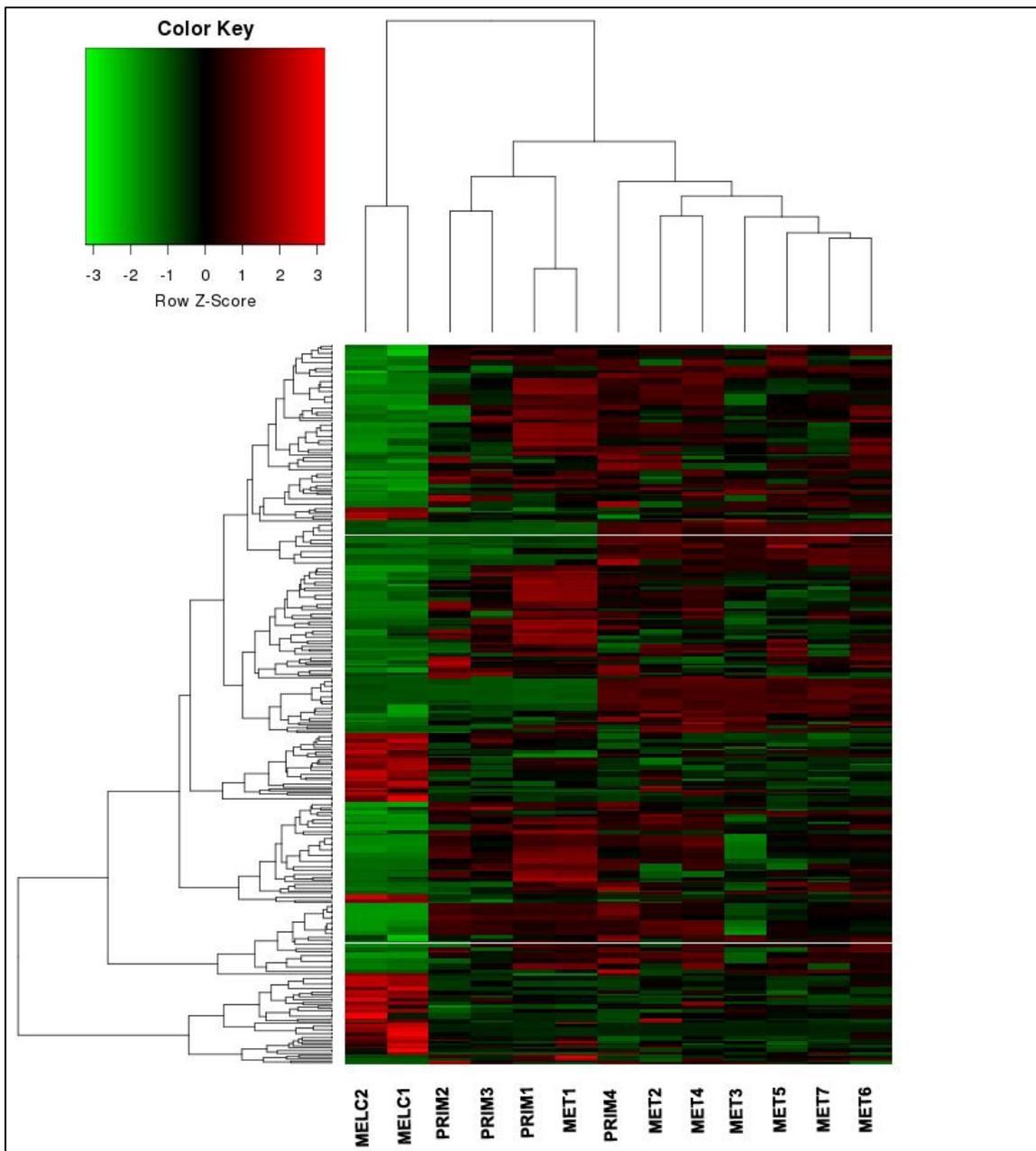


Figura 16 – Perfil de expressão dos lncRNAs diferencialmente expressos para as amostras de melanoma e melanócito. Na imagem, as colunas representam as amostras e cada linha corresponde a um lncRNAs.

Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento de clusterização hierárquica sob os mesmos parâmetros, somente para os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos nas comparações entre grupos (Figuras 17, 18 e 19). Para serem considerados os mais superexpressos, os transcritos foram filtrados em nível decrescente de  $\log_2\text{FoldChange}$ .

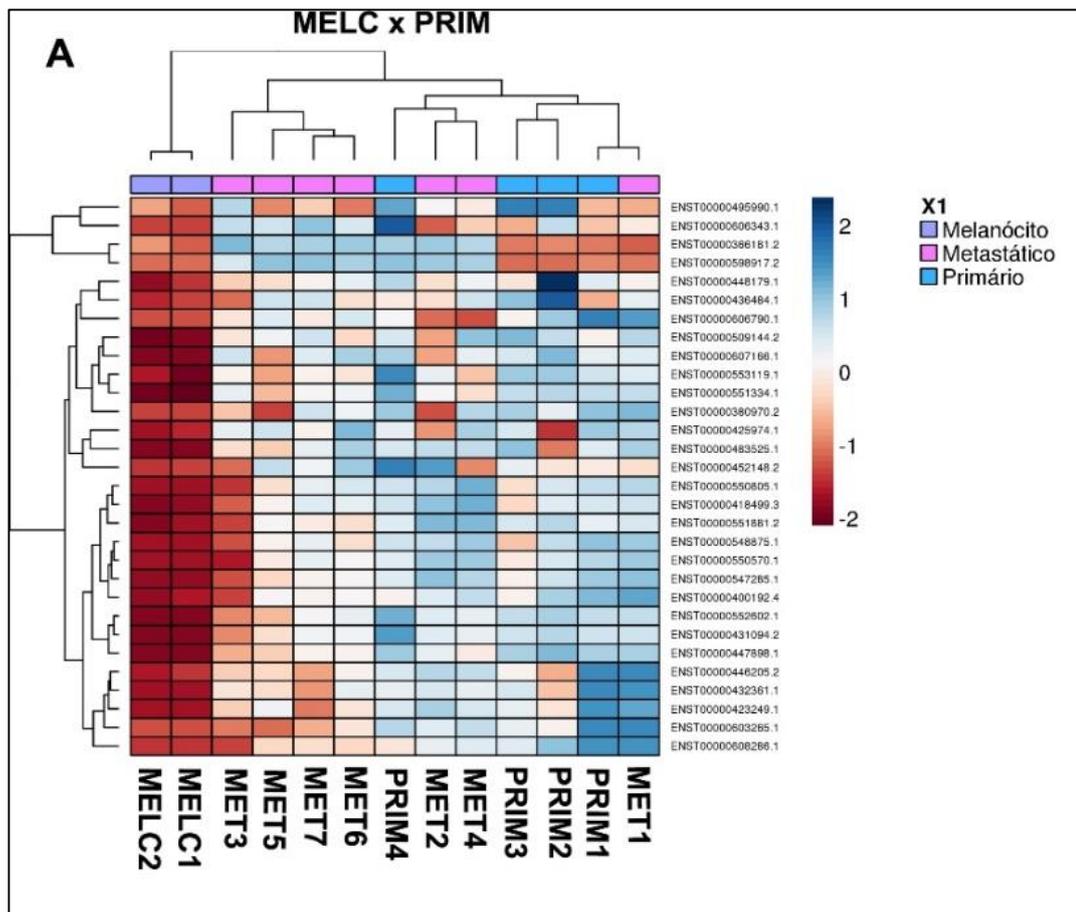


Figura 17- Clusterização hierárquica entre MELC vs PRIM a partir dos os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos

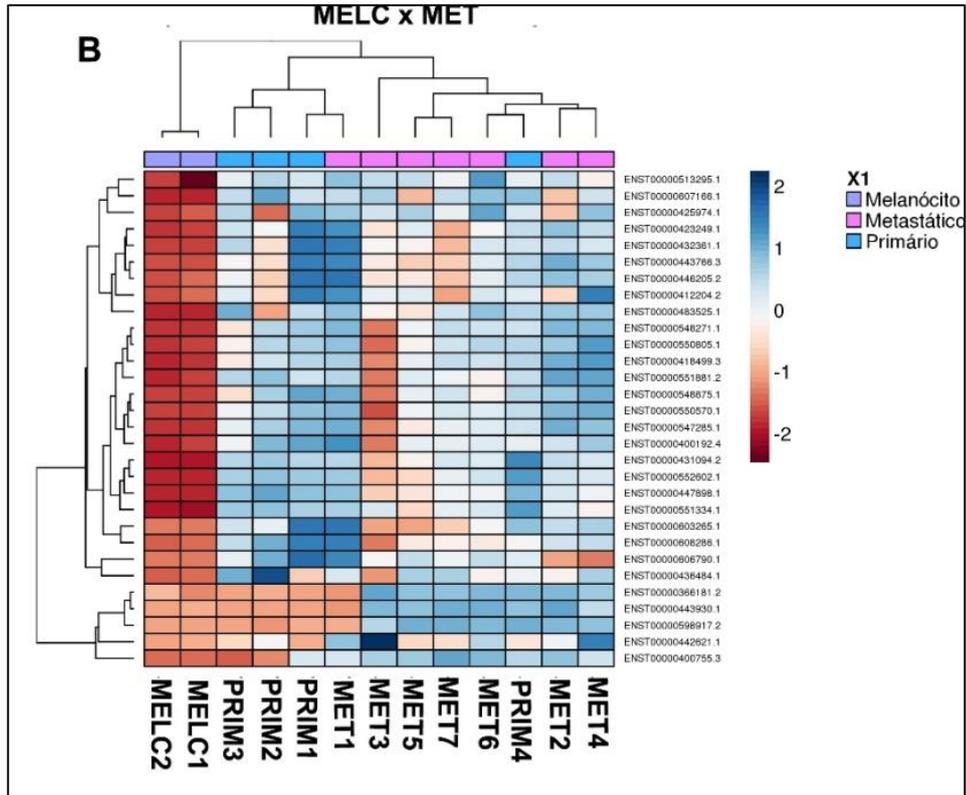


Figura 18 - Clusterização hierárquica entre MELC vs MET a partir dos os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos.

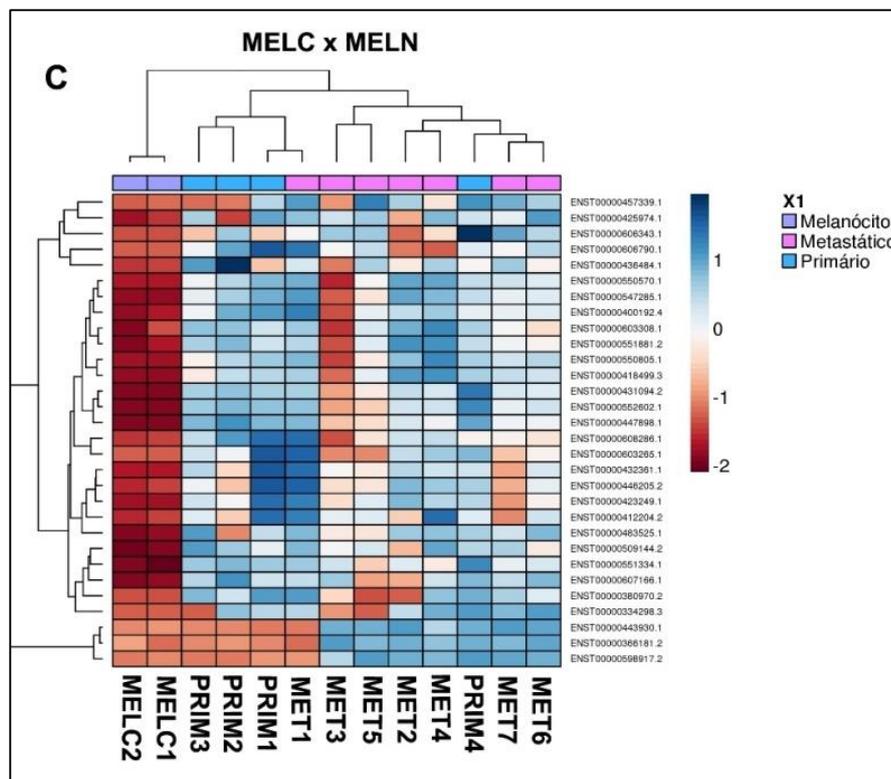


Figura 19 - Clusterização hierárquica entre MELC vs MELN a partir dos os 30 lncRNAs que foram considerados mais superexpressos.

#### 4.2.9 ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL (PCA) DE LNCRNAs

Foi realizada a PCA somente para os lncRNAs (FIGURA 20), levando em consideração os parâmetros já utilizados para o transcriptoma total. Há alteração no padrão de dispersão das amostras, principalmente pela dispersão mais acentuada de uma amostra metastática (ponto verde no canto superior esquerdo) das demais amostras que permaneceram agrupadas (triângulos verdes no canto superior esquerdo). Nesta ocasião, as amostras de melanócitos permaneceram mais próximas.

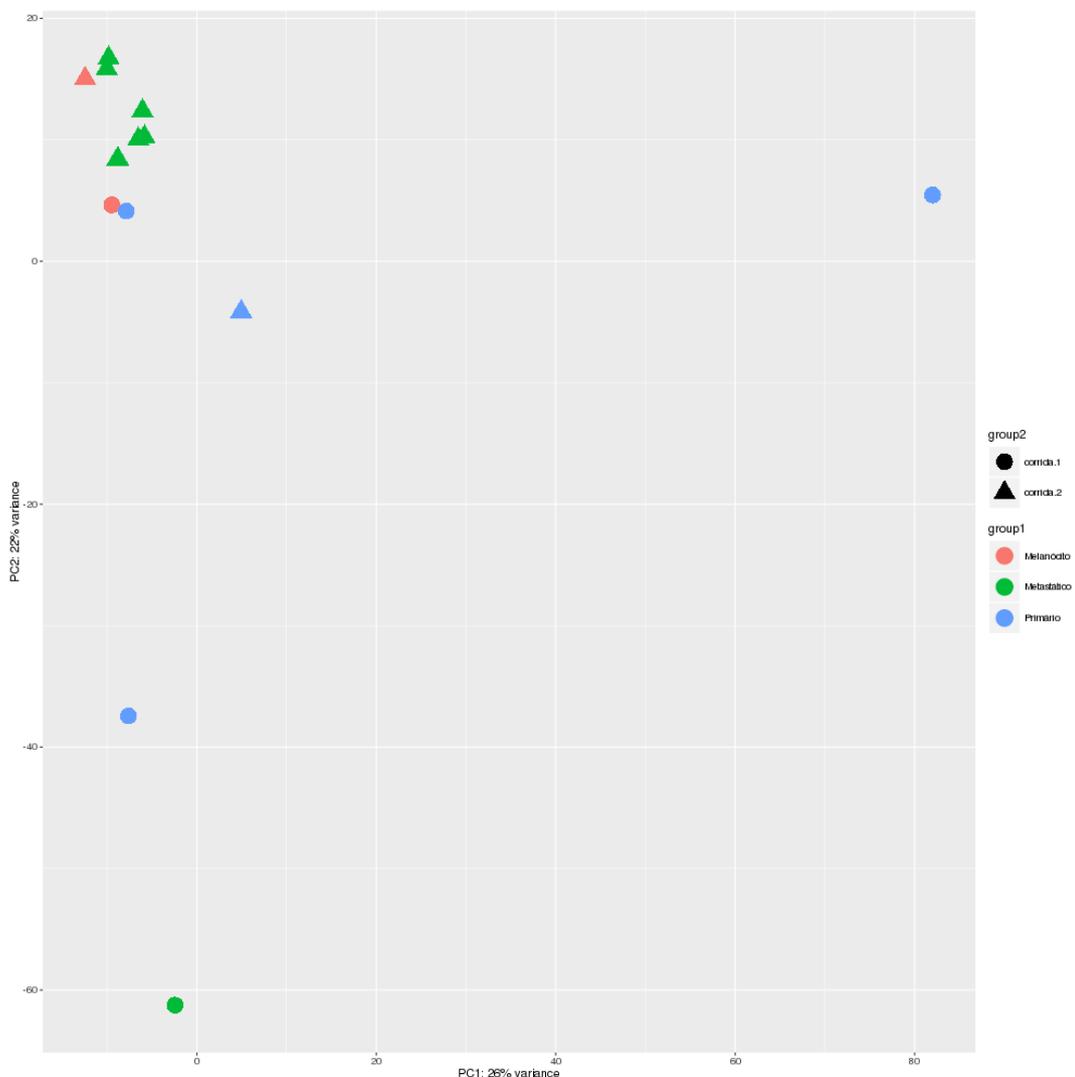


Figura 20 – Análise de componente principal (PCA) para os lncRNAs. As amostras foram mantidas nos grupos de progressão do melanoma e analisadas de acordo com a sua obtenção. São consideradas como corrida 1 as amostras em que foi realizado RNA-seq neste estudo, e corrida 2 são dados de amostras obtidas de repositório público.

#### 4.2.10 VALIDAÇÃO TÉCNICA POR PCR-SEMIQUANTITATIVA

Foram selecionados transcritos para realização de PCR semi-quantitativa (PCR-SQ) e validação dos dados obtidos (FIGURA 19). As sequências dos *primers* utilizados estão apresentadas na Tabela 2, e a região amplificada além de outras informações estão no apêndice (Apendice B e C). Os transcritos utilizados para validação foram: o lncRNA AC017074.2, que possui 561 pb está localizado no cromossomo 2 e pertence a classe dos *long intergenic RNAs* (lincRNA); e duas isoformas do gene SSU72 (*SSU72 homolog, RNA polymerase II CTD phosphatase*), que está localizado no cromossomo 1, sendo uma isoforma codificante com 1290 pb (ENST00000291386.3) e outra isoforma que é um lncRNA do tipo *retained\_intron* (ENST00000378726.1), que possui 2238 pb. Como controle endógeno, foi utilizado o gene TUBB (*tubulin beta class I*), que possui 2670 pb e cuja proteína, em conjunto com *alpha* tubulina, são componentes estruturais de microtubulos.

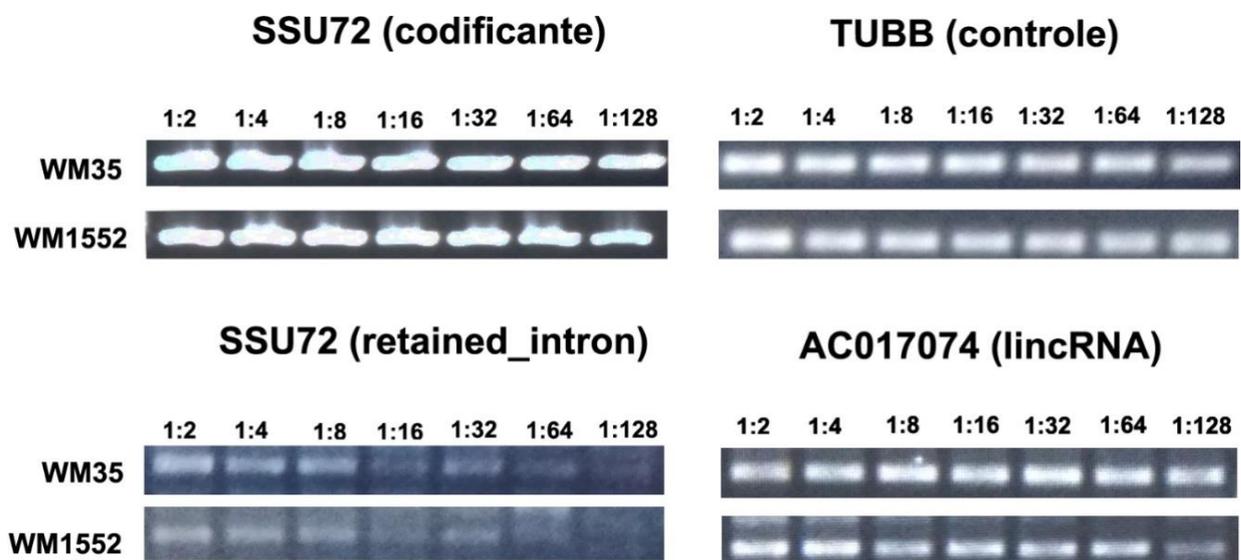


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% tratada com SYBR® Safe DNA Gel Stain.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 RNA-SEQ

O advento crescente do NGS e a facilidade de acesso a essa tecnologia, aliada a custos cada vez menores, permitiu uma revolução nos estudos da variação genômica humana (SU et al., 2011). Essa nova era proporcionou diversos benefícios como a diminuição drástica da velocidade de sequenciamento de DNA e novas aplicações biológicas, mas encontrou também alguns desafios de armazenamento e análise devido a grande quantidade de geração de dados (ZHANG et al., 2011). Destas novas abordagens, o sequenciamento de genoma completo é a estratégia mais abrangente para detecção de variantes genômicas globais, mas, por outro lado, é caro para amostras grandes e regiões não codificantes não apresentam boa resolução de sequenciamento, dificultando sua análise e interpretação (BENTLEY, 2006; KU et al., 2014).

Em contraste, o sequenciamento completo de exoma é muito utilizado para detecção de mutações em doenças mendelianas e mutações somáticas, mas em contrapartida requer uma etapa de captura e enriquecimento dos exons, aumentando o custo total da análise (BENTLEY, 2006; KU et al., 2014). Por não necessitar de etapas de enriquecimento de exons, o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é uma alternativa potencial ao sequenciamento de exoma por permitir detectar variações em genes codificantes (mRNA), bem como identificar praticamente todos os genes transcritos, codificantes ou não, de uma determinada amostra biológica (BENTLEY, 2006; KU et al., 2014).

Os dados obtidos do RNA-seq neste estudo se mostraram dentro dos padrões de qualidade. O primeiro referencial neste sentido foi a integridade do RNA (RIN) extraído, que nesta análise poderia variar de RIN=10 (RNA intacto) até RIN=<1 (totalmente degradado). Para análises de RNA-seq, a degradação do RNA pode introduzir uma importante fonte de variação durante a medição da expressão dos genes (WANG et al., 2016). As amostras utilizadas obtiveram RIN>7, como demonstração de que não houve degradação gradual do RNA pela ausência de fragmentos pequenos no gráfico de fluorescência (SCHROEDER et al., 2006). Como segunda medida, foi analisada a acurácia das *reads* que foram obtidas pelo sequenciamento. Os dados das amostras foram verificados através da ferramenta

FASTQC e todas atenderam ao padrão de qualidade consenso utilizado (Q Score > 20). Isto nos permite afirmar que a probabilidade de erro na chamada de bases é de 1/100, padrão aceitável para este tipo de abordagem (Ewing & Green, 1998; Illumina, 2014).

Diferentemente de outros NGS, para o RNA-seq é mais complicado estimar a cobertura do genoma devido ao fato dos transcritos serem muito diversos e sua expressão variar consideravelmente (CAPOBIANCO, 2014; SIMS et al., 2014). Neste âmbito, a cobertura do RNA-seq pode estar mais relacionada com a detecção de tipos de transcritos diferentes (MORTAZAVI et al., 2008). Deste modo, no RNA-seq passa a ser mais importante o tamanho e número das reads, além do número de replicatas biológicas (Leongamornlert et al., 2014; Ramsköld, Kavak, & Sandberg, 2012; Sims et al., 2014. Illumina, 2014). Neste ponto, os dados deste estudo também demonstram estar adequados para as análises realizadas, pois foram obtidas mais de 55 milhões de reads por amostra, mapeamento médio de ~93% de todas as reads obtidas e pelo menos duas replicatas biológicas por grupo de progressão do melanoma (UCSC, 2011, [https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/dataStandards/ENCODE\\_RNAseq\\_Standards\\_V1.0.pdf](https://genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/dataStandards/ENCODE_RNAseq_Standards_V1.0.pdf), acesso em 11/03/2016).

## 5.2 ANÁLISE DE DADOS QUANTITATIVOS DO TRANSCRIPTOMA DE MELANOMA E MELANÓCITOS

Segundo Copobianco *et al.* (2014), analisar transcriptomas humanos requer a assimilação de grandes volumes de dados em *pipelines* computacionais, que são desenvolvidos para diferentes propósitos, tais como: identificação, quantificação, anotação, expressão diferencial e predição de transcritos, entre outros (CAPOBIANCO, 2014). O fato do genoma eucariótico ser complexo e pervasivamente transcrito levantou questionamentos sobre a real função destes RNAs no genoma humano, e que somente após o projeto ENCODE revelou sua plasticidade e seu papel regularório no genoma (BERRETTA; MORILLON, 2009; JACQUIER, 2009; FLINTOFT, 2010). O uso de técnicas de NGS e a análise da porção não codificadora de proteínas do transcriptoma tem permitido que a pesquisa e tratamento do câncer experimentem um progresso significativo nos últimos anos

(MCGETTIGAN, 2013; LEBLANC; MARRA, 2015). Assim, para facilitar a compreensão dos dados nestes foram realizadas divisões e reagrupamentos, tanto entre os diferentes tipos de RNAs, quanto para os grupos representativos das fases do melanoma.

O modelo de divisão clássica das etapas de progressão do câncer, propostas por Clark (1984), foi mantida para análise das amostras e obtenção do conjunto de dados (CLARK et al., 1984). Assim, em determinada etapa deste projeto, ao se tornar necessária a inclusão de dados de repositório público para permitir a realização de análises estatísticas do RNA-seq, não foi modificada o modelo de progressão do melanoma. Deste modo, o maior número de transcritos que não codificam proteínas encontrados é concordante com os dados da literatura, que atestam para pequena (~2%) porção codificante do genoma (LANDER et al., 2001; HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM INTERNATIONAL, 2004), para a existência mais abundante de RNAs não codificantes com função genômica (CONSORTIUM, 2004; HARROW et al., 2006, 2012; DERRIEN et al., 2012; MUDGE; FRANKISH; HARROW, 2013) e para a relação entre complexidade do genoma eucariótico com a maior proporção de DNA genômico não codificante (TAFT; MATTICK, 2003; SZYMANSKI et al., 2005; TAFT; PHEASANT; MATTICK, 2007; BERRETTA; MORILLON, 2009).

Como não faziam parte do objetivo deste estudo, os transcritos pseudo\_RNAs, IG\_RNAs, TR\_RNAs e miscRNAs foram analisados em conjunto com o grupo de pequenos RNAs (sRNA, do inglês – *small RNAs*). O alto número relativo de pseudo\_RNAs (>75% do total) pode ser atribuído a desregulação genômica provocada pelo estado maligno das células analisadas (POLISENO; MARRANCI; PANDOLFI, 2015). Isto pode ser analisado pela evidência biológica de indução da progressão do câncer encontrada em alguns pseudogenes transcritos, tal como a ação de *competing endogenous RNAs* (ceRNAs) que possuem os pseudogenes PTENP1, KRASP1, OCT4-pg4 e SUMO1P3 (WELCH et al., 2015). Além disso, através da superexpressão do pseudogene ATP8A2-Ψ já foi demonstrado a capacidade de induzir a progressão no câncer de mama, demonstrando assim uma participação ativa de certos pseudogenes na progressão tumoral (KALYANA-SUNDARAM et al., 2012).

A proporção de lncRNAs encontrados é sobrepujante aos outros ncRNAs. Dentro do grupo de lncRNAs analisados, a maior proporção de transcritos é do tipo *retained\_intron*, que são definidos como isoformas de genes derivadas de *splicing* alternativo que contêm sequência intrônica ([http://www.genecodegenes.org/genecode\\_biotypes.html](http://www.genecodegenes.org/genecode_biotypes.html), acesso em 27/02/2016). Segundo o VEGA (*Vertebrate and Genome Annotation Project*), a classificação dos transcritos do tipo *retained\_intron* é tida como lncRNA e respeita a seguinte ordem hierárquica: Transcritos processados (que não possuem uma ORF) > Long non-coding RNAs > Retained\_intron ([http://vega.sanger.ac.uk/info/about/gene\\_and\\_transcript\\_types.html](http://vega.sanger.ac.uk/info/about/gene_and_transcript_types.html), acesso em 02/03/2016). A relevância biológica deste achado é intrigante, uma vez que os introns representam a maior fração dos RNAs não codificantes em mamíferos e não podem ser ignorados na pesquisa de transcritos funcionais ou de outros estudos genômicos (ST LAURENT et al., 2012). Este fato, contudo, pode ser derivado da escolha do tipo de preparo de biblioteca de cDNAs, mas requer uma atenção mais detalhada posteriormente. Além disso, a presença abundante de introns retidos em mamíferos pode estar relacionado ao estresse e sugere repressão da maquinaria de *splicing*, mantendo os transcritos retidos no núcleo sem tradução (SHALGI et al., 2014).

Além disso, já foi identificado em metástase ossea de câncer de próstata uma variante receptor de androgênio que apresentava retenção parcial de intron, o que era responsável por romper o domínio de ligação ao DNA (CHEN; WEISS, 2015). Já foi observado em estudos do transcriptoma de câncer que muitos introns normalmente removidos não são processados em diversos tipos de câncer (DVINGE; BRADLEY, 2015), o que pode explicar a abundância encontrada nas amostras de melanoma, embora o melanócito também apresente altos valores de expressão deste tipo de transcrito. Um dos possíveis mecanismos de atuação biológica relacionada a introns retidos, pode estar associado ao aumento do número de alvos putativos de miRNAs em mRNAs humanos (TAN et al., 2007).

Entre os demais lncRNAs, foi observada aproximadamente a mesma proporção (variando de 12 – 18%) de abundâncias entre lincRNAs e antisense. Os lincRNAs em conjunto com os antisense são os tipos de lncRNAs mais bem conhecidos e seu envolvimento com regulação gênica aumenta e cada vez mais desvendado (PINES; INOUE, 1986; INOUE, 1988; KHALIL et al., 2009; CABILI et

al., 2011). Entre os lincRNAs, existem alguns que já foram associados a mecanismos de progressão do câncer, como o linc-RoR (*long intergenic non-protein coding RNA, regulator of reprogramming*), que tem sido associado a indução do processo de tumorigenese, invasão, EMT, metastase no câncer de mama e diversos outros tipos de tumor (HOU et al., 2014; EADES et al., 2015; REZAEI et al., 2015). Já do tipo antisense, pode ser citado o lincRNA que possui expressão anatomo-específica do *cluster Hox* (semelhantemente ao HOTAIR), conhecido como HOTTIP (*HOXA distal transcript antisense RNA*). O lincRNA HOTTIP está localizado no *cluster HoxA*, e está associado ao crescimento e progressão tumoral, inibição da apoptose, prognóstico ruim, proliferação e migração, sendo assim como o HOTAIR, um importante lincRNA para o estudo em câncer (CHENG et al., 2015; DENG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

### 5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO LINC RNA HOTAIR EM MELANOMA

A expressão do lincRNA HOTAIR já tem sido demonstrada elevada em tumores primários (e.g. câncer de pâncreas, células escamosas da laringe e esôfago e ovário) e tumores metastáticos (e.g. câncer de mama, colorretal, sarcoma e de pulmão) quando comparados com tecidos adjacentes normais (ZHANG et al., 2014). Essa associação do HOTAIR com o processo tumoral, prognóstico ruim e metástase é ampla e já foi relatada em diversos tipos de tumores, incluindo em: câncer de mama (GUPTA et al., 2010; BHAN et al., 2013; PÁDUA ALVES et al., 2013), carcinoma hepatocelular (GENG et al., 2011; ISHIBASHI et al., 2013), câncer de pâncreas (KIM et al., 2013), câncer de pulmão (NAKAGAWA et al., 2013; ZHUANG et al., 2013; ZHAO et al., 2014), câncer colorretal (KOGO et al., 2011; PÁDUA ALVES et al., 2013; ZHANG et al., 2014) e também melanoma (TANG et al., 2013). Previamente, nosso grupo já havia demonstrado o papel do HOTAIR no desencadeamento do processo transição-epitélio-mesenquima (EMT) e aquisição de pluripotência por células tumorais (PÁDUA ALVES et al., 2013). Esta abundante informação encontrada na literatura científica, bem como os dados obtidos previamente por nosso grupo, serviram como base para realizar a análise da expressão do HOTAIR nas linhagens de melanócito e melanoma (PÁDUA ALVES et al., 2013; TANG et al., 2013).

Em geral, as linhagens celulares utilizadas para o RNA-seq não apresentaram padrão de expressão progressivo compatível com a progressão do melanoma para estágios mais avançados como outros estudos já demonstraram (TANG et al., 2013). Deste modo, os dados de expressão relativa de HOTAIR não permitiram estabelecer relação de maior agressividade tumoral com o maior nível de expressão deste lncRNA, como observado em outros tipos de câncer (GUPTA et al., 2010; KIM et al., 2013; ONO et al., 2014; WU et al., 2015). A análise de *count reads* pelo HTSeq demonstrou maiores valores para linhagens de melanoma, quando comparadas com o melanócito. Entretanto, com a introdução dos dados públicos não foi mais possível determinar um padrão de expressão relativa para o HOTAIR.

A análise quantitativa em tempo real das amostras pela técnica de RT-qPCR demonstrou concordância com os baixos níveis de abundância relativa de HOTAIR nas amostras de melanócito e melanoma. Foram utilizadas outras amostras de melanoma para esta análise, como método comparativo, além das linhagens que foram utilizadas para o RNA-seq. Em geral, a linhagem celular metastática utilizada neste trabalho (WM9) e outras também metastáticas (1205 lu, WM1617 e WM852) apresentaram baixo *fold change* ( $fold\ change\ 2^{-\Delta\Delta Ct} = < 5$ ) quando comparadas com linhagens celulares de melanoma não-metastáticas (WM278, WM1552 e WM902). Importante ressaltar que esta linhagem metastática (WM9) apresentou baixo *fold change* ( $fold\ change\ 2^{-\Delta\Delta Ct} = < 2$ ), concordando com os dados de quantificação de sua expressão relativa, que foram obtidos após o RNA-seq por ferramentas computacionais diferentes (TABELA 6 e TABELA 7).

Através ainda da RT-qPCR, apenas duas linhagens celulares de melanoma (WM902 e WM278) apresentaram altos níveis de *fold change* ( $fold\ change\ 2^{-\Delta\Delta Ct} \geq 20$ ). Curiosamente, ambas estas amostras pertencem ao melanoma primário. Este alto nível de expressão em fases menos tardias do melanoma, aliado ao fato de nenhuma linhagem metastática ter apresentado alta expressão pode ser um indicativo de que o HOTAIR não esteja atuando diretamente no processo metastático neste modelo de progressão do melanoma. Esta consideração não descarta, contudo, a possibilidade de que o HOTAIR possa estar atuando nos mecanismos iniciais do processo tumoral. Assim, são necessárias maiores investigações sobre a atuação do HOTAIR durante as fases iniciais da progressão do melanoma, e para sua possível associação com processos precoces de malignização de melanócitos.

#### 5.4 LNCRNAs COMPARTILHADOS E EXCLUSIVOS

Embora a expressão de lncRNAs seja menos abundante do que mRNAs, ela é marcada pelo alto padrão de especificidade tecidual (DERRIEN et al., 2012). A análise comparativa entre as cinco amostras permitiu encontrar lncRNAs com expressão exclusiva de cada uma das linhagens celulares utilizadas, bem como lncRNAs compartilhados entre amostras. Neste sentido, o maior número de lncRNAs exclusivos pertencem à linhagem de melanoma primário (WM1552). A linhagem metastática (WM9) apresentou também um alto número de lncRNAs exclusivos. E ainda, excetuando-se o compartilhamento de todas as amostras, que é maior em absoluto, o segundo maior número de lncRNAs compartilhados encontra-se entre as linhagens de melanoma (WM9, WM 902, WM1552 e WM35).

Este alto número de compartilhamento de lncRNAs entre amostras tumorais pode indicar que, para o processo tumoral, haja alguns destes que sejam comuns e necessários ao processo de *melanomagenesis*. Se atualmente os lncRNAs podem ser utilizados no diagnóstico de tumores e distinção de tecidos normais, a caracterização destes em estágios precoces do processo tumoral pode revelar lncRNAs com potencial para biomarcadores de diagnóstico de melanoma precoce ou outras doenças (FERREIRA et al., 2012; WANG; LIU; YAO, 2014).

#### 5.5 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES E TRANSCRITOS

A expressão diferencial de genes é o mecanismo em que, a partir do mesmo genoma é possível encontrar diferenças nos níveis de expressão em diferentes células (GILBERT, 2000). Ou seja, em diferentes células estes transcritos podem estar em mesmas proporções – tais como enzimas envolvidas no metabolismo celular – ou em diferentes abundâncias – como RNAs que desempenham funções específicas em determinadas células (GILBERT, 2000). Para o estudo de doenças genéticas multifatoriais, como o câncer, a análise da expressão diferencial (ou expressão genômica funcional) tornou-se uma das estratégias mais utilizadas para descoberta e entendimento do circuito molecular subjacente do câncer (LIANG; PARDEE, 2003). Contando com isto, foi realizada a expressão diferencial para os genes e transcritos das amostras de melanócito e melanoma, utilizando-se os dados

de sequenciamento gerados neste trabalho e, para significância estatística (MARIONI et al., 2008; RAMSKÖLD; KAVAK; SANDBERG, 2012), foram utilizados de outro estudo que são públicos e podem ser acessados em repositório online (PAWLIKOWSKI et al., 2013).

Para visualizar as correlações entre padrões de expressão entre a fração codificante (mRNA) e os lncRNAs, foram inicialmente realizadas uma série de análises pautadas no transcriptoma. Assim, através de comparações estatísticas com e sem o conjunto dos lncRNAs, foi observado o padrão de agrupamento de amostras, níveis de expressão e outras análises estatísticas.

## 5.6 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE LNCRNAs

Em todas as comparações realizadas, foram encontrados maiores quantidades de lncRNAs com superexpressão nas amostras (*Fold Change* > 1 e *p* < 0.01). Deste total, o maior número de lncRNAs diferencialmente expressos foi encontrado na comparação MELC x MELN, e a menor abundância foi encontrada na comparação PRIM x MET. Esta diferença no número de transcritos diferencialmente expressos mais acentuada na comparação MELC x MELN pode ser atribuída a evolução e acúmulo de mutações de ganho/ou perda de função decorrentes do processo tumoral (STECK et al., 1997; SARRAF et al., 1999; VAN OIJEN; SLOOTWEG, 2000; ZHOU et al., 2014; ZHU et al., 2015).

Assim, ao compararmos o estado biológico normal (melanócitos) com o estado tumoral (melanoma), é esperado que as alterações genéticas que surgiram ao longo do processo tumoral tenham impacto também em outros genes, alterando assim seus níveis de expressão (DEVEREUX; RISINGER; BARRETT, 1999; DELGADO; LEÓN, 2006; AERTS; COOLS, 2013). Isto leva em consideração o aspecto complexo das interações genômicas (NEVINS; POTTI, 2007; RASPE; DECRAENE; BERX, 2012), e o caráter multifatorial do câncer, derivado do acúmulo de alterações genéticas em tumores (CLARK et al., 1984; MANCIANTI; HERLYN, 1989; LAKHANI et al., 1998).

## 5.7 ANÁLISE EXPLORATORIA DE DADOS

Devido ao grande número de lncRNAs e complexidade das interações biológicas, a clusterização dos dados é uma técnica exploratória bastante útil para a análise de dados de expressão (YEUNG; RUZZO, 2001). A análise PCA é uma técnica estatística multivariada exploratória, utilizada para simplificar e facilitar a compreensão de conjuntos de dados complexos (RAYCHAUDHURI; STUART; ALTMAN, 2000). Já a clusterização hierárquica de eventos pontuais trata-se de um método de agrupamento de eventos semelhantes em topologia, morfologia ou em ambos e fornece uma árvore de grupos que exibem as populações relativas de eventos semelhantes (GUESS; WILSON, 2002). A PCA foi realizada para dois tipos de dados informativos: utilizando todos os transcritos somente para os lncRNAs. Foi observado que somente as amostras metastáticas permaneceram agrupadas em todas as análises, enquanto as outras não apresentaram padrão de agrupamento. Entretanto, somente na PCA dos lncRNAs houve uma relação de maior proximidade entre as amostras de melanócito.

A análise da clusterização hierárquica (heatmap 1) de todos os lncRNAs diferencialmente expressos nas amostras apresenta a formação de três *clusters* bem definidos: 1) MELC2 e MECL1; 2) PRIM2, PRIM3, PRIM1 e MET1; e 3) PRIM4, MET2, MET4, MET3, MET5, MET7 e MET6 (FIGURA 11). Esta clusterização permite definir que o primeiro *cluster* apresenta um padrão de expressão totalmente diferente das demais amostras, demonstrando similaridade acentuada entre os dois melanócitos utilizados. No segundo *cluster*, há prevalência quase completa de melanoma primária e, no terceiro *cluster*, as linhagens metastáticas que praticamente prevalecem. Esses dados do *heatmap* de lncRNAs com o agrupamento quase perfeito das amostras mantém o sentido biológico da progressão do melanoma e diferenciação dos grupos. Sobretudo, a presença de uma amostra primária no *cluster* metastático e de uma amostra metastática no *cluster* primário demonstra um papel ambíguo de ambos os grupos. Esta ambiguidade pode ser relacionada ao estabelecimento da progressão do melanoma. Enquanto uma amostra primária aparenta estar mais próxima de ser classificada como metastática, outra amostra do grupo metastático ainda apresenta padrões que a correlacionam ao *cluster* de melanoma primário.

## 5.8 SELEÇÃO DE LNCRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS PARA ESTUDOS FUNCIONAIS

A partir dos lncRNAs diferencialmente expressos, foram selecionados 6 superexpressos e 6 subexpressos de cada um dos 3 grupos comparativos. Foram mantidos os lncRNAs consensos e filtrados os transcritos do tipo *retained\_intron*. Ao todo, foram escolhidos 9 lncRNAs que foram separados em um único grupo e avaliados *in silico* quanto as suas propriedades e potencial de interação com outras moléculas regulatórias.

Inicialmente, foi analisada a capacidade de interação de cada um dos lncRNAs com proteínas, utilizando a ferramenta de investigação funcional lncRNator (<http://lncnator.ewha.ac.kr/>). Esta ferramenta permite, dentre outras análises, identificar proteínas que se ligam a lncRNAs, podendo assim ser bastante informativa das funções desempenhadas por estes lncRNAs (PARK et al., 2014). Esta plataforma de análise utiliza os dados de CLIP-Seq, RIP-Seq e PAR-CLIP, provenientes do GEO and modENCODED (PARK et al., 2014). Assim, nesta análise foram identificados 15 proteínas ligantes de lncRNAs que foram avaliadas em relação a seus diferentes grupos funcionais. As proteínas foram analisadas via Uniprot Keywords (<http://www.uniprot.org/keywords/>), cuja indexação de proteínas recebe uma marca (tag), e permitem recuperar facilmente uma categoria, que neste caso foram: função molecular, processo biológico e tipo de ligação (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2014). O fato de proteínas se ligarem a RNA pode ser indicativo de formação de complexos funcionais (KAI, 2016).

Deste modo, foram selecionados 4 lncRNAs baseados na interação proteína-lncRNA que estes apresentaram, bem como em dados da literatura científica. Para isto, foram priorizados as proteínicas que se relacionam aos processos conhecidamente associados a carcinogênese. Assim, os lncRNAs escolhidos são: LINC01212, CTD-2314B22.3, RP11-284F21.9 e AL589743.1. Estes lncRNAs são candidatos a ensaios funcionais para identificação de seu papel em processos biológicos envolvidos na tumorigênese, em estudos que poderão se desenvolver a partir deste trabalho.

É interessante observar que, dentre estes lncRNAs diferencialmente expressos que foram selecionados, o LINC01212 foi recentemente apresentado como um importante lncRNA associado ao melanoma maligno (LEUCCI et al., 2016).

Mais do que isso: o LINC01212, (ou SAMMSON - do inglês, *Survival Associated Mitochondrial Melanoma Specific Oncogenic Non-coding RNA*) é ativado pelo fator de transcrição SOX10 (específico de melanoma), possui expressão detectável em mais de 90% dos melanomas malignos e interage fisicamente com a proteína p32 – que regula o metabolismo tumoral pela oxidação fosforilativa (LEUCCI et al., 2016).

## 6 CONCLUSÕES

Foi possível identificar, selecionar e quantificar os diferentes tipos de lncRNAs do transcriptoma das amostras de melanócito e de cada fase da progressão do melanoma. Também foi possível verificar que a maior fração de RNA não codificante do transcriptoma é composta por lncRNAs. Além disso, foi verificado que existe uma grande quantidade de lncRNAs compartilhados e exclusivos entre as amostras, e que o maior compartilhamento de lncRNAs é realizado por amostras de melanoma. Foi verificado também que os perfis transcricionais dos grupos de progressão do melanoma são muito próximos em relação a expressão de lncRNAs

Nenhuma das linhagens celulares metastáticas apresentou altos níveis de expressão de HOTAIR, o qual pudesse ser correlacionado com os grupos de progressão do melanoma. Não houve também expressão diferencial de HOTAIR nas linhagens celulares, o que pode ser um indicativo de que este transcrito não esteja atuando diretamente no processo tumoral deste modelo de progressão do melanoma, ou ainda, esteja atuando indiretamente e mais brandamente. Estes dados foram validados por RT-qPCR.

Existem diversos lncRNAs diferencialmente expressos, e destes foram selecionados transcritos com potencial para estudos funcionais. Estes então foram submetidos a análise de interação proteína-RNA e apresentaram uma série de interações *in silico* com proteínas ligantes de RNA. Esta interação pode ser um forte preditor de função biológica e os lncRNAs serão submetidos à outras análises para melhor caracterização funcional no futuro.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.; SCHERER, S. E.; LI, P. W.; HOSKINS, R. A.; GALLE, R. F.; GEORGE, R. A.; LEWIS, S. E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S. N.; SUTTON, G. G.; WORTMAN, J. R.; YANDELL, M. D.; ZHANG, Q.; CHEN, L. X.; BRANDON, R. C.; ROGERS, Y. H.; BLAZEJ, R. G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B. D.; WAN, K. H.; DOYLE, C.; BAXTER, E. G.; HELT, G.; NELSON, C. R.; GABOR, G. L.; ABRIL, J. F.; AGBAYANI, A.; AN, H. J.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R. M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGLU, L.; BEASLEY, E. M.; BEESON, K. Y.; BENOS, P. V.; BERMAN, B. P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M. R.; BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K. C.; BUSAM, D. A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; CHERRY, J. M.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L. B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; MAYS, A. D.; DEW, I.; DIETZ, S. M.; DODSON, K.; DOUP, L. E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B. C.; DUNN, P.; DURBIN, K. J.; EVANGELISTA, C. C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A. E.; GARG, N. S.; GELBART, W. M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; GORRELL, J. H.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N. L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T. J.; HERNANDEZ, J. R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K. A.; HOWLAND, T. J.; WEI, M. H.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.; KALUSH, F.; KARPEN, G. H.; KE, Z.; KENNISON, J. A.; KETCHUM, K. A.; KIMMEL, B. E.; KODIRA, C. D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A. A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.; MATTEI, B.; MCINTOSH, T. C.; MCLEOD, M. P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N. V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S. M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZYNY, D. M.; NELSON, D. L.; NELSON, D. R.; NELSON, K. A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D. R.; PACLEB, J. M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G. S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M. G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R. D.; SCHEELER, F.; SHEN, H.; SHUE, B. C.; SIDÉN-KIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M. P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A. C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS, R.; TECTOR, C.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, A. H.; WANG, X.; WANG, Z. Y.; WASSARMAN, D. A.; WEINSTOCK, G. M.; WEISSENBACH, J.; WILLIAMS, S. M.; WOODAGET; WORLEY, K. C.; WU, D.; YANG, S.; YAO, Q. A.; YE, J.; YEH, R. F.; ZAVERI, J. S.; ZHAN, M.; ZHANG, G.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHENG, X. H.; ZHONG, F. N.; ZHONG, W.; ZHOU, X.; ZHU, S.; ZHU, X.; SMITH, H. O.; GIBBS, R. A.; MYERS, E. W.; RUBIN, G. M.; VENTER, J. C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5461, p. 2185–95, 24 mar. 2000.

AERTS, S.; COOLS, J. Cancer: Mutations close in on gene regulation. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 35–6, 4 jul. 2013.

ALBERT, M. R.; WEINSTOCK, M. A. Keratinocyte Carcinoma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 53, n. 5, p. 292–302, 1 set. 2003.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell, 6th edition**. [s.l: s.n.]v. 36

AMARAL, P. P.; CLARK, M. B.; GASCOIGNE, D. K.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. lncRNADB: a reference database for long noncoding RNAs. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database issue, p. D146–51, jan. 2011.

AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 475–88, ago. 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Melanoma Skin Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003120-pdf.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2016.

**American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014**. Atlanta: American Cancer Society; 2014. Disponível em:

<<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq - A Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 31, n. 2, p. 166–169, 25 set. 2014.

ANDERSEN, L. K.; DAVIS, M. D. P. The epidemiology of skin and skin-related diseases: a review of population-based studies performed by using the Rochester Epidemiology Project. **Mayo Clinic proceedings**, v. 88, n. 12, p. 1462–7, dez. 2013.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. How much melanoma is caused by sun exposure? **Melanoma research**, v. 3, n. 6, p. 395–401, dez. 1993.

ASCIERTO, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; GROB, J.-J.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A. M.; MAIO, M.; PALMIERI, G.; TESTORI, A.; MARINCOLA, F. M.; MOZZILLO, N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 85, jan. 2012.

AURY, J.-M.; JAILLON, O.; DURET, L.; NOEL, B.; JUBIN, C.; PORCEL, B. M.; SÉGURENS, B.; DAUBIN, V.; ANTHOUARD, V.; AIACH, N.; ARNAIZ, O.; BILLAUT, A.; BEISSON, J.; BLANC, I.; BOUHOUCHE, K.; CÂMARA, F.; DUHARCOURT, S.; GUIGO, R.; GOGENDEAU, D.; KATINKA, M.; KELLER, A.-M.; KISSMEHL, R.; KLOTZ, C.; KOLL, F.; LE MOUËL, A.; LEPÈRE, G.; MALINSKY, S.; NOWACKI, M.; NOWAK, J. K.; PLATTNER, H.; POULAIN, J.; RUIZ, F.; SERRANO, V.; ZAGULSKI, M.; DESSEN, P.; BÉTERMIER, M.; WEISSENBACH, J.; SCARPELLI, C.; SCHÄCHTER, V.; SPERLING, L.; MEYER, E.; COHEN, J.; WINCKER, P. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 171–8, 9 nov. 2006.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 27, n. 11, p. 499–506, 15 nov. 1941.

BENTLEY, D. R. Whole-genome re-sequencing. **Current opinion in genetics & development**, v. 16, n. 6, p. 545–52, dez. 2006.

BERGER, M. F.; HODIS, E.; HEFFERNAN, T. P.; DERIBE, Y. L.; LAWRENCE, M. S.; PROTOPOPOV, A.; IVANOVA, E.; WATSON, I. R.; NICKERSON, E.; GHOSH, P.; ZHANG, H.; ZEID, R.; REN, X.; CIBULSKIS, K.; SIVACHENKO, A. Y.; WAGLE, N.; SUCKER, A.; SOUGNEZ, C.; ONOFRIO, R.; AMBROGIO, L.; AUCLAIR, D.; FENNEL, T.; CARTER, S. L.; DRIER, Y.; STOJANOV, P.; SINGER, M. A.; VOET, D.; JING, R.; SAKSENA, G.; BARRETINA, J.; RAMOS, A. H.; PUGH, T. J.; STRANSKY, N.; PARKIN, M.; WINCKLER, W.; MAHAN, S.; ARDLIE, K.; BALDWIN, J.; WARGO, J.; SCHADENDORF, D.; MEYERSON, M.; GABRIEL, S. B.; GOLUB, T. R.; WAGNER, S. N.; LANDER, E. S.; GETZ, G.; CHIN, L.; GARRAWAY, L. A. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. **Nature**, v. 485, n. 7399, p. 502–6, 24 maio 2012.

BERNSTEIN, B. E.; BIRNEY, E.; DUNHAM, I.; GREEN, E. D.; GUNTER, C.; SNYDER, M. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57–74, 6 set. 2012.

BERRETTA, J.; MORILLON, A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. **EMBO reports**, v. 10, n. 9, p. 973–82, set. 2009.

BEVAN, M.; WALSH, S. The Arabidopsis genome: a foundation for plant research. **Genome research**, v. 15, n. 12, p. 1632–42, dez. 2005.

BHAN, A.; HUSSAIN, I.; ANSARI, K. I.; KASIRI, S.; BASHYAL, A.; MANDAL, S. S. Antisense transcript long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR is transcriptionally induced by estradiol. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 19, p. 3707–22, 9 out. 2013.

BIRNEY, E.; STAMATOYANNOPOULOS, J. A.; DUTTA, A.; GUIGÓ, R.; GINGERAS, T. R.; MARGULIES, E.

H.; WENG, Z.; SNYDER, M.; DERMITZAKIS, E. T.; THURMAN, R. E.; KUEHN, M. S.; TAYLOR, C. M.; NEPH, S.; KOCH, C. M.; ASTHANA, S.; MALHOTRA, A.; ADZHUBEI, I.; GREENBAUM, J. A.; ANDREWS, R. M.; FLICEK, P.; BOYLE, P. J.; CAO, H.; CARTER, N. P.; CLELLAND, G. K.; DAVIS, S.; DAY, N.; DHAMI, P.; DILLON, S. C.; DORSCHNER, M. O.; FIEGLER, H.; GIRESI, P. G.; GOLDY, J.; HAWRYLYCZ, M.; HAYDOCK, A.; HUMBERT, R.; JAMES, K. D.; JOHNSON, B. E.; JOHNSON, E. M.; FRUM, T. T.; ROSENZWEIG, E. R.; KARNANI, N.; LEE, K.; LEFEBVRE, G. C.; NAVAS, P. A.; NERI, F.; PARKER, S. C. J.; SABO, P. J.; SANDSTROM, R.; SHAFER, A.; VETRIE, D.; WEAVER, M.; WILCOX, S.; YU, M.; COLLINS, F. S.; DEKKER, J.; LIEB, J. D.; TULLIUS, T. D.; CRAWFORD, G. E.; SUNYAEV, S.; NOBLE, W. S.; DUNHAM, I.; DENOEU, F.; REYMOND, A.; KAPRANOV, P.; ROZOWSKY, J.; ZHENG, D.; CASTELO, R.; FRANKISH, A.; HARROW, J.; GHOSH, S.; SANDELIN, A.; HOFACKER, I. L.; BAERTSCH, R.; KEEFE, D.; DIKE, S.; CHENG, J.; HIRSCH, H. A.; SEKINGER, E. A.; LAGARDE, J.; ABRIL, J. F.; SHAHAB, A.; FLAMM, C.; FRIED, C.; HACKERMÜLLER, J.; HERTEL, J.; LINDEMEYER, M.; MISSAL, K.; TANZER, A.; WASHIETL, S.; KORBEL, J.; EMANUELSSON, O.; PEDERSEN, J. S.; HOLROYD, N.; TAYLOR, R.; SWARBRECK, D.; MATTHEWS, N.; DICKSON, M. C.; THOMAS, D. J.; WEIRAUCH, M. T.; GILBERT, J.; DRENKOW, J.; BELL, I.; ZHAO, X.; SRINIVASAN, K. G.; SUNG, W.-K.; OOI, H. S.; CHIU, K. P.; FOISSAC, S.; ALIOTO, T.; BRENT, M.; PACHTER, L.; TRESS, M. L.; VALENCIA, A.; CHOO, S. W.; CHOO, C. Y.; UCLA, C.; MANZANO, C.; WYSS, C.; CHEUNG, E.; CLARK, T. G.; BROWN, J. B.; GANESH, M.; PATEL, S.; TAMMANA, H.; CHRAST, J.; HENRICHSEN, C. N.; KAI, C.; KAWAI, J.; NAGALAKSHMI, U.; WU, J.; LIAN, Z.; LIAN, J.; NEWBURGER, P.; ZHANG, X.; BICKEL, P.; MATTICK, J. S.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; WEISSMAN, S.; HUBBARD, T.; MYERS, R. M.; ROGERS, J.; STADLER, P. F.; LOWE, T. M.; WEI, C.-L.; RUAN, Y.; STRUHL, K.; GERSTEIN, M.; ANTONARAKIS, S. E.; FU, Y.; GREEN, E. D.; KARAÖZ, U.; SIEPEL, A.; TAYLOR, J.; LIEFER, L. A.; WETTERSTRAND, K. A.; GOOD, P. J.; FEINGOLD, E. A.; GUYER, M. S.; COOPER, G. M.; ASIMENOS, G.; DEWEY, C. N.; HOU, M.; NIKOLAEV, S.; MONTOYA-BURGOS, J. I.; LÖYTYNOJA, A.; WHELAN, S.; PARDI, F.; MASSINGHAM, T.; HUANG, H.; ZHANG, N. R.; HOLMES, I.; MULLIKIN, J. C.; URETA-VIDAL, A.; PATEN, B.; SERINGHAUS, M.; CHURCH, D.; ROSENBLUM, K.; KENT, W. J.; STONE, E. A.; BATZOGLOU, S.; GOLDMAN, N.; HARDISON, R. C.; HAUSSLER, D.; MILLER, W.; SIDOW, A.; TRINKLEIN, N. D.; ZHANG, Z. D.; BARRERA, L.; STUART, R.; KING, D. C.; AMEUR, A.; ENROTH, S.; BIEDA, M. C.; KIM, J.; BHINGE, A. A.; JIANG, N.; LIU, J.; YAO, F.; VEGA, V. B.; LEE, C. W. H.; NG, P.; YANG, A.; MOQTADERI, Z.; ZHU, Z.; XU, X.; SQUAZZO, S.; OBERLEY, M. J.; INMAN, D.; SINGER, M. A.; RICHMOND, T. A.; MUNN, K. J.; RADA-IGLESIAS, A.; WALLERMAN, O.; KOMOROWSKI, J.; FOWLER, J. C.; COUTTET, P.; BRUCE, A. W.; DOVEY, O. M.; ELLIS, P. D.; LANGFORD, C. F.; NIX, D. A.; EUSKIRCHEN, G.; HARTMAN, S.; URBAN, A. E.; KRAUS, P.; VAN CALCAR, S.; HEINTZMAN, N.; KIM, T. H.; WANG, K.; QU, C.; HON, G.; LUNA, R.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G.; ALDRED, S. F.; COOPER, S. J.; HALEES, A.; LIN, J. M.; SHULHA, H. P.; ZHANG, X.; XU, M.; HAIDAR, J. N. S.; YU, Y.; IYER, V. R.; GREEN, R. D.; WADELIUS, C.; FARNHAM, P. J.; REN, B.; HARTE, R. A.; HINRICH, A. S.; TRUMBOWER, H.; CLAWSON, H.; HILLMAN-JACKSON, J.; ZWEIG, A. S.; SMITH, K.; THAKKAPALLAYIL, A.; BARBER, G.; KUHN, R. M.; KAROLCHIK, D.; ARMENGOL, L.; BIRD, C. P.; DE BAKKER, P. I. W.; KERN, A. D.; LOPEZ-BIGAS, N.; MARTIN, J. D.; STRANGER, B. E.; WOODROFFE, A.; DAVYDOV, E.; DIMAS, A.; EYRAS, E.; HALLGRÍMSDÓTTIR, I. B.; HUPPERT, J.; ZODY, M. C.; ABECASIS, G. R.; ESTIVILL, X.; BOUFFARD, G. G.; GUAN, X.; HANSEN, N. F.; IDOL, J. R.; MADURO, V. V. B.; MASKERI, B.; MCDOWELL, J. C.; PARK, M.; THOMAS, P. J.; YOUNG, A. C.; BLAKESLEY, R. W.; MUZNY, D. M.; SODERGREN, E.; WHEELER, D. A.; WORLEY, K. C.; JIANG, H.; WEINSTOCK, G. M.; GIBBS, R. A.; GRAVES, T.; FULTON, R.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; CLAMP, M.; CUFF, J.; GNERRE, S.; JAFFE, D. B.; CHANG, J. L.; LINDBLAD-TOH, K.; LANDER, E. S.; KORIABINE, M.; NEFEDOV, M.; OSOEGAWA, K.; YOSHINAGA, Y.; ZHU, B.; DE JONG, P. J. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, v. 447, n. 7146, p. 799–816, 14 jun. 2007.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 22, p. 339–73, jan. 2006.

BLISS, J. M.; FORD, D.; SWERDLOW, A. J.; ARMSTRONG, B. K.; CRISTOFOLINI, M.; ELWOOD, J. M.; GREEN, A.; HOLLY, E. A.; MACK, T.; MACKIE, R. M. Risk of cutaneous melanoma associated with

pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 62, n. 4, p. 367–76, 9 ago. 1995.

BOUVARD, V.; LOOMIS, D.; GUYTON, K. Z.; GROSSE, Y.; GHISSASSI, F. El; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of Consumption of Red and Processed Meat. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 16, p. 1599–1600, 23 out. 2015.

BRESSLER, R. S.; BRESSLER, C. H. Functional anatomy of the skin. **Clinics in podiatric medicine and surgery**, v. 6, n. 2, p. 229–46, abr. 1989.

BROWN, C. J.; BALLABIO, A.; RUPERT, J. L.; LAFRENIERE, R. G.; GROMPE, M.; TONLORENZI, R.; WILLARD, H. F. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 38–44, 3 jan. 1991.

CABILI, M. N.; TRAPNELL, C.; GOFF, L.; KOZIOL, M.; TAZON-VEGA, B.; REGEV, A.; RINN, J. L. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. p. 1915–1927, 2011.

CALIN, G. a; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857–66, nov. 2006.

**Cancer Trends Progress Report - Costs of Cancer Care.** Disponível em:

<[http://progressreport.cancer.gov/doc\\_detail.asp?pid=1&did=2011&chid=105&coid=1026&mid=>](http://progressreport.cancer.gov/doc_detail.asp?pid=1&did=2011&chid=105&coid=1026&mid=>).

Acesso em: 7 ago. 2014.

CANNON-ALBRIGHT, L. A.; GOLDGAR, D. E.; MEYER, L. J.; LEWIS, C. M.; ANDERSON, D. E.; FOUNTAIN, J. W.; HEGI, M. E.; WISEMAN, R. W.; PETTY, E. M.; BALE, A. E. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. **Science (New York, N.Y.)**, v. 258, n. 5085, p. 1148–52, 13 nov. 1992.

CAPOBIANCO, E. RNA-Seq Data: A Complexity Journey. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 11, n. 19, p. 123–30, set. 2014.

CELEBI, J. T.; SHENDRIK, I.; SILVERS, D. N.; PEACOCKE, M. Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens. **Journal of medical genetics**, v. 37, n. 9, p. 653–7, set. 2000.

CESANA, M.; CACCHIARELLI, D.; LEGNINI, I.; SANTINI, T.; STHANDIER, O.; CHINAPPI, M.; TRAMONTANO, A.; BOZZONI, I. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 358–69, 14 out. 2011.

CHEN, J.; WEISS, W. A. Alternative Splicing in Cancer: Implications for Biology and Therapy. **Oncogene**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2 jan. 2015.

CHEN, Y.; DHUPELIA, A.; SCHOENHERR, C. J. The Igf2/H19 imprinting control region exhibits sequence-specific and cell-type-dependent DNA methylation-mediated repression. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 3, p. 793–803, fev. 2009.

CHENG, A. M.; BYROM, M. W.; SHELTON, J.; FORD, L. P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 4, p. 1290–7, 1 jan. 2005.

CHENG, Y.; JUTOORU, I.; CHADALAPAKA, G.; CORTON, J. C.; SAFE, S. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10840–52, 10 maio 2015.

CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes & development**, v. 20, n. 16, p. 2149–82, 15 ago. 2006.

- CHODROFF, R. a; GOODSTADT, L.; SIREY, T. M.; OLIVER, P. L.; DAVIES, K. E.; GREEN, E. D.; MOLNÁR, Z.; PONTING, C. P. Long noncoding RNA genes: conservation of sequence and brain expression among diverse amniotes. **Genome biology**, v. 11, n. 7, p. R72, jan. 2010.
- CHU, C.; SPITALE, R. C.; CHANG, H. Y. Technologies to probe functions and mechanisms of long noncoding RNAs. **Nature structural & molecular biology**, v. 22, n. 1, p. 29–35, jan. 2015.
- CHUNG, S.; NAKAGAWA, H.; UEMURA, M.; PIAO, L.; ASHIKAWA, K.; HOSONO, N.; TAKATA, R.; AKAMATSU, S.; KAWAGUCHI, T.; MORIZONO, T.; TSUNODA, T.; DAIGO, Y.; MATSUDA, K.; KAMATANI, N.; NAKAMURA, Y.; KUBO, M. Association of a novel long non-coding RNA in 8q24 with prostate cancer susceptibility. **Cancer science**, v. 102, n. 1, p. 245–52, jan. 2011.
- CHUNHAROJRITH, P.; NAKAYAMA, Y.; JIANG, X.; KERY, R. E.; MA, J.; DE LA HOZ ULLOA, C. S.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; KLIBANSKI, A. Tumor suppression by MEG3 lncRNA in a human pituitary tumor derived cell line. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 416, p. 27–35, 15 nov. 2015.
- CHUONG, C. M.; NICKOLOFF, B. J.; ELIAS, P. M.; GOLDSMITH, L. A.; MACHER, E.; MADERSON, P. A.; SUNDBERG, J. P.; TAGAMI, H.; PLONKA, P. M.; THESTRUP-PEDERSON, K.; BERNARD, B. A.; SCHRÖDER, J. M.; DOTTO, P.; CHANG, C. M.; WILLIAMS, M. L.; FEINGOLD, K. R.; KING, L. E.; KLIGMAN, A. M.; REES, J. L.; CHRISTOPHERS, E. What is the “true” function of skin? **Experimental dermatology**, v. 11, n. 2, p. 159–87, abr. 2002.
- CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMIŃSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postępy dermatologii i alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, fev. 2013.
- CLARK, M. B.; AMARAL, P. P.; SCHLESINGER, F. J.; DINGER, M. E.; TAFT, R. J.; RINN, J. L.; PONTING, C. P.; STADLER, P. F.; MORRIS, K. V.; MORILLON, A.; ROZOWSKY, J. S.; GERSTEIN, M. B.; WAHLESTEDT, C.; HAYASHIZAKI, Y.; CARNINCI, P.; GINGERAS, T. R.; MATTICK, J. S. The Reality of Pervasive Transcription. **PLoS Biology**, v. 9, n. 7, p. e1000625, 12 jul. 2011.
- CLARK, W. H.; ELDER, D. E.; GUERRY, D.; EPSTEIN, M. N.; GREENE, M. H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–65, dez. 1984.
- COLBOURNE, J. K.; PFRENDER, M. E.; GILBERT, D.; THOMAS, W. K.; TUCKER, A.; OAKLEY, T. H.; TOKISHITA, S.; AERTS, A.; ARNOLD, G. J.; BASU, M. K.; BAUER, D. J.; CÁCERES, C. E.; CARMEL, L.; CASOLA, C.; CHOI, J.-H.; DETTER, J. C.; DONG, Q.; DUSHEYKO, S.; EADS, B. D.; FRÖHLICH, T.; GEILERSAMEROTTE, K. A.; GERLACH, D.; HATCHER, P.; JOGDEO, S.; KRIJGSVELD, J.; KRIVENTSEVA, E. V.; KÜLTZ, D.; LAFORSCH, C.; LINDQUIST, E.; LOPEZ, J.; MANAK, J. R.; MULLER, J.; PANGILINAN, J.; PATWARDHAN, R. P.; PITLUCK, S.; PRITHAM, E. J.; RECHTSTEINER, A.; RHO, M.; ROGOZIN, I. B.; SAKARYA, O.; SALAMOV, A.; SCHAACK, S.; SHAPIRO, H.; SHIGA, Y.; SKALITZKY, C.; SMITH, Z.; SOUVOROV, A.; SUNG, W.; TANG, Z.; TSUCHIYA, D.; TU, H.; VOS, H.; WANG, M.; WOLF, Y. I.; YAMAGATA, H.; YAMADA, T.; YE, Y.; SHAW, J. R.; ANDREWS, J.; CREASE, T. J.; TANG, H.; LUCAS, S. M.; ROBERTSON, H. M.; BORK, P.; KOONIN, E. V.; ZDOBNOV, E. M.; GRIGORIEV, I. V.; LYNCH, M.; BOORE, J. L. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia Pulex*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6017, p. 555–61, 4 fev. 2011.
- CONSORTIUM, T. E. P. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5696, p. 636–40, 22 out. 2004.
- CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561–563, 8 ago. 1970.
- DAMSKY, W. E.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**, v. 33, n. 19, p. 2413–22, 8 maio 2014.
- DAVIES, H.; BIGNELL, G. R.; COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN,

H.; GARNETT, M. J.; BOTTOMLEY, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; HAWES, R.; HUGHES, J.; KOSMIDOU, V.; MENZIES, A.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAYATILAKE, H.; GUSTERSON, B. A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRITCHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX-TRENCH, G.; RIGGINS, G. J.; BIGNER, D. D.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICHOLSON, A.; HO, J. W. C.; LEUNG, S. Y.; YUEN, S. T.; WEBER, B. L.; SEIGLER, H. F.; DARROW, T. L.; PATERSON, H.; MARAIS, R.; MARSHALL, C. J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M. R.; FUTREAL, P. A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–54, 27 jun. 2002.

DE GRUIJL, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 35, n. 14, p. 2003–9, dez. 1999.

DELGADO, M. D.; LEÓN, J. Gene expression regulation and cancer. **Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, v. 8, n. 11, p. 780–7, nov. 2006.

DENG, H.-P.; CHEN, L.; FAN, T.; ZHANG, B.; XU, Y.; GENG, Q. Long non-coding RNA HOTTIP promotes tumor growth and inhibits cell apoptosis in lung cancer. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 61, n. 4, p. 34–40, jan. 2015.

DERRIEN, T.; JOHNSON, R.; BUSSOTTI, G.; TANZER, A.; DJEBALI, S.; TILGNER, H.; GUERNEC, G.; MARTIN, D.; MERKEL, A.; KNOWLES, D. G.; LAGARDE, J.; VEERAVALLI, L.; RUAN, X.; RUAN, Y.; LASSMANN, T.; CARNINCI, P.; BROWN, J. B.; LIPOVICH, L.; GONZALEZ, J. M.; THOMAS, M.; DAVIS, C. a; SHIEKHATTAR, R.; GINGERAS, T. R.; HUBBARD, T. J.; NOTREDAME, C.; HARROW, J.; GUIGÓ, R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome research**, v. 22, n. 9, p. 1775–89, set. 2012.

DEVEREUX, T. R.; RISINGER, J. I.; BARRETT, J. C. Mutations and altered expression of the human cancer genes: what they tell us about causes. **IARC scientific publications**, n. 146, p. 19–42, jan. 1999.

DJEBALI, S.; DAVIS, C. A.; MERKEL, A.; DOBIN, A.; LASSMANN, T.; MORTAZAVI, A.; TANZER, A.; LAGARDE, J.; LIN, W.; SCHLESINGER, F.; XUE, C.; MARINOV, G. K.; KHATUN, J.; WILLIAMS, B. A.; ZALESKI, C.; ROZOWSKY, J.; RÖDER, M.; KOKOCINSKI, F.; ABDELHAMID, R. F.; ALIOTO, T.; ANTOSHECHKIN, I.; BAER, M. T.; BAR, N. S.; BATUT, P.; BELL, K.; BELL, I.; CHAKRABORTTY, S.; CHEN, X.; CHRAST, J.; CURADO, J.; DERRIEN, T.; DRENKOW, J.; DUMAIS, E.; DUMAIS, J.; DUTTAGUPTA, R.; FALCONNET, E.; FASTUCA, M.; FEJES-TOTH, K.; FERREIRA, P.; FOISSAC, S.; FULLWOOD, M. J.; GAO, H.; GONZALEZ, D.; GORDON, A.; GUNAWARDENA, H.; HOWALD, C.; JHA, S.; JOHNSON, R.; KAPRANOV, P.; KING, B.; KINGSWOOD, C.; LUO, O. J.; PARK, E.; PERSAUD, K.; PREALL, J. B.; RIBECA, P.; RISK, B.; ROBYR, D.; SAMMETH, M.; SCHAFFER, L.; SEE, L.-H.; SHAHAB, A.; SKANCKE, J.; SUZUKI, A. M.; TAKAHASHI, H.; TILGNER, H.; TROUT, D.; WALTERS, N.; WANG, H.; WROBEL, J.; YU, Y.; RUAN, X.; HAYASHIZAKI, Y.; HARROW, J.; GERSTEIN, M.; HUBBARD, T.; REYMOND, A.; ANTONARAKIS, S. E.; HANNON, G.; GIDDINGS, M. C.; RUAN, Y.; WOLD, B.; CARNINCI, P.; GUIGÓ, R.; GINGERAS, T. R. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101–8, 6 set. 2012.

DONG, Y.; RICHARDS, J.-A.; GUPTA, R.; AUNG, P. P.; EMLEY, A.; KLUGER, Y.; DOGRA, S. K.; MAHALINGAM, M.; WAJAPYEYEE, N. PTEN functions as a melanoma tumor suppressor by promoting host immune response. **Oncogene**, v. 33, n. 38, p. 4632–42, 18 set. 2014.

DVINGE, H.; BRADLEY, R. K. Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. **Genome medicine**, v. 7, n. 1, p. 45, jan. 2015.

EADES, G.; WOLFSON, B.; ZHANG, Y.; LI, Q.; YAO, Y.; ZHOU, Q. lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. **Molecular cancer research : MCR**, v. 13, n. 2, p. 330–8, fev. 2015.

EDDY, S. R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 12, p. 919–29, dez. 2001.

ERDMANN, V. A.; BARCISZEWSKA, M. Z.; HOCHBERG, A.; DE GROOT, N.; BARCISZEWSKI, J. Regulatory RNAs. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 58, n. 7, p. 960–77, jun. 2001.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 186–94, mar. 1998.

FERREIRA, L. B.; PALUMBO, A.; DE MELLO, K. D.; STERNBERG, C.; CAETANO, M. S.; DE OLIVEIRA, F. L.; NEVES, A. F.; NASCIUTTI, L. E.; GOULART, L. R.; GIMBA, E. R. P. PCA3 Noncoding RNA Is Involved in the Control of Prostate-Cancer Cell Survival and Modulates Androgen Receptor Signaling. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 507, 6 jan. 2012.

FIDLER, I. J.; KIM, S.-J.; LANGLEY, R. R. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. **Journal of cellular biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 927–36, 1 jul. 2007.

FINN, O. J. Cancer immunology. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 25, p. 2704–15, 19 jun. 2008.

FLINTOFT, L. Transcriptomics: Throwing light on dark matter. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 7, p. 455, jul. 2010.

FLOCKHART, R. J.; WEBSTER, D. E.; QU, K.; MASCARENHAS, N.; KOVALSKI, J.; KRETZ, M.; KHAVARI, P. A. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANC1 to regulate melanoma cell migration. **Genome research**, v. 22, n. 6, p. 1006–14, jun. 2012.

FORREST, A. R. R.; KAWAJI, H.; REHLI, M.; BAILLIE, J. K.; DE HOON, M. J. L.; LASSMANN, T.; ITOH, M.; SUMMERS, K. M.; SUZUKI, H.; DAUB, C. O.; KAWAI, J.; HEUTINK, P.; HIDE, W.; FREEMAN, T. C.; LENHARD, B.; BAJIC, V. B.; TAYLOR, M. S.; MAKEEV, V. J.; SANDELIN, A.; HUME, D. A.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y. A Promoter-Level Mammalian Expression Atlas. **Nature**, v. 507, n. 7493, p. 462–70, 27 mar. 2014.

FUNCK-BRENTANO, E.; HÉLIAS-RODZEWICZ, Z.; LONGVERT, C.; MOKHTARI, K.; SAIAG, P.; EMILE, J.-F. Increase in NRAS mutant allele percentage during metastatic melanoma progression. **Experimental dermatology**, 18 mar. 2016.

FURUE, M.; KADONO, T. Melanoma therapy: Check the checkpoints. **The Journal of dermatology**, v. 43, n. 2, p. 121–4, mar. 2016.

GABORY, A.; RIPOCHE, M.-A.; LE DIGARCHER, A.; WATRIN, F.; ZIYYAT, A.; FORNÉ, T.; JAMMES, H.; AINSCOUGH, J. F. X.; SURANI, M. A.; JOURNOT, L.; DANDOLO, L. H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 20, p. 3413–21, out. 2009.

GAITI, F.; FERNANDEZ-VALVERDE, S. L.; NAKANISHI, N.; CALCINO, A. D.; YANAI, I.; TANURDZIC, M.; DEGNAN, B. M. Dynamic and Widespread lncRNA Expression in a Sponge and the Origin of Animal Complexity. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 9, p. 2367–82, set. 2015.

GENG, Y. J.; XIE, S. L.; LI, Q.; MA, J.; WANG, G. Y. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. **The Journal of international medical research**, v. 39, n. 6, p. 2119–28, jan. 2011.

GERSTEIN, M. B.; BRUCE, C.; ROZOWSKY, J. S.; ZHENG, D.; DU, J.; KORBEL, J. O.; EMANUELSSON, O.; ZHANG, Z. D.; WEISSMAN, S.; SNYDER, M. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. **Genome research**, v. 17, n. 6, p. 669–81, 1 jun. 2007.

GHILDIYAL, M.; ZAMORE, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature reviews.**

**Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94–108, fev. 2009.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology** Sinauer Associates, , 2000. .

GLOSS, B. S.; DINGER, M. E. The specificity of long noncoding RNA expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 16–22, ago. 2015.

GONG, C.; MAQUAT, L. E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 284–8, 10 fev. 2011.

GREEN, A.; MACLENNAN, R.; YOUL, P.; MARTIN, N. Site distribution of cutaneous melanoma in Queensland. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 53, n. 2, p. 232–6, 21 jan. 1993.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–99, 19 mar. 2010.

GRUIS, N. A.; VAN DER VELDEN, P. A.; SANDKUIJL, L. A.; PRINS, D. E.; WEAVER-FELDHAUS, J.; KAMB, A.; BERGMAN, W.; FRANTS, R. R. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. **Nature genetics**, v. 10, n. 3, p. 351–3, jul. 1995.

GUÉNET, J. L. The mouse genome. **Genome research**, v. 15, n. 12, p. 1729–40, 1 dez. 2005.

GUESS, M. J.; WILSON, S. B. Introduction to hierarchical clustering. **Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society**, v. 19, n. 2, p. 144–51, abr. 2002.

GUFFANTI, A.; IACONO, M.; PELUCCHI, P.; KIM, N.; SOLDÀ, G.; CROFT, L. J.; TAFT, R. J.; RIZZI, E.; ASKARIAN-AMIRI, M.; BONNAL, R. J.; CALLARI, M.; MIGNONE, F.; PESOLE, G.; BERTALOT, G.; BERNARDI, L. R.; ALBERTINI, A.; LEE, C.; MATTICK, J. S.; ZUCCHI, I.; DE BELLIS, G. A transcriptional sketch of a primary human breast cancer by 454 deep sequencing. **BMC genomics**, v. 10, p. 163, jan. 2009.

GUO, H.; INGOLIA, N. T.; WEISSMAN, J. S.; BARTEL, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 835–40, 12 ago. 2010.

GUO, X.; GAO, L.; WANG, Y.; CHIU, D. K. Y.; WANG, T.; DENG, Y. Advances in long noncoding RNAs: identification, structure prediction and function annotation. **Briefings in Functional Genomics**, 13 jun. 2015.

GUPTA, R. A.; SHAH, N.; WANG, K. C.; KIM, J.; HORLINGS, H. M.; WONG, D. J.; TSAI, M.-C.; HUNG, T.; ARGANI, P.; RINN, J. L.; WANG, Y.; BRZOSKA, P.; KONG, B.; LI, R.; WEST, R. B.; VAN DE VIJVER, M. J.; SUKUMAR, S.; CHANG, H. Y. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071–6, 15 abr. 2010.

GUTTMAN, M.; AMIT, I.; GARBER, M.; FRENCH, C.; LIN, M. F.; FELDSER, D.; HUARTE, M.; ZUK, O.; CAREY, B. W.; CASSADY, J. P.; CABILI, M. N.; JAENISCH, R.; MIKKELSEN, T. S.; JACKS, T.; HACOEN, N.; BERNSTEIN, B. E.; KELLIS, M.; REGEV, A.; RINN, J. L.; LANDER, E. S. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 223–7, 12 mar. 2009.

GUTTMAN, M.; DONAGHEY, J.; CAREY, B. W.; GARBER, M.; GRENIER, J. K.; MUNSON, G.; YOUNG, G.; LUCAS, A. B.; ACH, R.; BRUHN, L.; YANG, X.; AMIT, I.; MEISSNER, A.; REGEV, A.; RINN, J. L.; ROOT, D. E.; LANDER, E. S. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. **Nature**, v. 477, n. 7364, p. 295–300, 15 set. 2011.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 16 jul. 2014.

HALL, J. R.; MESSENGER, Z. J.; TAM, H. W.; PHILLIPS, S. L.; RECIO, L.; SMART, R. C. Long noncoding RNA lincRNA-p21 is the major mediator of UVB-induced and p53-dependent apoptosis in keratinocytes. **Cell death & disease**, v. 6, p. e1700, 19 jan. 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HARDISON, R. C. Evolution of hemoglobin and its genes. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 12, p. a011627, dez. 2012.

HARLAND, M.; MELONI, R.; GRUIS, N.; PINNEY, E.; BROOKES, S.; SPURR, N. K.; FRISCHAUF, A. M.; BATAILLE, V.; PETERS, G.; CUZICK, J.; SELBY, P.; BISHOP, D. T.; BISHOP, J. N. Germline mutations of the CDKN2 gene in UK melanoma families. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 12, p. 2061–7, nov. 1997.

HARROW, J.; DENOEUDE, F.; FRANKISH, A.; REYMOND, A.; CHEN, C.-K.; CHRAST, J.; LAGARDE, J.; GILBERT, J. G. R.; STOREY, R.; SWARBRECK, D.; ROSSIER, C.; UCL, C.; HUBBARD, T.; ANTONARAKIS, S. E.; GUIGO, R. GENCODE: producing a reference annotation for ENCODE. **Genome biology**, v. 7 Suppl 1, p. S4.1–9, jan. 2006.

HARROW, J.; FRANKISH, A.; GONZALEZ, J. M.; TAPANARI, E.; DIEKHANS, M.; KOKOCINSKI, F.; AKEN, B. L.; BARRELL, D.; ZADISSA, A.; SEARLE, S.; BARNES, I.; BIGNELL, A.; BOYCHENKO, V.; HUNT, T.; KAY, M.; MUKHERJEE, G.; RAJAN, J.; DESPACIO-REYES, G.; SAUNDERS, G.; STEWARD, C.; HARTE, R.; LIN, M.; HOWALD, C.; TANZER, A.; DERRIEN, T.; CHRAST, J.; WALTERS, N.; BALASUBRAMANIAN, S.; PEI, B.; TRESS, M.; RODRIGUEZ, J. M.; EZKURDIA, I.; VAN BAREN, J.; BRENT, M.; HAUSSLER, D.; KELLIS, M.; VALENCIA, A.; REYMOND, A.; GERSTEIN, M.; GUIGÓ, R.; HUBBARD, T. J. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. **Genome research**, v. 22, n. 9, p. 1760–74, 1 set. 2012.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in Cancer: Biomarkers, Functions and Therapy. **Trends in molecular medicine**, v. 20, n. 8, p. 460–9, 1 ago. 2014.

HE, H.; JAZDZEWSKI, K.; LI, W.; LIYANARACHCHI, S.; NAGY, R.; VOLINIA, S.; CALIN, G. A.; LIU, C.-G.; FRANSSILA, K.; SUSTER, S.; KLOOS, R. T.; CROCE, C. M.; DE LA CHAPELLE, A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 52, p. 19075–80, 27 dez. 2005.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 7, p. 522–31, jul. 2004.

HEARING, V. J.; LEONG, S. P. L. **From melanocytes to melanoma: the progression to malignancy.** [s.l: s.n.]

HECHT, S. S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 14, p. 1194–210, 21 jul. 1999.

HÉLIAS-RODZEWICZ, Z.; FUNCK-BRENTANO, E.; BAUDOUX, L.; JUNG, C. K.; ZIMMERMANN, U.; MARIN, C.; CLERICI, T.; LE GALL, C.; PESCHAUD, F.; TALY, V.; SAIAG, P.; EMILE, J.-F. Variations of BRAF mutant allele percentage in melanomas. **BMC cancer**, v. 15, p. 497, jan. 2015.

HERLYN, M. Human melanoma: development and progression. **Cancer metastasis reviews**, v. 9, n. 2, p. 101–12, set. 1990.

HILLIER, L. W.; COULSON, A.; MURRAY, J. I.; BAO, Z.; SULSTON, J. E.; WATERSTON, R. H. Genomics in *C. elegans*: so many genes, such a little worm. **Genome research**, v. 15, n. 12, p. 1651–60, 1 dez.

2005.

HIOM, S. C. Diagnosing cancer earlier: reviewing the evidence for improving cancer survival. **British journal of cancer**, v. 112 Suppl , p. S1–5, 31 mar. 2015.

HODIS, E.; WATSON, I. R.; KRYUKOV, G. V; AROLD, S. T.; IMIELINSKI, M.; THEURILLAT, J.-P.; NICKERSON, E.; AUCLAIR, D.; LI, L.; PLACE, C.; DICARA, D.; RAMOS, A. H.; LAWRENCE, M. S.; CIBULSKIS, K.; SIVACHENKO, A.; VOET, D.; SAKSENA, G.; STRANSKY, N.; ONOFRIO, R. C.; WINCKLER, W.; ARDLIE, K.; WAGLE, N.; WARGO, J.; CHONG, K.; MORTON, D. L.; STEMKE-HALE, K.; CHEN, G.; NOBLE, M.; MEYERSON, M.; LADBURY, J. E.; DAVIES, M. A.; GERSHENWALD, J. E.; WAGNER, S. N.; HOON, D. S. B.; SCHADENDORF, D.; LANDER, E. S.; GABRIEL, S. B.; GETZ, G.; GARRAWAY, L. A.; CHIN, L. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–63, 20 jul. 2012.

HOLLEY, R. W.; APGAR, J.; EVERETT, G. A.; MADISON, J. T.; MARQUISEE, M.; MERRILL, S. H.; PENSWICK, J. R.; ZAMIR, A. STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. **Science (New York, N.Y.)**, v. 147, n. 3664, p. 1462–5, 19 mar. 1965.

HOMBACH, S.; KRETZ, M. The non-coding skin: exploring the roles of long non-coding RNAs in epidermal homeostasis and disease. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 35, n. 12, p. 1093–100, dez. 2013.

HOU, P.; ZHAO, Y.; LI, Z.; YAO, R.; MA, M.; GAO, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, Y.; HUANG, B.; LU, J. LincRNA-ROR induces epithelial-to-mesenchymal transition and contributes to breast cancer tumorigenesis and metastasis. **Cell death & disease**, v. 5, p. e1287, 12 jan. 2014.

HUARTE, M.; GUTTMAN, M.; FELDSER, D.; GARBER, M.; KOZIOL, M. J.; KENZELMANN-BROZ, D.; KHALIL, A. M.; ZUK, O.; AMIT, I.; RABANI, M.; ATTARDI, L. D.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; JACKS, T.; RINN, J. L. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. **Cell**, v. 142, n. 3, p. 409–19, 6 ago. 2010.

HUARTE, M.; RINN, J. L. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? **Human molecular genetics**, v. 19, n. R2, p. R152–61, 15 out. 2010.

HUBBARD, T. The Ensembl genome database project. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 38–41, 1 jan. 2002.

HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUMINTERNATIONAL. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931–45, 21 out. 2004.

HUSSEIN, M. R. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 8, p. 797–801, ago. 2004.

HUSSEIN, M. R. Extracutaneous Malignant Melanomas. **Cancer Investigation**, v. 26, n. 5, p. 516–534, 1 jan. 2008.

HUSSUSSIAN, C. J.; STRUEWING, J. P.; GOLDSTEIN, A. M.; HIGGINS, P. A.; ALLY, D. S.; SHEAHAN, M. D.; CLARK, W. H.; TUCKER, M. A.; DRACOPOLI, N. C. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nature genetics**, v. 8, n. 1, p. 15–21, set. 1994.

INCA. Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. v. 48, n. 3, p. 317–32, 2002.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

INOUYE, M. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation--a review. **Gene**, v. 72, n. 1-2, p. 25–34, 10 dez. 1988.

IORIO, M. V.; FERRACIN, M.; LIU, C.-G.; VERONESE, A.; SPIZZO, R.; SABBIONI, S.; MAGRI, E.; PEDRIALI, M.; FABBRI, M.; CAMPIGLIO, M.; MÉNARD, S.; PALAZZO, J. P.; ROSENBERG, A.; MUSIANI, P.; VOLINIA, S.; NENCI, I.; CALIN, G. A.; QUERZOLI, P.; NEGRINI, M.; CROCE, C. M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7065–70, 15 ago. 2005.

ISHIBASHI, M.; KOGO, R.; SHIBATA, K.; SAWADA, G.; TAKAHASHI, Y.; KURASHIGE, J.; AKIYOSHI, S.; SASAKI, S.; IWAYA, T.; SUDO, T.; SUGIMACHI, K.; MIMORI, K.; WAKABAYASHI, G.; MORI, M. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma. **Oncology reports**, v. 29, n. 3, p. 946–50, mar. 2013.

ISHIZU, H.; SIOMI, H.; SIOMI, M. C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. **Genes & development**, v. 26, n. 21, p. 2361–73, 1 nov. 2012.

IYENGAR, B. The melanocyte photosensory system in the human skin. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 158, dez. 2013.

JACQUIER, A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 12, p. 833–44, dez. 2009.

JANG, S.; ATKINS, M. B. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? **The Lancet. Oncology**, v. 14, n. 2, p. e60–9, fev. 2013.

JI, P.; DIEDERICH, S.; WANG, W.; BÖING, S.; METZGER, R.; SCHNEIDER, P. M.; TIDOW, N.; BRANDT, B.; BUERGER, H.; BULK, E.; THOMAS, M.; BERDEL, W. E.; SERVE, H.; MÜLLER-TIDOW, C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. **Oncogene**, v. 22, n. 39, p. 8031–41, 11 set. 2003.

KAI, M. Roles of RNA-Binding Proteins in DNA Damage Response. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, jan. 2016.

KALYANA-SUNDARAM, S.; KUMAR-SINHA, C.; SHANKAR, S.; ROBINSON, D. R.; WU, Y.-M.; CAO, X.; ASANGAN, I. A.; KOTHARI, V.; PRENSNER, J. R.; LONIGRO, R. J.; IYER, M. K.; BARRETTE, T.; SHANMUGAM, A.; DHANASEKARAN, S. M.; PALANISAMY, N.; CHINNAIYAN, A. M. Expressed pseudogenes in the transcriptional landscape of human cancers. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1622–34, 22 jun. 2012.

KAPRANOV, P.; CHENG, J.; DIKE, S.; NIX, D. A.; DUTTAGUPTA, R.; WILLINGHAM, A. T.; STADLER, P. F.; HERTEL, J.; HACKERMÜLLER, J.; HOFACKER, I. L.; BELL, I.; CHEUNG, E.; DRENKOW, J.; DUMAIS, E.; PATEL, S.; HELT, G.; GANESH, M.; GHOSH, S.; PICCOLBONI, A.; SEMENTCHENKO, V.; TAMMUNA, H.; GINGERAS, T. R. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5830, p. 1484–8, 8 jun. 2007.

KAPRANOV, P.; ST LAURENT, G.; RAZ, T.; OZSOLAK, F.; REYNOLDS, C. P.; SORENSEN, P. H. B.; REAMAN, G.; MILOS, P.; ARCECI, R. J.; THOMPSON, J. F.; TRICHE, T. J. The Majority of Total Nuclear-Encoded Non-Ribosomal RNA in a Human Cell Is “Dark Matter” Un-Annotated RNA. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 149, 21 jan. 2010.

KARRETH, F. A.; TAY, Y.; PERNA, D.; ALA, U.; TAN, S. M.; RUST, A. G.; DENICOLA, G.; WEBSTER, K. A.; WEISS, D.; PEREZ-MANCERA, P. A.; KRAUTHAMMER, M.; HALABAN, R.; PROVERO, P.; ADAMS, D. J.; TUVESON, D. A.; PANDOLFI, P. P. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 382–95, 14 out. 2011.

KERALIYA, A. R.; KRAJEWSKI, K. M.; BRASCHI-AMIRFARZAN, M.; TIRUMANI, S. H.; SHINAGARE, A. B.; JAGANNATHAN, J. P.; RAMAIYA, N. H. Extracutaneous melanomas: a primer for the radiologist.

**Insights into imaging**, v. 6, n. 6, p. 707–17, dez. 2015.

KHAITAN, D.; DINGER, M. E.; MAZAR, J.; CRAWFORD, J.; SMITH, M. a; MATTICK, J. S.; PERERA, R. J. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. **Cancer research**, v. 71, n. 11, p. 3852–62, 1 jun. 2011.

KHALIL, A. M.; GUTTMAN, M.; HUARTE, M.; GARBER, M.; RAJ, A.; RIVEA MORALES, D.; THOMAS, K.; PRESSER, A.; BERNSTEIN, B. E.; VAN OUDENAARDEN, A.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; RINN, J. L. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 28, p. 11667–72, 14 jul. 2009.

KIM, K.; JUTOORU, I.; CHADALAPAKA, G.; JOHNSON, G.; FRANK, J.; BURGHARDT, R.; KIM, S.; SAFE, S. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 13, p. 1616–25, 28 mar. 2013.

KINO, T.; HURT, D. E.; ICHIJO, T.; NADER, N.; CHROUSOS, G. P. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. **Science signaling**, v. 3, n. 107, p. ra8, 2 jan. 2010.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 4, p. 820–3, abr. 1971.

KOGO, R.; SHIMAMURA, T.; MIMORI, K.; KAWAHARA, K.; IMOTO, S.; SUDO, T.; TANAKA, F.; SHIBATA, K.; SUZUKI, A.; KOMUNE, S.; MIYANO, S.; MORI, M. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. **Cancer research**, v. 71, n. 20, p. 6320–6, 15 out. 2011.

KORESSAAR, T.; REMM, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 10, p. 1289–91, 15 maio 2007.

KRAEMER, K. H. Sunlight and skin cancer: Another link revealed. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 1, p. 11–14, 7 jan. 1997.

KRAEMER, K. H.; LEE, M. M.; ANDREWS, A. D.; LAMBERT, W. C. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. **Archives of dermatology**, v. 130, n. 8, p. 1018–21, ago. 1994.

KRETZ, M.; SIPRASHVILI, Z.; CHU, C.; WEBSTER, D. E.; ZEHNDER, A.; QU, K.; LEE, C. S.; FLOCKHART, R. J.; GROFF, A. F.; CHOW, J.; JOHNSTON, D.; KIM, G. E.; SPITALE, R. C.; FLYNN, R. A.; ZHENG, G. X. Y.; AIYER, S.; RAJ, A.; RINN, J. L.; CHANG, H. Y.; KHAVARI, P. A. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. **Nature**, v. 493, n. 7431, p. 231–5, 10 jan. 2013.

KRETZ, M.; WEBSTER, D. E.; FLOCKHART, R. J.; LEE, C. S.; ZEHNDER, A.; LOPEZ-PAJARES, V.; QU, K.; ZHENG, G. X. Y.; CHOW, J.; KIM, G. E.; RINN, J. L.; CHANG, H. Y.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR. **Genes & development**, v. 26, n. 4, p. 338–43, 15 fev. 2012.

KU, C.-S.; WU, M.; COOPER, D. N.; NAIDOO, N.; PAWITAN, Y.; PANG, B.; IACOPETTA, B.; SOONG, R. Exome versus Transcriptome Sequencing in Identifying Coding Region Variants. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 9 jan. 2014.

KUMAR, R.; ANGELINI, S.; CZENE, K.; SAUROJA, I.; HAHKA-KEMPPINEN, M.; PYRHÖNEN, S.; HEMMINKI, K. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 9, p. 3362–8, 15 ago. 2003.

KUNG, J. T. Y.; COLOGNORI, D.; LEE, J. T. Long noncoding RNAs: past, present, and future. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 651–69, mar. 2013.

LAKHANI, S. R.; JACQUEMIER, J.; SLOANE, J. P.; GUSTERSON, B. A.; ANDERSON, T. J.; VAN DE VIJVER, M. J.; FARID, L. M.; VENTER, D.; ANTONIOU, A.; STORFER-ISSER, A.; SMYTH, E.; STEEL, C. M.; HAITES, N.; SCOTT, R. J.; GOLDGAR, D.; NEUHAUSEN, S.; DALY, P. A.; ORMISTON, W.; MCMANUS, R.; SCHERNECK, S.; PONDER, B. A.; FORD, D.; PETO, J.; STOPPA-LYONNET, D.; BIGNON, Y. J.; STRUEWING, J. P.; SPURR, N. K.; BISHOP, D. T.; KLIJN, J. G.; DEVILEE, P.; CORNELISSE, C. J.; LASSET, C.; LENOIR, G.; BARKARDOTTIR, R. B.; EGILSSON, V.; HAMANN, U.; CHANG-CLAUDE, J.; SOBOL, H.; WEBER, B.; STRATTON, M. R.; EASTON, D. F. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 15, p. 1138–45, 5 ago. 1998.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, a; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, a; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, a; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, a; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, a; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, a; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, a; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, a; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. a; MARDIS, E. R.; FULTON, L. a; CHINWALLA, a T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, a; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J. F.; OLSEN, a; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. a; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, a; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, a; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, a; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, a; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, a; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. a; ABOLA, a P.; PROCTOR, M. J.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. a; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B. a; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLÖCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. a; BATEMAN, a; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H. C.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. a; KASIF, S.; KASPRYZK, a; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, a; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, a F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, a; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S. P.; YEH, R. F.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, a; WETTERSTRAND, K. a; PATRINOS, a; MORGAN, M. J.; DE JONG, P.; CATANESE, J. J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y. J.; SZUSTAKOWKI, J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001.

LEBLANC, V. G.; MARRA, M. A. Next-Generation Sequencing Approaches in Cancer: Where Have

They Brought Us and Where Will They Take Us? **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1925–58, jan. 2015.

LEE, J.-H.; CHOI, J.-W.; KIM, Y.-S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **The British journal of dermatology**, v. 164, n. 4, p. 776–84, abr. 2011.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–54, 3 dez. 1993.

LEE, Y. Y.; DERAKHSHAN, M. H. Environmental and lifestyle risk factors of gastric cancer. **Archives of Iranian medicine**, v. 16, n. 6, p. 358–65, jun. 2013.

LEONGAMORNLEERT, D.; SAUNDERS, E.; DADAEV, T.; TYMRAKIEWICZ, M.; GOH, C.; JUGURNAUTH-LITTLE, S.; KOZAREWA, I.; FENWICK, K.; ASSIOTIS, I.; BARROWDALE, D.; GOVINDASAMI, K.; GUY, M.; SAWYER, E.; WILKINSON, R.; ANTONIOU, A. C.; EELES, R.; KOTE-JARAI, Z. Frequent germline deleterious mutations in DNA repair genes in familial prostate cancer cases are associated with advanced disease. **British journal of cancer**, v. 110, n. 6, p. 1663–72, 18 mar. 2014.

LENER, M. R.; STEITZ, J. A. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 11, p. 5495–9, nov. 1979.

LEUCCI, E.; VENDRAMIN, R.; SPINAZZI, M.; LAURETTE, P.; FIERI, M.; WOUTERS, J.; RADAELLI, E.; EYCKERMAN, S.; LEONELLI, C.; VANDERHEYDEN, K.; ROGIERS, A.; HERMANS, E.; BAATSEN, P.; AERTS, S.; AMANT, F.; VAN AELST, S.; VAN DEN OORD, J.; DE STROOPER, B.; DAVIDSON, I.; LAFONTAINE, D. L. J.; GEVAERT, K.; VANDESOMPELE, J.; MESTDAGH, P.; MARINE, J.-C. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 518–522, 23 mar. 2016.

LEVIN, J. Z.; YASSOUR, M.; ADICONIS, X.; NUSBAUM, C.; THOMPSON, D. A.; FRIEDMAN, N.; GNIRKE, A.; REGEV, A. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. **Nature methods**, v. 7, n. 9, p. 709–15, set. 2010.

LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNEL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 16, p. 2078–9, 15 ago. 2009.

LI, R.; ZHANG, L.; JIA, L.; DUAN, Y.; LI, Y.; BAO, L.; SHA, N. Long Non-Coding RNA BANCR Promotes Proliferation in Malignant Melanoma by Regulating MAPK Pathway Activation. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100893, 26 jan. 2014.

LI, T.; WANG, S.; WU, R.; ZHOU, X.; ZHU, D.; ZHANG, Y. Identification of long non-protein coding RNAs in chicken skeletal muscle using next generation sequencing. **Genomics**, v. 99, n. 5, p. 292–8, maio 2012.

LI, Y.; KOWDLEY, K. V. MicroRNAs in common human diseases. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 246–53, out. 2012.

LIANG, P.; PARDEE, A. B. Analysing differential gene expression in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 869–76, nov. 2003.

LIN, P.-Y.; YU, S.-L.; YANG, P.-C. MicroRNA in lung cancer. **British journal of cancer**, v. 103, n. 8, p. 1144–8, 12 out. 2010.

LIN, R.; MAEDA, S.; LIU, C.; KARIN, M.; EDINGTON, T. S. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. **Oncogene**, v. 26, n. 6, p. 851–8, 8 fev. 2007.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n.

6, p. 321–333, 22 maio 2015.

LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, n. 5, p. 479–96, maio 2010.

LOEB, S.; CATALONA, W. J. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. **Therapeutic advances in urology**, v. 6, n. 2, p. 74–7, abr. 2014.

LONSDALE, J.; THOMAS, J.; SALVATORE, M.; PHILLIPS, R.; LO, E.; SHAD, S.; HASZ, R.; WALTERS, G.; GARCIA, F.; YOUNG, N.; FOSTER, B.; MOSER, M.; KARASIK, E.; GILLARD, B.; RAMSEY, K.; SULLIVAN, S.; BRIDGE, J.; MAGAZINE, H.; SYRON, J.; FLEMING, J.; SIMINOFF, L.; TRAINO, H.; MOSAVEL, M.; BARKER, L.; JEWELL, S.; ROHRER, D.; MAXIM, D.; FILKINS, D.; HARBACH, P.; CORTADILLO, E.; BERGHUIS, B.; TURNER, L.; HUDSON, E.; FEENSTRA, K.; SOBIN, L.; ROBB, J.; BRANTON, P.; KORZENIEWSKI, G.; SHIVE, C.; TABOR, D.; QI, L.; GROCH, K.; NAMPALLY, S.; BUIA, S.; ZIMMERMAN, A.; SMITH, A.; BURGESS, R.; ROBINSON, K.; VALENTINO, K.; BRADBURY, D.; COSENTINO, M.; DIAZ-MAYORAL, N.; KENNEDY, M.; ENGEL, T.; WILLIAMS, P.; ERICKSON, K.; ARDLIE, K.; WINCKLER, W.; GETZ, G.; DELUCA, D.; MACARTHUR, D.; KELLIS, M.; THOMSON, A.; YOUNG, T.; GELFAND, E.; DONOVAN, M.; MENG, Y.; GRANT, G.; MASH, D.; MARCUS, Y.; BASILE, M.; LIU, J.; ZHU, J.; TU, Z.; COX, N. J.; NICOLAE, D. L.; GAMAZON, E. R.; IM, H. K.; KONKASHBAEV, A.; PRITCHARD, J.; STEVENS, M.; FLUTRE, T.; WEN, X.; DERMITZAKIS, E. T.; LAPPALAINEN, T.; GUIGO, R.; MONLONG, J.; SAMMETH, M.; KOLLER, D.; BATTLE, A.; MOSTAFAVI, S.; MCCARTHY, M.; RIVAS, M.; MALLER, J.; RUSYN, I.; NOBEL, A.; WRIGHT, F.; SHABALIN, A.; FEOLO, M.; SHAROPOVA, N.; STURCKE, A.; PASCHAL, J.; ANDERSON, J. M.; WILDER, E. L.; DERR, L. K.; GREEN, E. D.; STRUEWING, J. P.; TEMPLE, G.; VOLPI, S.; BOYER, J. T.; THOMSON, E. J.; GUYER, M. S.; NG, C.; ABDALLAH, A.; COLANTUONI, D.; INSEL, T. R.; KOESTER, S. E.; LITTLE, A. R.; BENDER, P. K.; LEHNER, T.; YAO, Y.; COMPTON, C. C.; VAUGHT, J. B.; SAWYER, S.; LOCKHART, N. C.; DEMCHOK, J.; MOORE, H. F. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nature genetics**, v. 45, n. 6, p. 580–5, jun. 2013.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LUO, J.-H.; REN, B.; KERYANOV, S.; TSENG, G. C.; RAO, U. N. M.; MONGA, S. P.; STROM, S.; DEMETRIS, A. J.; NALESNIK, M.; YU, Y. P.; RANGANATHAN, S.; MICHALOPOULOS, G. K. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 44, n. 4, p. 1012–24, out. 2006.

MACKIE, R. M.; HAUSCHILD, A.; EGGERMONT, A. M. M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 20 Suppl 6, p. vi1–7, ago. 2009.

MAGNUS, K. Habits of sun exposure and risk of malignant melanoma: An analysis of incidence rates in Norway 1955–1977 by cohort, sex, age, and primary tumor site. **Cancer**, v. 48, n. 10, p. 2329–2335, 15 nov. 1981.

MANCIANTI, M. L.; HERLYN, M. Tumor progression in melanoma: the biology of epidermal melanocytes in vitro. **Carcinogenesis; a comprehensive survey**, v. 11, p. 369–86, jan. 1989.

MARIONI, J. C.; MASON, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome research**, v. 18, n. 9, p. 1509–17, set. 2008.

MÅSBÄCK, A.; WESTERDAHL, J.; INGVAR, C.; OLSSON, H.; JONSSON, N. Cutaneous malignant melanoma in southern Sweden 1965, 1975, and 1985. Prognostic factors and histologic correlations. **Cancer**, v. 79, n. 2, p. 275–83, 15 jan. 1997.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human molecular genetics**, v. 15 Spec No, p. R17–

29, 15 abr. 2006.

MAZAR, J.; ZHAO, W.; KHALIL, A. M.; LEE, B.; SHELLEY, J.; GOVINDARAJAN, S. S.; YAMAMOTO, F.; RATNAM, M.; AFTAB, M. N.; COLLINS, S.; FINCK, B. N.; HAN, X.; MATTICK, J. S.; DINGER, M. E.; PERERA, R. J. **The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells***Oncotarget*, 2014. .

MCCAIN, J. The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 38, n. 2, p. 96–108, fev. 2013.

MCGETTIGAN, P. a. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current opinion in chemical biology**, v. 17, n. 1, p. 4–11, fev. 2013.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 6, p. 449–58, jun. 2006.

MENDEL, G. Experiments in Plant Hybridization. **Journal of the Royal Horticultural Society**, v. IV, n. 1865, p. 3–47, 1865.

MERCER, T. R.; MATTICK, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 3, p. 300–7, mar. 2013.

MEYERSON, M.; GABRIEL, S.; GETZ, G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 10, p. 685–96, out. 2010.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.

MIZOGUCHI, M.; GUAN, Y.; YOSHIMOTO, K.; HATA, N.; AMANO, T.; NAKAMIZO, A.; SASAKI, T. Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 19, jan. 2013.

MORRIS, K. V.; MATTICK, J. S. The rise of regulatory RNA. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 6, p. 423–37, jun. 2014.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature methods**, v. 5, n. 7, p. 621–8, jul. 2008.

MUDGE, J. M.; FRANKISH, A.; HARROW, J. Functional transcriptomics in the post-ENCODE era. **Genome research**, v. 23, n. 12, p. 1961–73, dez. 2013.

NAGANO, T.; MITCHELL, J. A.; SANZ, L. A.; PAULER, F. M.; FERGUSON-SMITH, A. C.; FEIL, R.; FRASER, P. The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5908, p. 1717–20, 12 dez. 2008.

NAKAGAWA, T.; ENDO, H.; YOKOYAMA, M.; ABE, J.; TAMAI, K.; TANAKA, N.; SATO, I.; TAKAHASHI, S.; KONDO, T.; SATOH, K. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 436, n. 2, p. 319–24, 28 jun. 2013.

NAM, J.; BARTEL, D. P. Long noncoding RNAs in *C. elegans*. p. 2529–2540, 2012.

NANCARROW, D. J.; MANN, G. J.; HOLLAND, E. A.; WALKER, G. J.; BEATON, S. C.; WALTERS, M. K.; LUXFORD, C.; PALMER, J. M.; DONALD, J. A.; WEBER, J. L. Confirmation of chromosome 9p linkage in familial melanoma. **American journal of human genetics**, v. 53, n. 4, p. 936–42, out. 1993.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–86, set. 2010.

NASER, N. Melanoma cutâneo: estudo epidemiológico de 30 anos em cidade do sul do Brasil, de 1980-2009. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 932–941, out. 2011.

NEVINS, J. R.; POTTI, A. Mining gene expression profiles: expression signatures as cancer phenotypes. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 8, p. 601–9, ago. 2007.

NIE, L.; WU, H.-J.; HSU, J.-M.; CHANG, S.-S.; LABAFF, A. M.; LI, C.-W.; WANG, Y.; HSU, J. L.; HUNG, M.-C. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. **American journal of translational research**, v. 4, n. 2, p. 127–50, jan. 2012.

NOONAN, F. P.; RECIO, J. A.; TAKAYAMA, H.; DURAY, P.; ANVER, M. R.; RUSH, W. L.; DE FABO, E. C.; MERLINO, G. Neonatal sunburn and melanoma in mice. **Nature**, v. 413, n. 6853, p. 271–2, 20 set. 2001.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 194, n. 4260, p. 23–8, 1 out. 1976.

OHNO, S. So much “junk” DNA in our genome. **Brookhaven symposia in biology**, v. 23, p. 366–70, jan. 1972.

ONO, H.; MOTOI, N.; NAGANO, H.; MIYAUCHI, E.; USHIJIMA, M.; MATSUURA, M.; OKUMURA, S.; NISHIO, M.; HIROSE, T.; INASE, N.; ISHIKAWA, Y. Long noncoding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness, and clinical relapse in small-cell lung cancer. **Cancer medicine**, v. 3, n. 3, p. 632–42, jun. 2014.

OSTERLIND, A.; HOU-JENSEN, K.; MØLLER JENSEN, O. Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types, and comparison with non-melanoma skin cancer. **British journal of cancer**, v. 58, n. 3, p. 385–91, set. 1988.

PÁDUA ALVES, C.; FONSECA, A. S.; MUYS, B. R.; DE BARROS E LIMA BUENO, R.; BÜRGER, M. C.; DE SOUZA, J. E. S.; VALENTE, V.; ZAGO, M. A.; SILVA, W. A. Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 12, p. 2827–32, dez. 2013.

PARK, C.; YU, N.; CHOI, I.; KIM, W.; LEE, S. lncRNAtor: a comprehensive resource for functional investigation of long non-coding RNAs. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 17, p. 2480–5, 1 set. 2014.

PAULI, A.; VALEN, E.; LIN, M. F.; GARBER, M.; VASTENHOEW, N. L.; LEVIN, J. Z.; FAN, L.; SANDELIN, A.; RINN, J. L.; REGEV, A.; SCHIER, A. F. Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. **Genome research**, v. 22, n. 3, p. 577–91, mar. 2012.

PAWLIKOWSKI, J. S.; MCBRYAN, T.; VAN TUYN, J.; DROTAR, M. E.; HEWITT, R. N.; MAIER, A. B.; KING, A.; BLYTH, K.; WU, H.; ADAMS, P. D. Wnt signaling potentiates neovogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 40, p. 16009–14, 1 out. 2013.

PETERS, G. Tumor suppression for ARFicionados: the relative contributions of p16INK4a and p14ARF in melanoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 11, p. 757–9, 4 jun. 2008.

PETTY, E. M.; GIBSON, L. H.; FOUNTAIN, J. W.; BOLOGNIA, J. L.; YANG-FENG, T. L.; HOUSMAN, D. E.; BALE, A. E. Molecular definition of a chromosome 9p21 germ-line deletion in a woman with multiple melanomas and a plexiform neurofibroma: implications for 9p tumor-suppressor gene(s). **American journal of human genetics**, v. 53, n. 1, p. 96–104, jul. 1993.

PINES, O.; INOUE, M. Antisense RNA Regulation in Prokaryotes. **Trends in Genetics**, v. 2, p. 284–287, 1 jan. 1986.

- PLEASANCE, E. D.; CHEETHAM, R. K.; STEPHENS, P. J.; MCBRIDE, D. J.; HUMPHRAY, S. J.; GREENMAN, C. D.; VARELA, I.; LIN, M.-L.; ORDÓÑEZ, G. R.; BIGNELL, G. R.; YE, K.; ALIPAZ, J.; BAUER, M. J.; BEARE, D.; BUTLER, A.; CARTER, R. J.; CHEN, L.; COX, A. J.; EDKINS, S.; KOKKO-GONZALES, P. I.; GORMLEY, N. A.; GROCOCK, R. J.; HAUDENSCHILD, C. D.; HIMS, M. M.; JAMES, T.; JIA, M.; KINGSBURY, Z.; LEROY, C.; MARSHALL, J.; MENZIES, A.; MUDIE, L. J.; NING, Z.; ROYCE, T.; SCHULZ-TRIEGLAFF, O. B.; SPIRIDOU, A.; STEBBINGS, L. A.; SZAJKOWSKI, L.; TEAGUE, J.; WILLIAMSON, D.; CHIN, L.; ROSS, M. T.; CAMPBELL, P. J.; BENTLEY, D. R.; FUTREAL, P. A.; STRATTON, M. R. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 191–6, 14 jan. 2010.
- POLISENO, L.; MARRANCI, A.; PANDOLFI, P. P. Pseudogenes in Human Cancer. **Frontiers in medicine**, v. 2, p. 68, jan. 2015.
- PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 629–41, 20 fev. 2009.
- PRENSNER, J. R.; CHINNAIYAN, A. M. The emergence of lncRNAs in cancer biology. **Cancer discovery**, v. 1, n. 5, p. 391–407, out. 2011.
- QUEK, X. C.; THOMSON, D. W.; MAAG, J. L. V.; BARTONICEK, N.; SIGNAL, B.; CLARK, M. B.; GLOSS, B. S.; DINGER, M. E. lncRNADB v2.0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D168–73, jan. 2015.
- RAMSKÖLD, D.; KAVAK, E.; SANDBERG, R. How to analyze gene expression using RNA-sequencing data. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 802, p. 259–74, jan. 2012.
- RASPE, E.; DECRAENE, C.; BERX, G. Gene expression profiling to dissect the complexity of cancer biology: pitfalls and promise. **Seminars in cancer biology**, v. 22, n. 3, p. 250–60, jun. 2012.
- RAYCHAUDHURI, S.; STUART, J. M.; ALTMAN, R. B. Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. **Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing**, p. 455–66, jan. 2000.
- REINHARD DUMMER, MARK R. PITTELKOW, KEIJI IWATSUKI, ADÈLE GREEN, N. M. E. **Skin cancer - a world-wide perspective**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- REZAEI, M.; EMADI-BAYGI, M.; HOFFMANN, M. J.; SCHULZ, W. A.; NIKPOUR, P. Altered expression of LINC-ROR in cancer cell lines and tissues. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 28 ago. 2015.
- RINN, J. L.; KERTESZ, M.; WANG, J. K.; SQUAZZO, S. L.; XU, X.; BRUGMANN, S. A.; GOODNOUGH, L. H.; HELMS, J. A.; FARNHAM, P. J.; SEGAL, E.; CHANG, H. Y. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1311–23, 29 jun. 2007.
- RUAN, K.; FANG, X.; OUYANG, G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. **Cancer letters**, v. 285, n. 2, p. 116–26, 28 nov. 2009.
- SALK, J. J.; FOX, E. J.; LOEB, L. A. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. **Annual review of pathology**, v. 5, p. 51–75, jan. 2010.
- SALMENA, L.; POLISENO, L.; TAY, Y.; KATS, L.; PANDOLFI, P. P. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? **Cell**, v. 146, n. 3, p. 353–8, 5 ago. 2011.
- SARRAF, P.; MUELLER, E.; SMITH, W. M.; WRIGHT, H. M.; KUM, J. B.; AALTONEN, L. A.; DE LA CHAPELLE, A.; SPIEGELMAN, B. M.; ENG, C. Loss-of-Function Mutations in PPAR $\gamma$  Associated with Human Colon Cancer. **Molecular Cell**, v. 3, n. 6, p. 799–804, jun. 1999.
- SCHETTER, A. J.; OKAYAMA, H.; HARRIS, C. C. The role of microRNAs in colorectal cancer. **Cancer**

journal (Sudbury, Mass.), v. 18, n. 3, p. 244–52, jan.

SCHMIDT, L. H.; SPIEKER, T.; KOSCHMIEDER, S.; SCHÄFFERS, S.; HUMBERG, J.; JUNGEN, D.; BULK, E.; HASCHER, A.; WITTMER, D.; MARRA, A.; HILLEJAN, L.; WIEBE, K.; BERDEL, W. E.; WIEWRODT, R.; MULLER-TIDOW, C. The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth. **Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 6, n. 12, p. 1984–92, dez. 2011.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC molecular biology**, v. 7, p. 3, jan. 2006.

SHALGI, R.; HURT, J. A.; LINDQUIST, S.; BURGE, C. B. Widespread inhibition of posttranscriptional splicing shapes the cellular transcriptome following heat shock. **Cell reports**, v. 7, n. 5, p. 1362–70, 12 jun. 2014.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.

SIMS, D.; SUDBERY, I.; ILOTT, N. E.; HEGER, A.; PONTING, C. P. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 2, p. 121–32, fev. 2014.

SLEUTELS, F.; ZWART, R.; BARLOW, D. P. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. **Nature**, v. 415, n. 6873, p. 810–3, 14 fev. 2002.

SOUZA, R. J. S. P. de; MATTEDI, A. P.; REZENDE, M. L.; CORRÊA, M. de P.; DUARTE, E. M. Estimativa do custo do tratamento de câncer de pele tipo melanoma no Estado de São Paulo - Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 237–243, jul. 2009.

SOWMYA, G.; ANITA, S.; KANGUEANE, P. Insights from the structural analysis of protein heterodimer interfaces. **Bioinformatics**, v. 6, n. 4, p. 137–43, jan. 2011.

SPICUGLIA, S.; MAQBOOL, M. A.; PUTHIER, D.; ANDRAU, J.-C. An update on recent methods applied for deciphering the diversity of the noncoding RNA genome structure and function. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 63, n. 1, p. 3–17, 1 set. 2013.

SRIKANTAN, V.; ZOU, Z.; PETROVICS, G.; XU, L.; AUGUSTUS, M.; DAVIS, L.; LIVEZEY, J. R.; CONNELL, T.; SESTERHENN, I. A.; YOSHINO, K.; BUZARD, G. S.; MOSTOFI, F. K.; MCLEOD, D. G.; MOUL, J. W.; SRIVASTAVA, S. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 22, p. 12216–21, 24 out. 2000.

ST LAURENT, G.; SHTOKALO, D.; TACKETT, M. R.; YANG, Z.; EREMINA, T.; WAHLESTEDT, C.; URCUQUI-INCHIMA, S.; SEILHEIMER, B.; MCCAFFREY, T. A.; KAPRANOV, P. Intronic RNAs Constitute the Major Fraction of the Non-Coding RNA in Mammalian Cells. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 504, 24 jan. 2012.

ST. LAURENT, G.; WAHLESTEDT, C.; KAPRANOV, P. The Landscape of long noncoding RNA classification. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 5, p. 239–51, abr. 2015.

STECK, P. A.; PERSHOUSE, M. A.; JASSER, S. A.; YUNG, W. K.; LIN, H.; LIGON, A. H.; LANGFORD, L. A.; BAUMGARD, M. L.; HATTIER, T.; DAVIS, T.; FRYE, C.; HU, R.; SWEDLUND, B.; TENG, D. H.; TAVTIGIAN, S. V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature genetics**, v. 15, n. 4, p. 356–62, abr. 1997.

SU, Z.; NING, B.; FANG, H.; HONG, H.; PERKINS, R.; TONG, W.; SHI, L. Next-generation sequencing

and its applications in molecular diagnostics. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 11, n. 3, p. 333–43, abr. 2011.

SUMAZIN, P.; YANG, X.; CHIU, H.-S.; CHUNG, W.-J.; IYER, A.; LLOBET-NAVAS, D.; RAJBHANDARI, P.; BANSAL, M.; GUARNIERI, P.; SILVA, J.; CALIFANO, A. An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 370–81, 14 out. 2011.

SZYMANSKI, M.; BARCISZEWSKA, M. Z.; ERDMANN, V. A.; BARCISZEWSKI, J. A New Frontier for Molecular Medicine: Noncoding RNAs. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1756, n. 1, p. 65–75, 25 set. 2005.

TAFT, R. J.; MATTICK, J. S. Increasing Biological Complexity Is Positively Correlated with the Relative Genome-Wide Expansion of Non-Protein-Coding DNA Sequences. **Genome Biology**, v. 5, n. 1, p. P1, 1 dez. 2003.

TAFT, R. J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J. S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 29, n. 3, p. 288–99, mar. 2007.

TAN, S.; GUO, J.; HUANG, Q.; CHEN, X.; LI-LING, J.; LI, Q.; MA, F. Retained introns increase putative microRNA targets within 3' UTRs of human mRNA. **FEBS letters**, v. 581, n. 6, p. 1081–6, 20 mar. 2007.

TANG, L.; ZHANG, W.; SU, B.; YU, B. Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. **BioMed research international**, v. 2013, p. 251098, 2013.

TAS, F.; KESKIN, S.; KARADENIZ, A.; DAĞOĞLU, N.; SEN, F.; KILIC, L.; YILDIZ, I. Noncutaneous melanoma have distinct features from each other and cutaneous melanoma. **Oncology**, v. 81, n. 5-6, p. 353–8, jan. 2011.

TAY, Y.; KATS, L.; SALMENA, L.; WEISS, D.; TAN, S. M.; ALA, U.; KARRETH, F.; POLISENO, L.; PROVERO, P.; DI CUNTO, F.; LIEBERMAN, J.; RIGOUTSOS, I.; PANDOLFI, P. P. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 344–57, 14 out. 2011.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–212, 27 out. 2014.

THOELKE, A.; WILLRODT, S.; HAUSCHILD, A.; SCHADENDORF, D. Primary extracutaneous malignant melanoma: a comprehensive review with emphasis on treatment. **Onkologie**, v. 27, n. 5, p. 492–9, out. 2004.

TRIPATHI, V.; ELLIS, J. D.; SHEN, Z.; SONG, D. Y.; PAN, Q.; WATT, A. T.; FREIER, S. M.; BENNETT, C. F.; SHARMA, A.; BUBULYA, P. A.; BLENCOWE, B. J.; PRASANTH, S. G.; PRASANTH, K. V. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. **Molecular cell**, v. 39, n. 6, p. 925–38, 24 set. 2010.

TSAI, M.-C.; MANOR, O.; WAN, Y.; MOSAMMAPARAST, N.; WANG, J. K.; LAN, F.; SHI, Y.; SEGAL, E.; CHANG, H. Y. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5992, p. 689–93, 6 ago. 2010.

ULITSKY, I.; BARTEL, D. P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. **Cell**, v. 154, n. 1, p. 26–46, 3 jul. 2013.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S.

- G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115, ago. 2012.
- VAN OIJEN, M. G. C. T.; SLOOTWEG, P. J. Gain-of-Function Mutations in the Tumor Suppressor Gene p53. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, n. 6, p. 2138–2145, 1 jun. 2000.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends in genetics : TIG**, v. 9, n. 4, p. 138–41, abr. 1993.
- VOGELSTEIN, B.; PAPADOPOULOS, N.; VELCULESCU, V. E.; ZHOU, S.; DIAZ, L. A.; KINZLER, K. W. Cancer genome landscapes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6127, p. 1546–58, 29 mar. 2013.
- VULTUR, A.; HERLYN, M. SnapShot: Melanoma. **Cancer Cell**, v. 23, n. 5, p. 706–706.e1, maio 2013.
- WALSH, T.; KING, M.-C. Ten genes for inherited breast cancer. **Cancer cell**, v. 11, n. 2, p. 103–5, fev. 2007.
- WALTER, B. A.; VALERA, V. A.; PINTO, P. A.; MERINO, M. J. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. **Journal of Cancer**, v. 4, n. 5, p. 350–7, jan. 2013.
- WANG, C.; YAN, G.; ZHANG, Y.; JIA, X.; BU, P. Long non-coding RNA MEG3 suppresses migration and invasion of thyroid carcinoma by targeting of Rac1. **Neoplasma**, v. 62, n. 4, p. 541–9, jan. 2015.
- WANG, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. **Molecular cell**, v. 43, n. 6, p. 904–14, 16 set. 2011.
- WANG, L.; NIE, J.; SICOTTE, H.; LI, Y.; ECKEL-PASSOW, J. E.; DASARI, S.; VEDELL, P. T.; BARMAN, P.; WANG, L.; WEINSHIBOUM, R.; JEN, J.; HUANG, H.; KOHLI, M.; KOCHER, J.-P. A. Measure transcript integrity using RNA-seq data. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 58, 3 fev. 2016.
- WANG, Y.; LIU, X.-J.; YAO, X.-D. Function of PCA3 in prostate tissue and clinical research progress on developing a PCA3 score. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 26, n. 4, p. 493–500, ago. 2014.
- WELCH, J. D.; BARAN-GALE, J.; PEROU, C. M.; SETHUPATHY, P.; PRINS, J. F. Pseudogenes Transcribed in Breast Invasive Carcinoma Show Subtype-Specific Expression and ceRNA Potential. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 113, 22 jan. 2015.
- WHITEMAN, D. C.; WHITEMAN, C. A.; GREEN, A. C. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. **Cancer causes & control : CCC**, v. 12, n. 1, p. 69–82, jan. 2001.
- WHITWAM, T.; VANBROCKLIN, M. W.; RUSSO, M. E.; HAAK, P. T.; BILGILI, D.; RESAU, J. H.; KOO, H.-M.; HOLMEN, S. L. Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. **Oncogene**, v. 26, n. 31, p. 4563–70, 5 jul. 2007.
- WILMING, L. G.; GILBERT, J. G. R.; HOWE, K.; TREVANION, S.; HUBBARD, T.; HARROW, J. L. The vertebrate genome annotation (Vega) database. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D753–60, jan. 2008.
- WU, H.; GOEL, V.; HALUSKA, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3113–22, 19 maio 2003.
- WU, Y.; ZHANG, L.; WANG, Y.; LI, H.; REN, X.; WEI, F.; YU, W.; WANG, X.; ZHANG, L.; YU, J.; HAO, X. Long noncoding RNA HOTAIR involvement in cancer. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 9531–8, out. 2014.
- WU, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; WANG, Y.; LI, H.; REN, X.; WEI, F.; YU, W.; LIU, T.; WANG, X.; ZHOU, X.; YU, J.; HAO, X. Long non-coding RNA HOTAIR promotes tumor cell invasion and metastasis by

recruiting EZH2 and repressing E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. **International journal of oncology**, v. 46, n. 6, p. 2586–94, jan. 2015.

YAMASHITA, A.; SHICHINO, Y.; YAMAMOTO, M. The long non-coding RNA world in yeasts. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1859, n. 1, p. 147–54, jan. 2016.

YATES, L. R.; CAMPBELL, P. J. Evolution of the cancer genome. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 11, p. 795–806, nov. 2012.

YEUNG, K. Y.; RUZZO, W. L. Principal component analysis for clustering gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 17, n. 9, p. 763–74, set. 2001.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G. P.; ANDERSON, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental biology**, v. 302, n. 1, p. 1–12, 1 fev. 2007.

ZHANG, H.; ZHAO, L.; WANG, Y.-X.; XI, M.; LIU, S.-L.; LUO, L.-L. Long non-coding RNA HOTTIP is correlated with progression and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 11, p. 8805–9, nov. 2015.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao**, v. 38, n. 3, p. 95–109, 20 mar. 2011.

ZHANG, J.; ZHANG, P.; WANG, L.; PIAO, H.; MA, L. Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 46, n. 1, p. 1–5, jan. 2014.

ZHANG, X.; GEJMAN, R.; MAHTA, A.; ZHONG, Y.; RICE, K. A.; ZHOU, Y.; CHEUNSUHON, P.; LOUIS, D. N.; KLIBANSKI, A. Maternally expressed gene 3, an imprinted noncoding RNA gene, is associated with meningioma pathogenesis and progression. **Cancer research**, v. 70, n. 6, p. 2350–8, 15 mar. 2010.

ZHAO, W.; AN, Y.; LIANG, Y.; XIE, X.-W. Role of HOTAIR long noncoding RNA in metastatic progression of lung cancer. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 18, n. 13, p. 1930–6, jul. 2014.

ZHOU, G.; WANG, J.; ZHAO, M.; XIE, T.-X.; TANAKA, N.; SANO, D.; PATEL, A. A.; WARD, A. M.; SANDULACHE, V. C.; JASSER, S. A.; SKINNER, H. D.; FITZGERALD, A. L.; OSMAN, A. A.; WEI, Y.; XIA, X.; SONGYANG, Z.; MILLS, G. B.; HUNG, M.-C.; CAULIN, C.; LIANG, J.; MYERS, J. N. Gain-of-function mutant p53 promotes cell growth and cancer cell metabolism via inhibition of AMPK activation. **Molecular cell**, v. 54, n. 6, p. 960–74, 19 jun. 2014.

ZHU, J.; SAMMONS, M. A.; DONAHUE, G.; DOU, Z.; VEDADI, M.; GETLIK, M.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; AL-AWAR, R.; KATONA, B. W.; SHILATIFARD, A.; HUANG, J.; HUA, X.; ARROWSMITH, C. H.; BERGER, S. L. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. **Nature**, v. 525, n. 7568, p. 206–11, 10 set. 2015.

ZHU, L.; XU, P.-C. Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 432, n. 4, p. 612–7, 22 mar. 2013.

ZHUANG, Y.; WANG, X.; NGUYEN, H. T.; ZHUO, Y.; CUI, X.; FEWELL, C.; FLEMINGTON, E. K.; SHAN, B. Induction of long intergenic non-coding RNA HOTAIR in lung cancer cells by type I collagen. **Journal of hematology & oncology**, v. 6, p. 35, jan. 2013.

ZUO, L.; WEGER, J.; YANG, Q.; GOLDSTEIN, A. M.; TUCKER, M. A.; WALKER, G. J.; HAYWARD, N.; DRACOPOLI, N. C. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial

melanoma. **Nature genetics**, v. 12, n. 1, p. 97–9, jan. 1996.

## ANEXO I

**ANEXO I** - Tabela contendo estatísticas gerais do GENCODE versão 19 (Julho, 2013 - GRCh37). Essas informações são provenientes dos arquivos utilizados para anotação gênica.

<b>General stats</b>	
<b>Total No of Genes</b>	57820
<b>Protein-coding genes</b>	20345
<b>Long non-coding RNA genes</b>	13870
<b>Small non-coding RNA genes</b>	9013
<b>Pseudogenes</b>	14206
- processed pseudogenes:	10532
- unprocessed pseudogenes:	2942
- unitary pseudogenes:	161
- polymorphic pseudogenes:	45
- pseudogenes:	296
<b>Total No of Transcripts</b>	196520
<b>Protein-coding transcripts</b>	81814
- full length protein-coding:	57005
- partial length protein-coding:	24809
<b>Nonsense mediated decay transcripts</b>	13052
<b>Long non-coding RNA loci transcripts</b>	23898
<b>Immunoglobulin/T-cell receptor gene segments</b>	
- protein coding segments:	386
- pseudogenes:	230
<b>Total No of distinct translations</b>	61559
<b>Genes that have more than one distinct translations</b>	13600

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DE ORÇAMENTO E SUBMISSÃO DO ESTUDO A UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA - COMITÊ DE ÉTICA HCFMRP/USP.



**UPC**  
HCFMRP - USP

**PROJETO DE PESQUISA**



8094

Ribeirão Preto, 25 de FEVEREIRO de 2015.

Ilustríssima Senhora  
Prof.ª Dr.ª Márcia Guimarães Villanova  
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

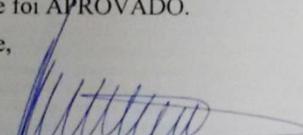
Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado ANALISE DA EXPRESSÃO DE LONG NON-CODING RNAs EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO TUMORAL, juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido no departamento de DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DA FMRP/USP.

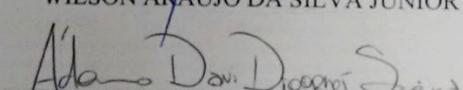
Informo também que o pesquisador responsável e orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Atenciosamente,



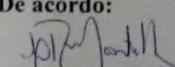
\_\_\_\_\_  
WILSON ARAUJO DA SILVA JUNIOR



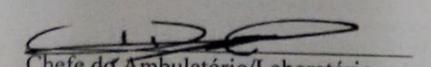
\_\_\_\_\_  
ADAMO DAVI DIÓGENES SIENA

Prof.ª Dra. Lucia Regina Martelli  
Suplente da Chefe do  
Departamento de Genética  
FMRP/USP

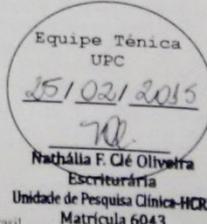
**De acordo:**



\_\_\_\_\_  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DA FMRP/USP  
Carimbar e Assinar



\_\_\_\_\_  
Chefe do Ambulatório/Laboratório  
Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas  
Diretor Presidente  
FUNDHERP



Equipe Técnica  
UPC  
25/02/2015  
70  
Nathália F. Clé Oliveira  
Escriturária  
Unidade de Pesquisa Clínica-HCRP  
Matrícula 6043

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.  
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário  
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

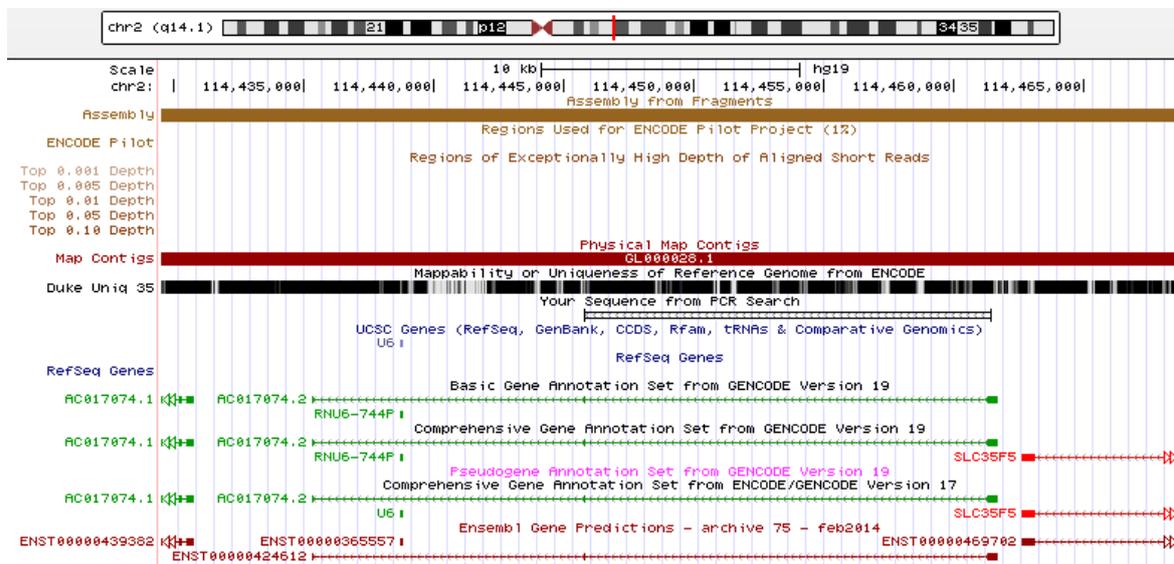
UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA  
Fone (16) 3602-2632 FAX: 3602-2962

## APÊNDICES

### APÊNDICE B – Região genômica utilizada para desenho de primers para PCR-Semiquantitativa do gene AC017074.

**TRANSCRITO: ENST00000424612 (lincRNA)**

OLIGO	start	len	tm	gc%	any th	3' th	hairpin	seq
LEFT PRIMER	221	20	58.86	50.00	0.00	0.00	0.00	
AGAGTCCCACCTTCAAAGCA								
RIGHT PRIMER	439	20	59.31	55.00	0.00	0.00	0.00	
ACTTGAAGTGGGAGGCAGAG								



#### Primer Melting Temperatures

**Forward: 59.8 C agagtcccaccttcaaagca**

**Reverse: 59.4 C acttgaactgggaggcagag**

## APÊNDICE C – Região genômica utilizada para desenho de primers para PCR-Semi quantitativa do gene SSU72.

**TRANSCRITO: ENST00000378726.1 (RETAINED\_INTRON)**

OLIGO 

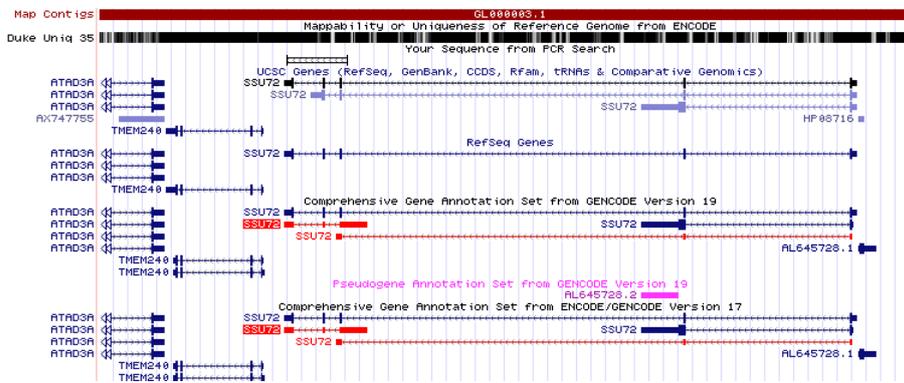
	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT_PRIMER	65	20	60.07	60.00	4.00	2.00	

  
AGGGGAGAGGTCTGGGTAGA

OLIGO 

	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
RIGHT_PRIMER	115	20	60.00	55.00	3.00	2.00	

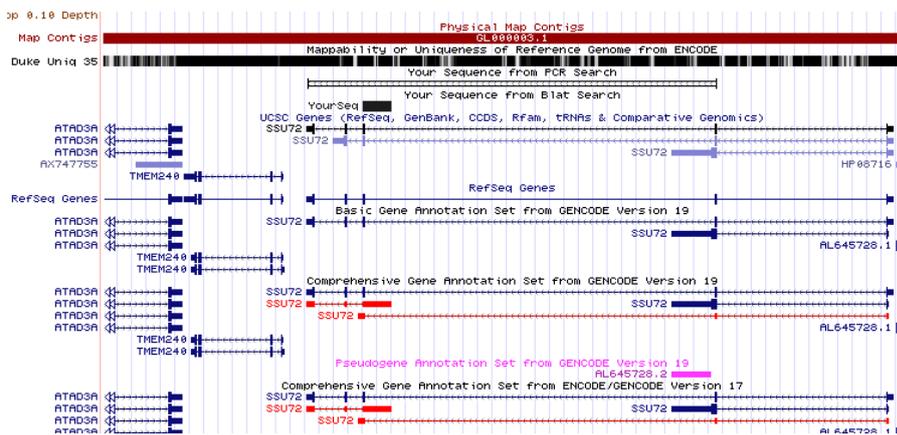
  
ACAGGTATGTCGGGAAGTGC



OLIGO 

	start	len	tm	gc%	any	th	3'	th	hairpin	seq
LEFT_PRIMER	37	20	58.58	55.00	12.63	9.59	0.00			

  
GACTCACGTGAAGCTTCCAG



### Primer Melting Temperatures

Forward: 60.1 C aggggagaggtctgggtaga  
 Forward: 58.6 C gactcacgtgaagcttcag  
 Reverse: 60.0 C acaggtatgtcgggaagtgc

