Cláudia Regina Gasque Schoof

Análise da função dos microRNAs na
regulação da expressão de *DNMT3B/Dnmt3b* e
MECP2/Mecp2

*Analysis of microRNAs function in the regulation of
DNMT3B/Dnmt3b and MECP2/Mecp2 gene expression*

São Paulo
2011

Cláudia Regina Gasque Schoof

Análise da função dos microRNAs na
regulação da expressão de *DNMT3B/Dnmt3b* e
MECP2/Mecp2

Analysis of microRNAs function in the regulation of
DNMT3B/Dnmt3b and *MECP2/Mecp2* gene expression

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Biologia (Genética)

Orientadora: Profª. Dra. Luciana dos
Reis Vasques

São Paulo
2011

Schoof, Cláudia Regina Gasque
Análise da função dos microRNAs na
expressão dos genes DNMT3B/Dnmt3b e
MECP2/Mecp2

252 páginas. Versão corrigida. A
versão original encontra-se disponível na
biblioteca do Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

Descritores: 1. DNMT3b 2. MeCP2
3. Epigenética 4. MicroRNAs 5. Câncer 6.
Células-tronco embrionárias

Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dra. Orientadora

*À minha família, pelo amor
e apoio incondicionais.*

*“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É
essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte”*

Albert Einstein

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana dos Reis Vasques, por ter me acolhido em seu laboratório, por todo o conhecimento que generosamente compartilhou comigo, por toda a paciência, pela confiança depositada em mim, por sempre levar em consideração minhas opiniões e por ter plantado em mim a sementinha do fascínio pelas minhas duas grandes paixões científicas: microRNAs e epigenética.

Aos meus pais Margarida e Augusto, e ao meu irmão Júnior, por todo o incentivo e apoio durante todos estes anos, sempre torcendo por mim e vibrando a cada conquista.

Ao meu namorado, Guto, pela paciência e compreensão nas incontáveis horas de estudo e finais de semanas no laboratório, pelo apoio incondicional, por todos os conselhos, pelo carinho, e por ser o melhor companheiro que se pode ter.

Ao Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro, pela generosidade em nos hospedar em seu laboratório durante todos estes anos, e por ter permitido a utilização de diversos equipamentos de seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Sinalização Celular da UNIFESP, por toda ajuda, conselhos, risadas e momentos de descontração proporcionados. Vou sentir saudades de vocês!!

Aos antigos colegas de laboratório, Paulo e Theresa, por terem iniciado esta jornada comigo e me ajudado inúmeras vezes.

À técnica do Laboratório de Sinalização Celular, Sandra, por sempre ter mantido tudo em ordem e impecável para a realização dos experimentos.

À Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira e às suas alunas Naja Vergani e Ana Maria Fraga pelo cultivo das células-tronco embrionárias murinas e humanas e sua diferenciação.

À Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis e às suas alunas, Adriana Taveira e Dra. Fernanda Molognoni, por terem cedido as linhagens murinas de melanócito e melanoma, e por toda a ajuda técnica prestada.

À Profa. Dra. Giselle Zenker Justo, pelo cultivo e tratamento das linhagens leucêmicas.

Às componentes da minha banca de qualificação, Profas. Dras. Célia Prizskulnik Koiffmann, Luciana Amaral Haddad e Dirce Maria Carraro, pelas valiosas sugestões e críticas a respeito deste trabalho.

À CAPES, por minha bolsa de mestrado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto de nosso laboratório.

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Epigenética.....	2
1.1.1. DNMT3.....	5
1.1.2. MECP2.....	8
1.2. MicroRNAs.....	9
2. Justificativa e Objetivos.....	17
2.1. Justificativa.....	17
2.2. Objetivos.....	17
2.2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. Metodologia Geral.....	19
3.1. Seleção de miRNAs candidatos.....	19
3.2. Cultura de células.....	19
3.3. Extração de Proteínas.....	19
3.3.1. Obtenção de Proteínas Totais.....	19
3.3.2. Obtenção de Proteínas Citoplasmáticas.....	20
3.4. Quantificação de Proteínas.....	20
3.5. <i>Western blotting</i>	21
3.6. Extração de RNA.....	23
3.7. Retrotranscrição de genes codificantes.....	26
3.8. Desenho de <i>primers</i>	26
3.9. PCR de Bancada de genes codificantes.....	28
3.10. PCR em tempo real de genes codificantes.....	29
3.11. Retrotranscrição de miRNAs.....	31
3.12. PCR em tempo real de miRNAs.....	33
3.13. Análise Estatística.....	33
4. Capítulo 1. Seleção <i>in silico</i> de microRNAs preditos de alvejarem	

<i>DNMT3B/Dnmt3b e MECP2/Mecp2</i>	35
4.1. Introdução.....	36
4.2. Metodologia.....	42
4.2.1. Seleção <i>in silico</i> de microRNAs candidatos.....	42
4.3. Resultados e Discussão.....	43
4.4. Conclusão.....	52
5. Capítulo 2. Correlação da expressão entre microRNAs e seus possíveis alvos <i>DNMT3B/Dnmt3b</i> e <i>MECP2/Mecp2</i> em células-tronco embrionárias humanas e murinas, antes e após a diferenciação	53
5.1. Introdução.....	54
5.1.1. Modificações Epigenéticas durante a embriogênese.....	57
5.1.2. MicroRNAs no início do desenvolvimento embrionário.....	63
5.2. Metodologia.....	68
5.2.1. Cultura de Células.....	68
5.2.2. Extração de proteínas citoplasmáticas e totais.....	68
5.2.3. <i>Western blotting</i>	68
5.2.4. Extração de RNA e retrotranscrição de genes codificantes.....	69
5.2.5. PCR em tempo real de genes codificantes.....	69
5.2.6. Retrotranscrição e PCR em tempo real de miRNAs.....	69
5.3. Resultados.....	71
5.4. Discussão.....	80
5.5. Conclusão.....	87
6. Capítulo 3. Análise da função dos microRNAs na expressão dos genes <i>Dnmt3b</i> e <i>Mecp2</i> em melanócitos e melanomas	88
6.1. Introdução.....	89
6.1.1. Modificações Epigenéticas no câncer.....	89
6.1.2. Inibidores de DNMTs.....	91
6.1.3. MicroRNAs no câncer.....	94
6.1.4. MicroRNAs e epigenética no câncer.....	98
6.1.5. Melanoma.....	103
6.2. Metodologia.....	106
6.2.1. Cultura de Células.....	106
6.2.2. Tratamento com 5-aza-CdR.....	106

6.2.3. Extração de proteínas, Western blotting, extração de RNA e Retrotranscrição de genes codificantes, retrotranscrição de miRNAs e PCR em tempo real de miRNAs.....	107
6.2.4. PCR em tempo real de genes codificantes.....	107
6.3. Resultados.....	108
6.3.1. Comparação entre linhagens de melanócito e melanomas.....	108
6.3.2. Comparação entre linhagens tratadas com 5-aza-CdR e células controle.....	113
6.4. Discussão.....	121
6.5. Conclusão.....	127
7. Capítulo 4. Análise da função dos microRNAs na expressão dos genes DNMT3B e MECP2 em células de leucemia.....	129
7.1. Introdução.....	130
7.1.1. Leucemia.....	130
7.1.2. Epigenética na Leucemia.....	133
7.1.3. MicroRNAs na Leucemia.....	135
7.1.4. Virolaxina.....	137
7.2. Metodologia.....	140
7.2.1. Cultivo de células.....	140
7.2.2. Tratamento com virolaxina.....	140
7.2.3. Extração de proteínas e <i>Western blotting</i>	140
7.2.4. Extração de RNA e Retrotranscrição de genes codificantes, retrotranscrição de miRNAs e PCR em tempo real de miRNAs.....	141
7.2.5. PCR em tempo real de genes codificantes.....	141
7.3. Resultados.....	143
7.3.1. Comparação entre linhagens.....	143
7.3.2. Comparação entre células tratadas com virolaxina e células-controle....	150
7.3.3. Análise da expressão proteica de BCR-ABL e ABL em células e leucemia.....	160
7.4. Discussão.....	162
7.5. Conclusão.....	176
8. Conclusão geral.....	178
9. Resumo.....	180
10. Abstract.....	182

11. Bibliografia.....	184
12. Anexo.....	212

Introdução Geral

Figura 1. Mecanismos de silenciamento gênico através da metilação do DNA.....5

Figura 2. Esquema da arquitetura de DNMT3b e suas isoformas.....7

Figura 3. Biogênese dos miRNAs.....13

Material e Métodos

Figura 1. Representação de gel obtido a partir de PCR.....29

Figura 2. Esquematização do funcionamento dos kits *TaqMan MicroRNA assay*.32

Capítulo 1

Figura 1. Técnicas para auxiliar na identificação de alvos de miRNAs.....40

Figura 2. Interações preditas entre miRNAs selecionados e mRNAs de *DNMT3B* e *MECP2* em *Homo sapiens*.....49

Figura 3. Interações preditas entre miRNAs selecionados e mRNAs de *Dnmt3b* e *Mecp2* em *Mus musculus*.....50

Capítulo 2

Figura 1. Dinâmica das modificações epigenéticas durante a embriogênese.....59

Figura 2. Expressão das DNA metiltransferases ao longo da embriogênese.....60

Figura 3. Mudanças no nível de metilação de ilhas CpG durante desenvolvimento normal e desenvolvimento *in vitro*.....61

Figura 4. Estabelecimento de metilação bimodal.....63

Figura 5. Função dos miRNAs em ESCs.....65

Figura 6. Microscopia de luz de células tronco embrionárias humanas indiferenciadas e diferenciadas e expressão do gene *OCT4* em ambos os tipos

celulares.....	72
Figura 7. Expressão de <i>DNMT3B</i> e <i>MECP2</i> através de PCR quantitativa em tempo real em células tronco embrionárias humanas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas.....	73
Figura 8. Expressão da proteína de <i>DNMT3B</i> e <i>MECP2</i> através de <i>Western blotting</i>	73
Figura 9. Expressão dos microRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real em células tronco embrionárias humanas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas.....	74
Figura 10. Correlação entre a expressão do RNA de <i>DNMT3B</i> e dos microRNAs selecionados.....	75
Figura 11. Correlação entre a expressão do RNA de <i>MECP2</i> e dos microRNAs selecionados.....	75
Figura 12. Microscopia de luz de células tronco embrionárias murinas indiferenciadas e diferenciadas e expressão do gene <i>Oct4</i> em ambos os tipos celulares.....	76
Figura 13. Expressão de <i>Dnmt3b</i> e <i>Mecp2</i> através de PCR quantitativa em tempo real em células tronco embrionárias murinas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas.....	77
Figura 14. Expressão da proteína de <i>Dnmt3b</i> e <i>Mecp2</i> através de <i>Western blotting</i> ...	77
Figura 15. Expressão dos microRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real em células tronco embrionárias murinas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas.....	78
Figura 16. Correlação entre a expressão do RNA de <i>Dnmt3b</i> e dos microRNAs selecionados.....	79
Figura 17. Correlação entre a expressão do RNA de <i>Mecp2</i> e dos microRNAs selecionados.....	79

Capítulo 3

Figura 1. Metilação do DNA e seus efeitos em células normais e tumorais.....	90
---	----

Figura 2. Diferenças dos padrões de metilação o DNA, acetilação de histonas e compactação da cromatina entre células normais e tumorais.....	93
Figura 3. MiRNAs em células normais e em tumores.....	95
Figura 4 . Mecanismos responsáveis pela alteração da expressão de miRNAs....	97
Figura 5. Inter-relação entre miRNAs e modificações epigenéticas em células normais e tumorais.....	100
Figura 6. Modelo de transformação maligna de melanócitos através de exposição repetitiva a estresse microambiental.....	105
Figura 7. Expressão de <i>Dnmt3b</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de melanoma 4C3- e 4C3+, em relação à linhagem de melanócitos normais da qual se derivam, Melan-a.....	108
Figura 8. Expressão de <i>Mecp2</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de melanoma 4C3- e 4C3+, em relação à linhagem de melanócitos normais da qual se derivam, Melan-a.....	109
Figura 9. Expressão dos miRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de Melan-a, 4C3- e 4C3+.....	111
Figura 10. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados <i>versus</i> a expressão de <i>Dnmt3b</i> e <i>Mecp2</i> em 4C3- e 4C3+, em comparação a células Melan-a.....	113
Figura 11. Expressão de <i>Dnmt3b</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de Melan-a, 4C3- e 4C3+ após tratamento com 5-aza-CdR em relação às respectivas linhagens não tratadas.....	114
Figura 12. Expressão de <i>Mecp2</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de Melan-a, 4C3- e 4C3+ após tratamento com 5-aza-CdR em relação às respectivas linhagens não tratadas.....	115
Figura 13. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real nas linhages Melan-a, 4C3- e 4C3+ após tratamento com 5-aza-CdR, em relação às células não tratadas....	116
Figura 14. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados <i>versus</i> a expressão de <i>Dnmt3b</i> e <i>Mecp2</i> em células Melan-a, 4C3- e 4C3+ tratadas com 5-aza-CdR, em comparação a células controle.....	118

Figura 15. Expressão da proteína de Dnmt3b através de <i>Western blotting</i>	119
Figura 16. Expressão da proteína de Mecp2 através de <i>Western blotting</i>	120

Capítulo 4

Figura 1. Estrutura química da violaceína.....	138
Figura 2. Expressão de DNMT3B através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena.....	143
Figura 3. Expressão de <i>MECP2</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena.....	144
Figura 4. Expressão de <i>ABL</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena.....	145
Figura 5. Expressão de <i>BCR-ABL</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia K562 e Lucena.....	145
Figura 6. Expressão dos miRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena.....	147
Figura 7. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados <i>versus</i> a expressão de <i>DNMT3B</i> e <i>MECP2</i> em K562 e Lucena, em comparação a células HL60.....	149
Figura 8. Expressão de <i>DNMT3B</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas.....	151
Figura 9. Expressão de <i>MECP2</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas.....	152
Figura 10. Expressão de <i>ABL</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas.....	153
Figura 11. Expressão de <i>BCR-ABL</i> através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas.....	154
Figura 12. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real na linhagem de leucemia	

HL60 após tratamento com violaceína, em relação às células não tratadas.....	155
Figura 13. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real na linhagem de leucemia K562 após tratamento com violaceína, em relação às células não tratadas.....	156
Figura 14. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real na linhagem de leucemia K562 após tratamento com violaceína, em relação às células não tratadas.....	157
Figura 15. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados <i>versus</i> a expressão de <i>DNMT3B</i> e <i>MECP2</i> em células tratadas com violaceína, em comparação a células controle.....	159
Figura 16. Expressão da proteína de <i>ABL</i> e <i>BCR-ABL</i> através de <i>Western blotting</i>	160
Figura 17. Esquema das possíveis vias afetadas pela introdução de violaceína em células HL60, K562 e Lucena.....	177

Material e Métodos

Tabela 1. Anticorpos utilizados para <i>Western blotting</i>	22
Tabela 2. Tabela de Kits utilizados para retrotranscrição e amplificação dos miRNAs estudados.....	31
Tabela 3. Eficiência de primers de miRNAs.....	33

Capítulo 1

Tabela 1. Critérios utilizados por 5 diferentes programas de predição.....	39
Tabela 2. MiRNAs preditos de alvejarem DNMT3B/Dnmt3b em humanos e camundongos por 5 diferentes sites de predição.....	43
Tabela 3. MiRNAs preditos de alvejarem DNMT3B/Dnmt3b e MECP2/Mecp2..	45
Tabela 4. Informações sobre os 6 miRNAs maduros selecionados para estudo....	48

Capítulo 2

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para PCR.....	69
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para PCR.....	107
--	-----

Capítulo 4

Tabela 1. <i>Primer</i> utilizados para PCR.....	142
---	-----

5-aza-CdR - 5-aza-deoxicitidina
AGO – proteína Argonauta
ALL – Leucemia Linfocítica Aguda
AML – Leucemia Mielóide Aguda
BSA – Albumina sérica bovina
cDNA – DNA complementar
CLL – Leucemia Linfocítica Crônica
CML – Leucemia Mielocítica Crônica
CpG – dinucleotídeos CG, nesta orientação
DEPC - Dietilpirocarbonato
DGCR8 - *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNMTs – DNA metiltransferases
EB – Corpo embrióide
ESC – células-tronco embrionárias
HDACs – Histonas deacetilases
hESC – células-tronco embrionárias humanas
HMTs – Histonas metiltransferases
ICF - Síndrome da Imunodeficiência, Instabilidade Centromérica e Dismorfismo Facial
iPS – células pluripotentes induzidas
MBPs – Proteínas com afinidade ao grupo metil
MEFs – Fibroblastos embrionários murinos
mESC – células-tronco embrionárias murinas
miRNAs – microRNAs
miRNP – complexo ribonucleoproteico de miRNA
ORF – *Open Reading Frame*
OSK - *Oct3/4, Sox3 e Klf4*
OSKM - *Oct3/4, Sox3, Klf4 e c-Myc*
OSNL - *OCT4, SOX2, LIN28 e NANOG*
PMA – Forbol miristato acetato

RISC – Complexo silenciador induzido por RNA

RNA – Ácido ribonucleico

TF – Fator de Transcrição

TRBP - *Trans Activator RNA Binding Protein*

Há uma década, o sequenciamento do genoma humano foi concluído (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), gerando grande comoção da comunidade científica devido a suas importantes implicações para os futuros desdobramentos, tanto da pesquisa básica, quanto aplicada. Sabe-se que todas as células de um determinado organismo possuem um mesmo código genético. Sendo assim, os diferentes tipos celulares encontrados em um organismo devem-se a uma expressão específica de determinados grupos de genes, o que permite às células desempenharem funções especializadas. Para isto, a expressão dos genes podem ser reguladas em diferentes níveis.

Em 1961, o primeiro modelo a respeito da regulação da expressão gênica foi proposto por Jacob e Monod em procariontes, no qual a presença de lactose é capaz de provocar uma mudança conformacional em uma molécula repressora, antes ligada ao sítio operador lac, permitindo assim a transcrição da unidade de expressão gênica denominada óperon (Jacob e Monod, 1961)

Nos anos seguintes, diversos outros mecanismos regulatórios foram descritos, tanto em procariontes como em eucariontes. Nestes últimos, a regulação da expressão dos diferentes genes pode ocorrer em diversos níveis, seja ele através de controle transcricional, pós-transcricional, pós-traducional, entre outros. O presente trabalho tem como foco duas importantes vias de regulação da expressão gênica: a epigenética e a dos microRNAs (miRNAs), que serão descritos a seguir.

1.1. Epigenética

O termo epigenética foi primeiramente cunhado por Conrad Waddington em 1942 e, atualmente, a definição mais aceita é a de que epigenética são mudanças herdáveis na expressão gênica, sem que haja por mudanças na sequência do DNA (Jones & Baylin, 2007). A epigenética em mamíferos, além de essencial para o desenvolvimento embrionário (Li et al., 1992), é importante também para o silenciamento gênico de longo-prazo, como o visto em regiões que possuem DNA repetitivo, no cromossomo X inativo encontrado em fêmeas de mamíferos e em regiões que sofrem *imprinting* genômico (Jones & Takai, 2001). O silenciamento gênico através da epigenética pode ocorrer através da metilação do DNA, modificações pós-traducionais de moléculas de histonas e remodelamento dos nucleossomos (revisto em Jones e Baylin, 2007).

Dentre as modificações epigenéticas conhecidas, a metilação é a mais bem estudada em mamíferos. Até hoje, 5 diferentes DNAs (citosina-5) metiltransferases (DNMTs) de mamíferos foram identificadas: Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b e a Dnmt3L (Bestor *et al.*, 1988; Okano *et al.*, 1998a; Yoder & Bestor, 1998; Bourc'his *et al.*, 2001). As proteínas desta família com atividade catalítica (Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b) transferem um grupo metil para a posição 5 do anel de carbonos da citosina presente em dinucleotídeos CpG. A Dnmt1 é constitutivamente expressa, possui alta atividade na metilação de DNA hemi-metilado e tem sido reconhecida como a metiltransferase principal de manutenção da metilação (Bestor, 2000). A inativação de ambos os alelos do gene *Dnmt1* em camundongos é letal, causa a expressão bialélica de genes que

normalmente sofrem *imprinting* e provoca a desmetilação global do DNA (Li *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993). A Dnmt2 é expressa em baixos níveis em todos os tecidos, tanto em humanos quanto em camundongos (Yoder & Bestor, 1998). Entretanto, apesar de possuir os mesmos motivos conservados das metiltransferases de citosinas, sua inativação em células tronco-embrionárias de camundongos não perturba nem a manutenção da metilação, nem a metilação *de novo* de DNA proviral (Okano et al., 1998a). Mais recentemente sua atividade catalítica foi elucidada, onde foi observada que tal enzima é capaz de transferir um grupo metil para a citosina 38 de RNAs transportadores, tanto em camundongos, como em plantas e insetos (Goll et al., 2006). Já as Dnmt3a e Dnmt3b, têm se mostrado essenciais para a metilação *de novo* do DNA no início do desenvolvimento embrionário, conforme será descrito no tópico a seguir. Por fim, a última metiltransferase pertencente à família, a Dnmt3L, não possui o motivo catalítico característico das Dnmts e parece estar mais envolvida com a atividade reguladora do estabelecimento do *imprinting* materno, do que com a metilação propriamente dita (Bourc'his *et al.*, 2001). De fato, mais recentemente, foi observado que tal proteína auxilia a ligação de grupos metil a uma variante de Dnmt3a, aumentando em 20 vezes a atividade de metilação desta última (Margot et al., 2003; Sakai et al., 2004).

Outro mecanismo epigenético de silenciamento gênico ocorre através da modificação de histonas. Cada histona possui dois domínios: um envolvido nas interações entre histona-histona e histona-DNA, e outro formando uma cauda no exterior do nucleossomo. Esta cauda pode interagir com outras proteínas regulatórias e com o DNA (Pruss *et al.*, 1995). Através de desacetilases, HDACs, um grupo acetil pode ser

removido de resíduos de lisina (Lys) presentes no domínio NH₂-terminal da cauda de histonas H4, aumentando a afinidade destas com o DNA e, por consequência, diminuindo a acessibilidade dos fatores de transcrição a esta região (Ng & Bird, 2000). De forma inversa, uma acetilase pode adicionar um grupo acetil e diminuir a afinidade da histona com o DNA, deixando-o livre para interagir com tais fatores (Wolffe, 1996). As modificações conformacionais nas histonas H3 também alteram a afinidade destas com o DNA. A metilação do resíduo Lys4 desta histona (H3K4me) está relacionada à atividade gênica, enquanto que a metilação do resíduo Lys9 (H3K9me) ao silenciamento gênico e à formação de heterocromatina (Heard *et al.*, 2001; Boggs *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2002).

Há diversos mecanismos pelos quais a metilação pode inibir a expressão gênica: ela pode impedir diretamente seu reconhecimento por fatores ligantes de DNA (Watt & Molloy, 1988); ser reconhecida por proteínas MBPs (*Methyl-CpG Binding Proteins*) (Boyce & Bird, 1991; Hendrich & Bird, 1998), promovendo remodelamento da cromatina na região metilada (Jones *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999); recrutar enzimas responsáveis por modificações pos-transcricionais na cauda N-terminal das histonas, como Histonas Metiltransferase (HMT) ou Deacetilases (HDAC) ; bem como, grupos metil ligados a citosinas no corpo do gene podem bloquear a elongação durante a transcrição (revisto em Klose & Bird, 2006) . Além disto, as proteínas que reconhecem ilhas CpG metiladas (MBPs) também são capazes de recrutar histonas deacetilases (HDACs), contribuindo para o remodelamento da cromatina (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998), conforme visto na figura 1.

Apesar de, tanto a metilação do DNA, quanto o remodelamento dos nucleossomos e as modificações das histonas serem eventos

importantes para o silenciamento gênico, ainda não se sabe ao certo qual a contribuição específica de cada evento, tanto em células normais quanto em estados patológicos, bem como suas interações, os quais ainda devem ser melhor elucidados (revisto em Jones e Baylin, 2002).

Figura 1. Mecanismos de silenciamento gênico através da metilação do DNA. (retirado de Klose & Bird, 2006).

1.1.1.DNMT3

Como dito anteriormente, as enzimas, DNMT3A e DNMT3B, são DNA metiltransferases que atuam na metilação *de novo* do DNA, metilando citosinas em DNA não metilado, e portanto, desempenhando importante papel no desenvolvimento embrionário (Okano, 1998). Existem evidências de que ambas as DNA metiltransferases, pertencentes ao grupo DNMT3, podem substituir uma a outra de maneira limitada no início do desenvolvimento embrionário (Chen et al., 2003; Okano et al.,

1999), uma vez que os domínios catalíticos das enzimas apresentam mecanismos cinéticos distintos (Gowher & Jeltsch, 2002). Enquanto DNMT3a está envolvida com a metilação de loci genéticos individuais, DNMT3b está envolvida com a metilação de regiões ricas em CpG, como as repetições pericentroméricas (Hata et al., 2002; revisto em Hermann et al., 2004). A ausência de Dnmt3b mostrou-se letal em embriões de camundongo, enquanto que embriões nocaute para Dnmt3a morrem pouco tempo após o nascimento (Okano et al., 1999), o que demonstra que Dnmt3b é necessária em períodos mais precoces do desenvolvimento em relação à Dnmt3a, desempenhando diferentes funções. Entretanto, ambas encontram-se altamente expressas em células-tronco embrionárias (ES) indiferenciadas, porém, em baixos níveis de expressão em células somáticas, com exceção de testículos, tireóide e medula óssea, demonstrando que, de fato, tem importante papel no início do desenvolvimento (Okano et al., 1998, Xie et al., 1999).

Ao todo, 8 isoformas de Dnmt3b já foram descritas, produtos de splicing alternativo, as quais possuem diferentes funções nos estágios do desenvolvimento. A Dnmt3b1 é a única isoforma que possui todos os éxons. A Dnmt3b2, por sua vez, apesar de não apresentar o éxon 11, apresenta atividade de metiltransferase, assim como a isoforma Dnmt3b1, e é encontrada principalmente em gonócitos de camundongos machos (Hermann et al., 2004; Sakai et al., 2004; La Salle et al., 2006). Dnmt3b3, além de não possuir o éxon 11, não contém os éxons 22 e 23 e, portanto, não apresenta atividade de metiltransferase, estando possivelmente mais envolvida com a regulação da metilação do DNA, do que com a metilação propriamente dita (Weisenberger et al., 2004; La Salle et al., 2006). A Dnmt3b4, por sua vez, não possui os éxons 11 e 22 e a Dnmt3b5, os éxons 11 e 23, gerando proteínas truncadas que também

não apresentam atividade catalítica, (Weisenberger et al., 2004; La Salle et al., 2006). Dnmt3b6, b7 e b8 possuem o éxon 11, assim como a isoforma Dnmt3b1, e são encontradas em células tronco embrionárias (ES) de camundongos (Chen et al., 2002). As isoformas Dnmt3b7 e 8 não possuem os éxons 22 e 23, respectivamente (Weisenberger et al., 2004; revisto em Lan et al., 2010).

Figura 2. Esquema da arquitetura de DNMT3b e suas isoformas. Retirado de Lan et al. (2010).

Em humanos, mutações no gene *DNMT3B* causam a síndrome ICF (Síndrome da Imunodeficiência, Instabilidade Centromérica e Dismorfismo Facial) (OMIM 242860), rara doença autossômica recessiva, caracterizada por imunodeficiência, apresentando rearranjos característicos dos cromossomos 1 e/ou 16 em linfócitos que encontram-se em mitose, e mais raramente do cromossomo 9, bem como, hipometilação dos satélites 2 e 3 destes cromossomos (Jeanpierre *et al.*, 1993; Okano *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). A imunodeficiência resulta em infecções recorrentes, e as principais anomalias faciais são hipertelorismo, micrognatia e macroglossia. Além disso, de um terço a um quinto dos pacientes possuem retardo mental ou defeitos neurológicos (revisto em Matarazzo et al., 2009).

1.1.2. MECP2

Diversas proteínas têm como propriedade a identificação de DNA metilado, como MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 e Kaiso (revisto em Klose & Bird, 2006) e podem mediar o silenciamento gênico através do recrutamento de complexos correpresores remodeladores de cromatina e histonas deacetilases (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Feng & Zhang, 2001; Yoon et al., 2003; Klose & Bird, 2004).

O membro fundador da família de proteínas MBDs é MeCP2, o qual possui dois domínios: um domínio ligante de grupos metil (MBD), e um domínio de repressão transcricional (TRD) (revisto em Dhasarathy & Wade, 2008). Foi demonstrado que esta proteína associa-se diretamente à Dnmt1, atuando na manutenção da metilação do DNA (Kimura & Shiota, 2003).

Em um estudo de análise da expressão gênica global em células murinas, foi demonstrado que poucos genes são modulados por Mecp2, uma vez que sua ausência provoca a desregulação de uma pequena gama de genes, dentre eles alguns pertencentes à via de sinalização dos glicocorticóides (Tudor et al., 2002; Nuber et al., 2005). Além disso, esta proteína parece não competir com as demais proteínas da família para acessar os nucleotídeos metilados, uma vez que liga-se a sítios específicos (Klose e Bird, 2006).

O gene MECP2 apresenta 4 éxons (Reichwald et al., 2000), codificados em duas isoformas, MeCP2 α , a forma mais abundante e que

não possui o éxon 2, e *Mecp2* β (Kriaucionis & Bird, 2004). Os transcritos de *Mecp2* possuem sítios de poliadenilação alternativos, os quais dão origem a RNAs mensageiros com diferentes regiões 3'UTR, os quais possuem expressão diferencial em diferentes tecidos. Interessantemente, foi observada também uma inesperada conservação das sequências contidas nas regiões dos 3'UTRs longos entre humanos e camundongos, o que indicaria uma possível conservação evolutiva das mesmas (Coy et al., 1999).

Mutações no gene *Mecp2* pode causar a Síndrome de Rett, doença de padrão de herança dominante ligada ao cromossomo X, sendo a hemizigose em embriões do sexo masculino, fatal. A incidência é de cerca de 1/10.000 nascimentos de mulheres, sendo em mais de 99% dos casos esporádicos. Há uma grande variedade fenotípica nesta doença, o que poderia ser explicado em parte pelo fato de o gene estar localizado no cromossomo X, o qual sofre inativação randômica em fêmeas de mamíferos. Assim, pacientes com um alelo mutante deste gene são um mosaico, possuindo metade de seus genes com o alelo normal ativo, e metade com o alelo mutante. Ocasionalmente, as células com o alelo selvagem podem ter vantagem sobre as células com o alelo mutado ativo, levando à uma seleção das células normais e, conseqüentemente, à uma menor severidade fenotípica da doença (revisto em Matarazzo et al, 2009)

1.2. MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes de cerca de 22nt, envolvidos na regulação de genes relacionados aos

mais variados processos biológicos, dentre eles o desenvolvimento embrionário, a proliferação celular e a apoptose. Entretanto, sua principal função é a de estabelecer e manter o estado diferenciado dos diversos tipos celulares de um organismo (Bartel, 2004; Bushati & Cohen, 2007). Esta classe de RNAs não codificantes é bastante conservada e de fundamental importância para o desenvolvimento de uma grande variedade de organismos eucarióticos, como plantas, nemátodos, insetos e mamíferos (Pasquinelli et al. 2000, Lagos-Quintana et al. 2001, Reinhart et al. 2000).

A primeira observação da existência destes pequenos RNAs foi realizada em *C. elegans*, em 1993, por dois grupos de pesquisadores independentes (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Nestes nemátodos, o controle do início do desenvolvimento larval está relacionado com a repressão da tradução do gene *lin-14*. A grande descoberta está no fato de que esta inibição da tradução se dá através da ligação, por complementaridade, do pequeno RNA endógeno, *lin-4*, à extremidade 3'UTR do mRNA do gene *lin-14*. Embora outro alvo de *lin-4*, o mRNA do gene *lin-28*, tenha sido identificado quatro anos mais tarde (Moss et al., 1997), este tipo específico de bloqueio da tradução parecia ser um caso isolado, até que em 2000 foi identificado outro pequeno RNA, *let-7*, que inibe a tradução de *lin-41* (Reinhart et al., 2000; Pasquinelli et al., 2000). Desde então, outros tantos foram subsequentemente identificados, não apenas em *C. elegans*, mas também em diversos outros organismos e, com isso, cunhou-se o termo microRNAs para classificá-los (Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001; Lee et al., 2001). Atualmente mais de 1000 miRNAs já foram identificados em humanos, (miRBase- <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>), constituindo de 1 a 3% dos genes presentes no genoma

(Zhao *et al.*, 2007). Estudo recente indica que os miRNAs podem ser responsáveis pela regulação de 30 a 60% dos genes codificantes de proteína em humanos (Bartel, 2004, Friedman *et al.*, 2009).

A localização dos miRNAs no genoma é variada, podendo se apresentar em regiões intergênicas ou inseridos em regiões intrônicas pertencentes a outros genes, caso de 70% dos miRNAs descritos (revisto em Kim, 2005). Nestes, o controle da expressão do miRNA normalmente é vinculado ao da expressão do gene hospedeiro, onde ambos encontram-se sujeitos à mesma região promotora (Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004). MiRNAs intragênicos podem estar localizados em íntrons de RNAs codificantes ou não codificantes, e até mesmo em éxons de RNAs que sofrem *splicing* alternativo (Lagos-Quintana *et al.* 2001, Lau *et al.* 2001, Lagos-Quintana *et al.* 2003, Rodriguez *et al.* 2004, Maselli *et al.* 2008). MiRNAs intrônicos, em vertebrados, são os mais abundantes, constituindo cerca de 40 a 70% de todos os miRNAs (Baskerville e Bartel, 2005; Griffiths-Jones *et al.*, 2008; revisto em Olena & Patton, 2009). Além disso, cerca de 40% dos miRNAs podem ser encontrados em *clusters*, formando transcritos policistrônicos que possuem expressão coordenada (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004; Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Recentemente foi proposto que miRNAs de um mesmo *cluster* regulam mRNAs que codificam proteínas relacionadas à uma mesma via (Yuan *et al.*, 2009). Além disto, sabe-se que mais de um miRNA pode se ligar a um mesmo mRNA alvo para atingir um silenciamento gênico efetivo (Doench e Sharp 2004), evidenciando a complexidade deste mecanismo de regulação.

Em geral, os miRNAs estão sujeitos ao controle transcricional da RNA Polimerase II (Lee *et al.*, 2004), possuindo cauda poli-A e 5'-Cap

(Cai et al., 2004), com algumas poucas exceções, onde são transcritos pela RNA polimerase III (Borchert et al., 2006). Estas pequenas moléculas com função regulatória são produzidas a partir de um transcrito primário (pri-miRNA), que possui estrutura(s) secundária(s) em forma de grampo com 60-80 nucleotídeos, que é reconhecido pela DROSHA, uma RNase III e sua parceira, DGCR-8 (em humanos) ou sua ortóloga pasha (em *Drosophila* e *C. elegans*) que, por sua vez, possui afinidade por duplas-fitas de RNA (Landthaler et al., 2004; Han et al., 2004). A atividade endoribonuclease da Drosha cliva os pri-miRNAs em miRNAs precursores, os pre-miRNAs, que são estruturas em forma de grampo de aproximadamente 70 nt, com dois nucleotídeos livres na extremidade 3' (Lee et al., 2003; Basyuk et al., 2003). Uma vez formados, os pre-miRNAs são exportados do núcleo pela Exportina 5 e seu co-fator Ran-GTP (Yi et al., 2003, Lund et al., 2004, Bohnsack et al., 2004) e processados em miRNAs *duplexes* de 21 a 25 nt pela Dicer, outra endoribonuclease pertencente à família RNase III, e sua parceira, TRBP (*Trans Activator RNA Binding Protein*) em humanos, ou sua ortóloga Loquacious em Drosófilas (Bernstein et al. 2001, Zhang et al. 2002, Chendrimada et al. 2005, Förstemann et al. 2005, Saito et al. 2005). Uma vez maduros, os *duplexes* de miRNAs são associados, através da Dicer, ao complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), formando o miRNP (*microRNA ribonucleoprotein complex*). Usualmente, a fita que possui maior instabilidade em sua porção 5' permanece no complexo e atuará no silenciamento pós-transcricional, enquanto a fita complementar é degradada. (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003). A principal proteína do complexo RISC pertence à família das argonautas (AGO), a qual, em humanos, é composta por 8 membros, sendo que 4 delas (AGO1 a 4) estão associadas à atividade do complexo

RISC. Dentre elas, somente a AGO2 retém a atividade catalítica, clivando a fita complementar (Liu et al. 2004, Meister et al. 2004 e revisto em Peters & Meister, 2007).

Figura 3. Biogênese dos miRNAs.

Esta via de regulação da expressão por miRNAs é bastante conservada, estando presente em plantas e animais. Dois mecanismos de ação diferentes foram identificados, determinados pelo grau de complementaridade do miRNA com seu alvo. Em um, o miRNA possui complementaridade total ou quase total com o RNA-alvo, sendo este clivado pelo RISC contendo Ago1 (em plantas) ou Ago2 (em *Drosophila* e mamíferos) e posteriormente degradado por RNases (Llave *et al.*, 2002; Meister *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004). Este mecanismo é mais encontrado em plantas, onde a região alvo normalmente encontra-se no ORF (*Open Reading Frame*) (Rhoades *et al.*, 2002). Em outro, o miRNA apresenta complementaridade parcial, reprimindo a tradução do RNA-alvo sem que haja sua degradação (Doench *et al.*, 2003; Doench *et al.*, 2004). Neste caso, apesar de a complementaridade com o RNA-alvo ser parcial, cada miRNA possui uma região, chamada de região semente (nucleotídeos 2 a 8), com complementaridade total, responsável pela especificidade do miRNA (Lewis *et al.*, 2003; Doench *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2005). A repressão, sem posterior degradação do RNA-alvo, é comumente encontrada em animais, nos quais a região 3'UTR do RNA-alvo é a mais freqüentemente alvejada (Lai, 2002, Bartel, 2004). Entretanto, mesmo em situações onde há complementaridade parcial, a degradação do RNA-alvo pode ocorrer, já que foram identificados *foci* citoplasmáticos, os *P-bodies* (*Processing bodies*) que, alternativamente, podem agrupar RNAs ligados ao miRISC à enzima Dcp1. Esta enzima media a clivagem do capuz 5' do RNA-alvo, ficando este sujeito a degradação por RNases (Liu *et al.*, 2005; revisto em Filipowicz *et al.*, 2008)

Existem raros casos em que a região de emparelhamento do

miRNA com o mRNA alvo não ocorre na região 3' UTR deste, dentre eles o miR-148, o qual liga-se à região codificante do transcrito de DNMT3B, reprimindo sua tradução (Duursma et al., 2008); e o miR-122, o qual liga-se à região 5' UTR do RNA do vírus da Hepatite C (HCV) (Díaz-Toledano et al., 2009).

Além das vias canônicas, estudos recentes têm demonstrado novas funções para a proteína Ago2. Em 2007, Diederichs e Haber observaram que a proteína Ago2 pode, em alguns casos, clivar o pre-miRNA em forma de grampo a uma distância de 12 nucleotídeos de sua extremidade 3', antes do processamento da Dicer. Tal evento geraria um produto intermediário, nomeado ac-pre-miRNA (*Ago2-cleaved pre-miRNA*), o qual é então processado pela Dicer e então carregado no complexo RISC. Os autores discutem que este processo poderia facilitar a remoção da fita passageira do complexo RISC. Outro estudo identificou um miRNA murino, miR-451, o qual não é processado pelo Dicer. Neste caso, o pre-miRNA é diretamente carregado para o complexo RISC e clivado pela Ago2 (Cheloufi et al., 2010). Em outro estudo, foi observado que a proteína Ago2, em conjunto com a FRX1 (*fragile-Xmental-retardation-related protein 1*) estimulam a tradução de TNFalfa ao ligarem-se a regiões ARE (AU-rich elements) presentes na região 3'UTR (Vasudevan et al., 2007)

Outra descoberta surpreendente nos últimos anos é a de que alguns miRNAs parecem estimular a tradução, ao invés de a suprimir, através de diferentes mecanismos, como miR-122, o qual liga-se à região 5' UTR do RNA do vírus da Hepatite C (HCV), alterando sua conformação e aumentando sua acessibilidade a ribossomos e outros fatores de iniciação (Díaz-Toledano et al., 2009) e miR-10b que liga-se à região 5' UTR de mRNAs que codificam para proteínas ribossomais,

facilitando sua tradução (Orom et al., 2008).

Como visto anteriormente, a maior parte dos miRNAs em vertebrados está localizada em regiões intrônicas de outros genes. Nestes casos, o início do processamento do miRNA ocorre simultaneamente ao do transcrito, antes do *splicing* (Kim et al., 2007; Morlando et al., 2008). Alternativamente, estes miRNAs podem também ser gerados diretamente como produto do *splicing*, sem passar pelo processamento da Drosha/DGCR8. Neste caso, denominam-se Mirtrons (MiRNAs intrônicos) (Berezikov et al., 2007; Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2006).

Em relação à nomenclatura adotada para se referir aos miRNAs, podem-se encontrar: nomes de miRNAs seguidos por letras, como por exemplo miR-29a e miR-29b, o que indica miRNAs com sequências bastante similares; miRNAs seguidos por hífen e números, como miR-29b-1 e miR-29b-2, o que indica dois pre-miRNAs distintos e em diferentes regiões genômicas, originando miRNAs maduros idênticos; miRNAs seguidos por “-5p” ou “-3p”, para indicar dois miRNAs originados dos braços opostos de um mesmo pre-miRNA, quando não se sabe qual dos dois miRNAs maduros é predominantemente expresso; miRNAs seguidos por “*”, como miR-155 e miR-155*, indicando que ele se origina do braço oposto ao do microRNA mais expresso de um pre-microRNA; e por fim, usam-se prefixos para se determinar a espécie a qual aquele miRNA pertence, como hsa-miR-29 (para *Homo sapiens*) ou mmu-miR-29 (para *Mus musculus*) (revisado em Elton et al., 2011).

2.1. Justificativa

A regulação da expressão gênica é essencial para a expressão tecido ou temporal-específica dos diversos genes que constam no genoma. Isto se deve ao fato de que diversas vias regulatórias foram surgindo ao longo da evolução, dentre elas a epigenética e os microRNAs. Um correto funcionamento destas vias é essencial para a homeostase celular, e perturbações são capazes de ocasionar diversas patologias, dentre elas o câncer. Crescentes evidências vêm demonstrando que ambas as vias desempenham importantes papéis tanto no desenvolvimento normal dos diferentes organismos (conforme será visto no capítulo 2), quanto na tumorigênese e manutenção tumoral (conforme será visto nos capítulos 3 e 4).

Além disto, estudos recentes têm demonstrado que diversos microRNAs estão inseridos em ilhas CpG, sendo regulados epigeneticamente, bem como RNAs mensageiros de diversos genes pertencentes à maquinaria epigenética sofrem regulação de microRNAs, o que evidencia a intrincada complexidade de regulação de ambas as vias. Apesar de diversos microRNAs já identificados, um número limitado destes possui funções conhecidas. Assim, um maior estudo a respeito de microRNAs que regulam genes componentes da maquinaria epigenética se faz necessário.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Identificar possíveis miRNAs envolvidos na modulação da expressão dos genes *DNMT3B/Dnmt3b* e *MeCP2/Mecp2* em diferentes linhagens de células normais e tumorais, bem como em células tronco embrionárias, tanto humanas como de camundongos.

2.2.2. Objetivos específicos

- Seleção *in silico*, através de diferentes sites de predição, de microRNAs candidatos a reguladores da expressão de *DNMT3B/Dnmt3b* e *MECP2/Mecp2*.
- Analisar a expressão de *DNMT3B/Dnmt3b* e *MECP2/Mecp2* e dos microRNAs preditos em células tronco embrionárias humanas e murinas, indiferenciadas e após a diferenciação.
- Analisar a expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* e dos microRNAs preditos em melanócitos normais e linhagens tumorais derivadas, bem como observar os efeitos do tratamento com agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-'Aza-CdR) sobre a expressão dos mesmos.
- Analisar a expressão de *DNMT3B* e *MECP2* e dos microRNAs preditos em diferentes linhagens de leucemia, bem como observar os efeitos do tratamento com violaceína.

3.1. Seleção *in silico* de microRNAs candidatos

Este item será melhor descrito no capítulo 1.

3.2. Cultura de células

O protocolo para o cultivo de cada linhagem celular será descrito nos respectivos capítulos (células tronco embrionárias humanas e murinas, Capítulo 2; melanomas e melanócitos, Capítulo 3; e células de Leucemia, Capítulo 4)

3.3. Extração de proteínas

3.3.1. Obtenção de proteínas totais

As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado e, a seguir, foi adicionado tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e Tris 50mM pH 8,0), além dos inibidores de proteases PMSF, Aprotinina, Leupeptina e Ortovanadato de Sódio em volumes adequados para se chegar às concentrações finais de 1mM, 10µg/mL, 10µg/mL e 200µM, respectivamente. As células foram mantidas em tampão RIPA a 4°C por 30 minutos para que fossem lisadas. A seguir, as células foram então removidas da placa com o auxílio de um *scraper* celular e a suspensão de células foi transferida para tubos *Eppendorf* de 1,5mL. As amostras foram então centrifugadas a 12000

rpm, por 15 minutos a 4°C. Então, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL e o *pellet* foi descartado. As amostras foram separadas em alíquotas e mantidas a -80°C.

3.3.2. Obtenção de proteínas citoplasmáticas

A extração de proteínas citoplasmáticas se deu de forma similar à de proteínas totais, sendo que, neste caso, o tampão utilizado foi NP-40 (20 mM Tris-base, pH 8,0; 137 mM NaCl; 1 % NP-40 e 10% Glicerol), com a adição das mesmas concentrações dos inibidores de protease previamente descritos.

3.4. Quantificação de proteínas

O método utilizado para quantificação proteica tanto nos extratos totais quanto citoplasmáticos foi o de Bradford (Bradford, 1976), o qual baseia-se na interação do corante *Comassie Brilliant Blue* com proteínas que possuem cadeias laterais básicas ou aromáticas, provocando o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, a qual absorve em 595nm (Compton & Jones, 1985).

Primeiramente, a cada quantificação, uma curva padrão foi feita utilizando-se diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA – Biolabs - Ipswich, Inglaterra), conforme descrito a seguir: 0uL, 5uL, 10uL, 15uL e 20uL de BSA 1mg/mL foram introduzidas em 5 tubos de 1,5mL contendo 800uL, 795uL, 790uL, 785uL e 780uL de NaCl 150mM. A seguir, 200uL de reagente de Bradford (Biorad – Califórnia, EUA) foi acrescentado a cada tubo e as amostras foram mantidas por 5 minutos em ambiente escuro. Após isto as amostras foram quantificadas, e foi obtida

uma curva a partir dos valores de absorbância medidos. Para a quantificação da concentração de proteínas nas amostras, então, foram introduzidos em microtubos 2uL dos extratos proteicos, 798uL de NaCl 150mM e 200uL de reagente de Bradford. Foram utilizadas também amostras controle, as quais continham 2uL do tampão utilizado, RIPA ou NP-40, ao invés dos 2uL do extrato proteico. A partir da curva previamente obtida e dos valores obtidos nas amostras controle, foram calculadas as concentrações das amostras.

3.5. *Western blotting*

Para a denaturação das proteínas, em um tubo de 1,5mL foram acrescentados 50ug da amostra proteica e quantidade suficiente de tampão de amostra (50mM Tris-HCl pH 6,8; 5% 2-mercaptoetanol; 2% SDS; 0,05% azul de bromofenol e 10% glicerol) e a amostra foi fervida a 95°C por 5 minutos.

A seguir, as amostras foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 8% (8% acrilamida, 375mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,06% TEMED) - Stacking Gel 5% (5% acrilamida, 125mM Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% TEMED). Além disto, foi aplicado também o padrão de peso *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas). Os géis contendo as amostras foram inseridos em cubas de corrida (*Cuba Mini Protean Tetra Cell* – BioRad laboratories – California, EUA), com adição de tampão de corrida (250mM Glicina, 25mM Tris-base e 0,1% SDS) e mantidos sob corrente elétrica de 15mA por gel por cerca de 1 hora e 30 minutos. Em seguida, as proteínas contidas no gel foram transferidas para membranas PVDF (Sigma-Aldrich - MO,USA), da seguinte forma: em um aparelho

de transferência semi-seca foram dispostos na seguinte ordem, 3 pedaços de papel filtro, membrana de PVDF, gel de poliacrilamida e três pedaços de papel filtro, de baixo para cima, respectivamente. Antes do uso, o papel filtro foi embebido em tampão de transferência (48mM Tris-base, 39mM Glicina, 0,037% SDS e 20% Metanol), bem como a membrana de PVDF foi embebida em metanol 100%. A seguir, as placas de transferência foram umidificadas com tampão de transferência e foi aplicada uma amperagem de uma vez e meia a área da membrana utilizada, por 1 hora e 30 minutos.

Então, as membranas foram coradas com solução Ponceau (0,5% Ponceau e 2,5% de ácido tricostatínico) para a verificação da correta transferência de proteínas e uma foto foi tirada pelo sistemas de captura de imagens LAS-4000 (Fujifilm - Tokyo, Japan).

A membrana foi então lavada 5 vezes de 5 minutos cada com solução TBS-T (10mM Tris-base pH 7,4; 150mM NaCl e 0,1% de Tween-20) e então sítios inespecíficos foram bloqueados através da incubação da membrana por 2 horas à temperatura ambiente com solução de leite desnatado Molico 5% em TBS-T em constante agitação. A seguir, a membrana foi lavada 3 vezes de 5 minutos cada com TBS-T e incubada durante toda a noite a 4°C com o anticorpo primário de interesse diluído em TBS-T 5% leite desnatado.

Tabela 1. Anticorpos utilizados para *Western blotting*.

Anticorpo Primário	diluição	secundário	ID	Empresa
Anti-Dnmt3b	1 para 800	camundongo	sc-70984	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-Mecp2	1 para 100	camundongo	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Anti-Beta actina	1 para 5000	camundongo	sc-101017	Santa Cruz Biotechnology Inc.

No dia seguinte, as membranas passaram por 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T e foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpo secundário *anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate* (Invitrogen – Ca, USA) na concentração de 1:3000 em TBS-T 5% leite desnatado. A seguir, as membranas foram lavadas 5 vezes de 5 minutos com TBS-T.

Para revelação da membrana, a mesma foi incubada por um minuto com a mesma proporção de Luminol:Tampão do kit *Immunodetection SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Chemical – Illinois, EUA). A membrana foi então revelada por quimiluminescência no sistema de captura de imagem LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) e visualizadas por meio do software *Fujifilm MultiGalge 3.1*.

Após a quantificação da proteína de interesse, a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos com TBS-T e incubada por 30 minutos a 50°C em Stripping Buffer (Tris-HCl pH 6,7 62,5mM, beta-mercaptoetanol 100mM e SDS 2%) em constante agitação. A seguir, a membrana foi lavada por 5 vezes de 5 minutos com TBS-T, e foi então submetida a marcação com anticorpo para o controle endógeno Beta-actina, no mesmo processo descrito acima.

Para a quantificação das bandas, foi utilizado o programa *Fujifilm MultiGalge 3.1*, e os valores obtidos foram plotados em gráficos e estatisticamente analisados no programa GraphPad Prism 5.

3.6. Extração de RNA

As células foram dispostas sobre superfície gelada e foram lavadas

com PBS 1X. A seguir, foram introduzidos 3mL de Trizol (Invitrogen – Califórnia, EUA) em placas de cultura de 10 cm de diâmetro, as células foram removidas da placa com auxílio de um *scraper* e a suspensão foi introduzida em tubos de 15mL estéreis. Nos tubos, foram acrescentados 600uL de clorofórmio e estes foram agitados e centrifugados a 2800 rpm a 4°C por 15 minutos para separação de fases. O RNA, contido na fase superficial transparente, foi transferido para outro tubo de 15mL e nele foram adicionados 1,5mL de Isopropanol, para precipitação do RNA. Esta solução foi centrifugada a 2800rpm a 4°C por 20 minutos e, então, o sobrenadante foi descartado por inversão. Então, foi adicionado ao *pellet* 1mL de álcool 75% (25% água DEPC) para lavagem da amostra, a qual foi centrifugada então a 1800rpm 4°C por 5 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi deixado no gelo por 5 a 10 minutos para secagem. Então, o *pellet* foi ressuspensão em volumes de 8 a 20 uL de água DEPC 0,1%, de acordo com o tamanho do pellet.

Após a extração do RNA, o mesmo teve suas concentrações quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc. - Carolina do Norte, EUA). Além disso, no mesmo aparelho, foi possível averiguar a qualidade das amostras a partir das razões 260/280 e 260/230.

Além disso, a qualidade das amostras de RNA também foi averiguada através de corrida de 1ug do mesmo em gel de agarose 1%. Neste caso, 1 ug do RNA foi diluído em tampão de amostra (azul de bromofenol 0,04%, xilenocianol 0,04% e 5% de glicerol) e inserido em gel de agarose 1% preparado em TBE 1X (Tris base 89mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2mM) e com adição de 7uL de *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium – CA, USA) em cada 100 mL de solução 1% agarose, sendo o GelRed um substituto menos tóxico do brometo de etídio. O gel

então foi submetido a uma tensão de 100V por aproximadamente 30 minutos em tampão TBE 1X e, então, foi visualizado em através do sistema de captura de imagem LAS-4000. Foram considerados íntegros os RNAs nos quais a banda correspondente ao rRNA 28S fosse cerca de 2 vezes mais intensas que a banda correspondente ao rRNA 18S.

A seguir, para evitar contaminações com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I (Promega). Para isto, o volume correspondente a 2ug de RNA foi adicionado à 2uL de DNase e 2uL de Buffer do Kit *RQ1 RNase-free DNase* (Promega), e água DEPC foi adicionada, totalizando 20uL de volume final. Por fim, esta solução foi mantida em banho seco por 60 minutos a 37°C.

Ao fim do tratamento com DNase, o RNA passou por um novo processo de purificação, com a finalidade de retirar os sais contidos no tampão fornecido no kit. Esta purificação consistiu primeiramente na adição de água DEPC suficiente para que completasse 100uL, seguido da adição de 100uL de fenolclorofórmio. Esta solução foi então centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A seguir, a primeira fase foi transferida para um novo tubo de 1,5mL, no qual foram adicionados 100uL de clorofórmio. Esta solução foi novamente centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Então, a primeira fase desta solução foi transferida para novo tubo de 1,5mL e nele foram adicionados 250uL de Isopropanol. Esta nova solução foi centrifugada a 13000rpm por 15 minutos a a 4 °C. A seguir, o sobrenadante resultante foi descartado por inversão, e o excesso retirado com auxílio de ponteiras. O *pellet* resultante foi ressuspendido em água DEPC 0,1% em quantidade suficiente para que a concentração final fosse de 250ng/uL, ou seja, para 2ug de RNA, foram adicionados 8uL de água DEPC 0,1%. Os RNAs purificados foram então armazenados a -80°C.

Dos 2ug tratados, 1ug foi utilizado para retrotranscrição de genes codificantes, utilizando-se o *High Capacity Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) completo; 0,5 ug foi tratado com o mesmo kit, sem adição da enzima retrotranscriptase, para verificação do funcionamento do tratamento com DNase, e 0,5ug foi utilizado para retrotranscrição de miRNAs, através do *High Capacity Reverse Transcription Kit* e primers contidos nos kits para retrontranscrição de miRNAs específicos (Applied). Mais detalhes destas reações serão descritas nos tópicos a seguir.

3.7. Retrotranscrição de genes codificantes

Para a síntese do cDNA dos genes codificantes, foi utilizada o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), tendo sido adicionados à solução 1uL de Buffer, 10X, 0,4 uL dNTP 100uM 25X, 1uL de Random Primer 10X, 0,5 de enzima retrotranscriptase 50U/uL, 4 uL (ou 1ug) de RNA tratado e 3,1uL de água DEPC 0,1%, totalizando 10 uL de solução final (reação RT+). Para verificação do funcionamento correto do tratamento com DNase, foi feita a mesma reação sem a adição da enzima de retrotranscriptase, adicionando-se água DEPC suficiente para completar 10uL de volume final (tendo estas reações sido denominadas RT -)

A seguir, as soluções foram acondicionadas em termociclador e submetidas ao seguinte programa: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 segundos.

3.8. Desenho de primers

Os primers utilizados para amplificação de fragmentos específicos foram desenhados conforme descrito a seguir. Primeiramente, a sequência completa codificante (CDS) do mRNA desejado foi acessada na biblioteca de nucleotídeos do NCBI (National Center for Biology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). A seguir, a sequência obtida foi adicionada na ferramenta BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) para alinhamento com a sequência genômica completa e assim, isolamento dos diferentes éxons.

Para desenho dos primers, a ferramenta Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) foi utilizada. Nela foi introduzida a sequência completa codificante, e os seguintes parâmetros foram seguidos: tamanho do produto entre 80 e 200 pares de bases, 20 primers como número de retorno, tamanho do primer entre 18 e 20 bases, temperatura de anelamento do primer de 58 a 60°C e porcentagem de nucleotídeos C e G do primer entre 30 a 50%.

Na lista resultante de 20 pares de primers candidatos, foram analisadas as seguintes características: não-formação de dímeros de primers (verificado através do programa Gene Runner - <http://www.generunner.net/>), verificação do não anelamento destes primers com sequências inespecíficas do genoma do organismo em questão, através do BLASTN dos primers selecionados e das sequências-referência de RNA do organismo (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> → “Nucleotide Blast” → aba “Blastn”), primers cujo fragmento amplificado encontra-se entre dois éxons, evitando assim a amplificação de DNA genômico e, por fim, primers que originam amplicons de cerca de 100 pares de bases. Através da observação destas 4 características, apenas um par de primers foi selecionado e sintetizado.

Os primers foram sintetizados em escala inicial de 25nmol e purificação padrão (Promega/IDT) e ressuspensos em água MilliQ autoclavada em volume suficiente para atingir a concentração final de 100uM, sendo então armazenados a -20°C. Os primers utilizados e suas respectivas sequências encontram-se descritos em cada capítulo.

3.9. PCR de bancada de genes codificantes

Para a verificação do funcionamento correto do tratamento com a DNase, genes referência Beta-actina foram amplificados a partir do cDNA sintetizado através de *primers* específicos. Assim, foi considerado um tratamento eficiente aquele cujas amostras RT+ apresentaram banda correspondente à beta-actina em gel de agarose após amplificação do gene Beta-actina, e cujas amostras RT- não apresentaram amplificação deste gene, obtendo-se um gel como o da figura 1.

Para isto, 1uL das amostras de cDNA são adicionados em tubos contendo 2,5uL de Buffer 10X, 0,5uL de dNTP 10mM, 1uL de Primer Sense 12,5uM, 1uL de Primer Antisense 12,5uM, 0,2uL Taq polimerase 5U/uL, 18,8uL água milli-Q; resultando em um volume final de 25uL. Foi feito também um controle negativo, onde foi adicionado 1uL de água milliQ ao invés de 1uL da amostra de cDNA. As amostras são então dispostas em termocicladores e submetidas ao seguinte programa: 94°C por 5 minutos, 35 repetições (94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 minutos).

A seguir, 10uL das amostras obtidas são adicionadas ao tampão de amostra (azul de bromofenol 0,04%, xilenocianol 0,04% e 5% de glicerol) e inserido em gel de agarose 2% preparado em TBE 1X e com

adição de 7uL de *GelRed* em cada 100 mL de solução 1% agarose. O gel foi então submetido a uma tensão de 100V por cerca de 45 minutos e então, foi visualizado em através do sistema de captura de imagem LAS-4000.

Figura 1. Representação de gel obtido a partir de PCR de Beta-actina em amostras de células tronco murinas cujo cDNA foi obtido a partir de RNA submetido à reação de retrotranscrição com a enzima retrotranscriptase (RT+), amostras onde não foi adicionada a enzima durante a retrotranscrição (RT-), e amostra controle negativa, onde não foi adicionado cDNA (Cont -).

3.10. PCR em tempo real de genes codificantes

Primeiramente, para a otimização da reação, foram feitas diluições seriadas de uma amostra de cDNA. Assim, as reações foram feitas da seguinte maneira: 7,5uL de Sybr Green Master MIX (Applied Biosystems), 0,25uL de Primer Sense 12,5uM, 0,25uL de Primer Antisense 12,5uM, 6uL de água milli-Q autoclavada, e 1uL de cDNA em diferentes concentrações (100ng/uL, 10ng/uL, 1ng/uL, 0,1ng/uL,

0,01ng/uL e 0,001ng/uL), sendo as reações todas realizadas em triplicatas. Foi também feito um controle negativo, denominado NTC (No Template Control), onde foi adicionado água milli-Q autoclavada no lugar do cDNA de interesse. A seguir, as amostras foram inseridas no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), sendo submetidas ao seguinte programa: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 repetições (15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60 °C). As amostras foram também submetidas ao estágio de dissociação, para posterior verificação de formação de dímeros de primers, ou contaminação das amostras.

A seguir, através das curvas obtidas nesta otimização, foi possível estabelecer a concentração ótima de cDNA a ser utilizada para o *primer* específico, bem como o valor da eficiência do primer, o qual será utilizado no cálculo da expressão dos genes.

Para o cálculo da eficiência, as diluições utilizadas foram convertidas em escala logaritma de base 10. A seguir, a média das triplicatas de cada diluição (eixo Y) e a diluição de cDNA em escala log (eixo X), foram plotadas em um gráfico, onde obteve-se uma reta e sua respectiva equação, onde $y=ax+b$, sendo a o coeficiente angular, utilizado para o cálculo da eficiência. Assim, a eficiência do primer corresponde a 10 elevado a $-1/a$.

Após a determinação da eficiência do primer e da diluição de cDNA necessária, foi feita a análise da expressão dos genes estudados nas amostras. Para isto, as reações foram feitas da mesma forma descrita anteriormente, utilizando-se a concentração de cDNA pré-estabelecida e o programa previamente descrito. Finalmente, para o cálculo da expressão, a seguinte fórmula foi utilizada:
$$\frac{\text{eficiência}_{\text{gene específico}}^{(Ct \text{ controle} - Ct \text{ amostra})}}{\text{eficiência}_{\text{gene normalizador}}^{(Ct \text{ controle} - Ct \text{ amostra})}}$$

3.11. Retrotranscrição de miRNAs

Para a retrotranscrição específica de miRNAs, por sua vez, foi utilizado o kit de *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) e os TaqMan MicroRNA Assays específicos (Applied Biosystems) listados na tabela abaixo (Applied Biosystems).

Tabela 2. Tabela de Kits utilizados para retrotranscrição e amplificação dos miRNAs estudados. Todos os kits podem ser utilizados para Homo sapiense Mus musculus, e amplificam microRNAs maduros.

<i>miRNA</i>	<i>Assay ID</i>
miR-26a	405
miR-26b	407
miR-29a	2112
miR-29b	413
miR-29c	587
MiR-203	507

Cada kit para retrotranscrição e amplificação de miRNA contém dois primers, um primer loop que é utilizado durante a retrotranscrição, e um primer utilizado durante o real time, conforme esquematizado na figura 2.

Figura 2. Esquematização do funcionamento dos kits TaqMan MicroRNA assay. Num primeiro passo, o primer em forma de loop reconhece a fita de miRNA, sendo portanto específico para miRNAs maduros. A seguir, para a amplificação do miRNA, uma nova fita é sintetizada. Durante a síntese, a DNA polimerase, por sua vez, quebra a sonda que está hibridizada ao alvo, liberando fluorescência. Figura modificada de <http://www.appliedbiosystems.com.br/>

Assim, para cada reação foram utilizados 0,15uL de dNTP 100uM, 1uL de enzima retrotranscriptase 50U/uL, 1,5uL de Buffer 10X, 4,35uL de água DEPC, 3uL de Primer Loop 5X, 5uL de RNA 8ng/uL, totalizando um volume final de 15uL. O programa utilizado no termociclador para a amplificação consiste em 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C.

3.12. PCR em tempo real de miRNAs

Para a amplificação dos cDNAs de miRNAs, foi utilizado o *Primer para Real Time* do Kit *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems) e *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Neste caso, foram utilizados 1uL de Primer 20X, 2,66uL de cDNA, 10uL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2X e 7,67 uL de água milli-Q autoclavada, totalizando 20uL de produto final. Cada cDNA foi utilizado em uma duplicata de real time, e foi feito controle negativo, sem a adição de cDNA. As amostras foram submetidas ao mesmo programa do utilizado para amplificação por PCR em tempo real dos genes codificantes previamente descrito. A seguir, a expressão dos miRNAs foi analisada da mesma maneira descrita também para genes codificantes.

Adicionalmente, a eficiência dos primers de miRNAs foi calculada da mesma maneira descrita anteriormente, conforme a tabela a seguir.

Tabela 3. Eficiência de primers de miRNAs.

miRNA	Eficiência
miR-26a	1,99
miR-26b	2
miR-29a	1,94
miR-29b	2,25
miR-29c	1,9
miR-203	2,18

3.13. Análise Estatística

Para análise estatística e plotagem dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0 (Califórnia, EUA). A análise estatística deu-se através da utilização de teste T pareado bicaudal, com intervalos de confiança de 95%.

4. Capítulo 1 – Seleção *in silico* de microRNAs preditos
de alvejarem *DNMT3B/Dnmt3b* e *MECP2/Mecp2*

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de cerca de 22 nucleotídeos responsáveis pelo silenciamento de ao menos 30% dos genes em mamíferos (Bartel, 2004). Um único miRNA é capaz de alvejar centenas de RNAs alvos, bem como um único RNA mensageiro pode ser regulado por vários miRNAs (revisto em Barbato et al., 2009). A predição computacional de alvos de miRNAs em mamíferos, porém, é dificultada pelo fato de que nestes organismos o pareamento é imperfeito, uma vez que nestes, comente a região semente, constituída por 7 nucleotídeos, possui pareamento perfeito. Assim, sites de predição utilizam diferentes critérios para seleção de possíveis alvos, o que, muitas vezes, torna suas predições pouco sobrepostas (Sethupathy et al., 2006), muitas vezes resultando em diversas predições falso-positivas, bem como falso-negativas (Alexiou et al., 2009). Desta forma, o método mais confiável de predição *in silico* adotado tem sido a predição de alvos através de diferentes algoritmos, e seleção dos resultados sobrepostos, ou seja, de genes preditos por mais de um programa de predição.

Entre os critérios utilizados para predição de alvos em mamíferos, estão: pareamento na região semente; localização do sítio de pareamento na região 3'-UTR do RNA mensageiro alvo; conservação sítios preditos de alvejamento entre as diferentes espécies para miRNAs também conservados; acessibilidade do mRNA alvo de acordo com sua estrutura secundária, o que pode ser inferido através do cálculo de energia mínima livre; múltiplos sítios de alvejamento em um mesmo mRNA; correlação inversa de expressão entre o miRNA e o RNA alvo (revisto em Ghosh et

al., 2007; Saito & Saetrom, 2010; Thomas et al., 2010).

O pareamento na região semente na maioria das vezes é completo e pode ser detectado por programas de predição que exigem pareamento rigoroso desta região (Lewis et al., 2005; Grimson et al., 2007), porém o RISC também pode permitir o pareamento de regiões sementes com um nucleotídeo não pareado (Chi et al., 2009, Zisoulis et al., 2010), o qual só é reconhecido por sites de predição que adotam critérios moderadamente rigorosos de pareamento na região semente, ou seja, que aceitam pareamentos imperfeitos (Gaidatzis et al., 2007).

Além disso, embora a posição do sítio no RNA alvo seja na maior parte das vezes na região 3'UTR em mamíferos (Stark et al., 2005), conforme descrito anteriormente, existem exceções, como miRNAs que alvejam a região codificante, bem como a região 5'UTR do RNA mensageiro alvo (Duursma et al., 2008; Diaz-Toledano et al., 2009). Assim, a região na qual se encontra a região semente pode ou não ser levada em consideração por um programa de predição.

MiRNAs e suas respectivas famílias conservados entre as diferentes espécies usualmente possuem alvos também conservados (Friedman et al., 2009). Assim, programas de predição que selecionam sítios de alvejamento conservados entre as diferentes espécies podem ser úteis para a redução de resultados falso-positivos, porém só pode ser utilizado para miRNAs também conservados entre as espécies (revisto em Saito e Saetrom, 2010).

Para que o miRNA possa hibridizar-se ao sítio alvo, este precisa estar acessível, ou seja, apesar dos mRNAs possuírem estruturas secundárias, a região a ser alvejada precisa estar em uma região livre de pareamento (Kertesz et al., 2007; Long et al., 2007). Esta acessibilidade pode ser estimada através do cálculo do mínimo de energia livre, bem

como a quantidade de nucleotídeos A:U ao redor do sítio de ligação (Eddy, 2004; Grimson et al., 2007).

Sabe-se que sítios múltiplos de alvejamento em um único mRNA podem ter efeito sinérgico, uma vez que a ligação de diversos complexos RISC em regiões próximas pode contribuir para uma estabilização entre eles (Doench et al., 2003). Assim, algoritmos que consideram a presença de vários sítios de predição em um mRNA alvo podem aumentar a probabilidade de predizer interações verdadeiras.

Adicionalmente, sabe-se que miRNAs estão expressos diferencialmente entre os diversos tecidos de um organismo (Lu et al., 2005), e que um miRNA pode possuir diversos alvos (Doench et al., 2004). Sendo assim, a observação consistente de correlação inversa entre a expressão de um miRNA e de seus alvos preditos nos diferentes tecidos é uma evidência de possível regulação destes mRNAs pelos miRNAs estudados. Desta forma, sites de predição também podem valer-se deste tipo de informação para enriquecimento de predições que possam ser validadas experimentalmente (Rajewsky, 2006; Lim et al., 2005).

Uma compilação dos critérios utilizados por 5 dos principais algoritmos utilizados para predição de alvos está descrito na tabela X.

Ferramenta	Pareamento na semente	Posição do sítio no alvo	Conservação	Acessibilidade do MRE
Mirnaviewer (Miranda)	Rigorous	Não considerada	Com filtro de conservação	Energia livre mínima é considerada
Microna-org (Miranda)	Rigorous	Não considerada	Com filtro de conservação	Energia livre mínima é considerada
MirGen (Diana-MicroT)	Rigorous	Não considerada	Com filtro de conservação	Energia livre mínima é considerada
Pictar	Rigorous	Não considerada	Com filtro de conservação	Energia livre mínima é considerada
TargetScan	Moderadamente rigoroso	Considerada	Possui as duas opções de pesquisa (com e sem)	Região circundante rica em A:U é considerada

Múltiplos sítios	Painel de expressão	Espécies disponíveis	Ferramenta online	Próprio miRNA	Próprio mRNA	Software disponível
Número de sítios putativos é considerado	Não usado	Humanos, <i>Drosophila</i> , <i>Zebrafish</i>	Sim	Não	Não	Sim
Número de sítios putativos é considerado	Não usado	Humanos, camundongos, ratos	Sim	Não	Não	Sim
Não é considerado	Não usado	Humanos, camundongos, ratos	Sim	Sim	Sim	Não
Sítios múltiplos são considerados	Não usado	vertebrados, camundongo, moscas, vermes	Sim	Não	Não	Não
Número de sítios putativos é considerado	Não usado	23 vertebrados, moscas, vermes	Sim	Sim	Sim	Sim

Endereço	Referências
http://cbio.mskcc.org/mirnaviewer/	John et al., 2004; Enright et al., 2003 ; Chen et al., 2005
http://www.microna.org/microna/getGeneForm.do	Betel et al., 2008
http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi	Kiriakidou et al., 2004
http://pictar.mdc-berlin.de/	Krek et al., 2005; Grun et al., 2005; Lall et al., 2006; Chen & Rajewsky, 2006
http://www.targetscan.org/	Lewis et al., 2005; Grimson et al., 2007; Friedman et al., 2009

Tabela 1. Critérios utilizados por 5 diferentes programas de predição: Mirnaviewer, MicroRNA.org, MirGen, Pictar e TargetScan, nesta ordem. MRE: Elemento de reconhecimento do miRNA (*MiRNA Recognition Element*). Próprio miRNA indica se algoritmo aceita introdução de sequências próprias de miRNA, bem como próprio mRNA indica se algoritmo aceita a introdução de sequências próprias de mRNA. Para maiores explicações, consultar texto. (modificado de Saito e Saetrom, 2010)

Após a seleção de possíveis mRNAs alvos para um miRNA através de programas de predição, estas interações precisam ser validadas experimentalmente. Diversos métodos experimentais que fornecem evidências destas interações podem ser aplicados neste sentido, como por exemplo verificação de expressão global de mRNAs através de *microarrays*, ou de suas proteínas resultantes, através de análises proteômicas, após a introdução ou diminuição da expressão de um miRNA específico, onde espera-se uma correlação inversa entre a expressão do miRNA e de seus RNAs alvos; imunoprecipitação de proteínas do complexo RISC e verificação de associações miRNA-mRNA nele contidos; entre outras, conforme esquematizado na Figura X (revisto em Jin et al., 2010; Thomas et al., 2010; van Rooij, 2011).

Figura 1. Técnicas para auxiliar na identificação de alvos de miRNAs. (1) Análise da expressão de mRNAs após superexpressão ou diminuição de expressão de miRNA candidato, bem como comparação entre linhagens com diferentes expressões do miRNA ou mRNA alvejado. (2) Imunoprecipitação do complexo RISC e análise dos mRNAs associados. (3) Purificação por afinidade de microRNAs marcados e análise de mRNAs associados por microarray. (4) Análise de diferenças na associação de transcritos a polissomos, após superexpressão ou diminuição de expressão de

miRNA candidato, bem como comparação entre linhagens com diferentes expressões do miRNA ou mRNA alvejado. (5) Análise da expressão proteica após superexpressão ou diminuição de expressão de miRNA candidato, bem como comparação entre linhagens com diferentes expressões do miRNA ou mRNA alvejado (adaptado de Orom & Lund, 2010).

As técnicas descritas anteriormente fornecem evidências de alvejamento, porém para validação direta de inibição de expressão de mRNA por um miRNA específico é necessária a realização de um ensaio baseado em gene reporter. Neste caso, a região 3' UTR do mRNA de interesse é clonado à jusante da região codificante do gene reporter, usualmente a Luciferase. O plasmídeo gerado é então introduzido em uma linhagem, bem como o miRNA de interesse, e a expressão do gene reporter é então verificada através de quantificação da luminescência. Caso a interação predita seja verdadeira, uma diminuição significativa da luminescência é esperada. Assim, na presença do miRNA candidato, a expressão do gene reporter é inibida, e na ausência do miRNA candidato, através de sua inibição, o gene reporter é expresso (revisto em Nicolas, 2011; van Rooij, 2011).

Levando-se em consideração que um mesmo miRNA pode regular a expressão de diversos genes de uma mesma via (Yuan et al., 2009), da importância da correta expressão de proteínas que participam das modificações epigenéticas para o desenvolvimento (conforme será visto no capítulo 2), e do papel de sua desregulação na tumorigênese e manutenção tumoral (conforme será visto nos capítulos 3 e 4), o objetivo deste trabalho foi de selecionar, através dos 5 sites de predição descritos anteriormente, potenciais miRNAs envolvidos na regulação da expressão de ambos os RNAs mensageiros de *DNMT3B/Dnmt3b* e *MECP2/Mecp2*, tanto em camundongos quanto em humanos.

4.2.1. Seleção *in silico* de miRNAs candidatos

Para a seleção *in silico* de miRNAs candidatos para o alvejamento dos mRNAs de *DNMT3B/Dnmt3b* e *MECP2/Mecp2*, tanto em *Homo sapiens* quanto em *Mus musculus*, 5 diferentes sites de predição foram consultados: Microna.org (<http://www.microna.org/microna/home.do>); Mirnaviewer (<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>); Targetscan 4.2 (<http://www.targetscan.org/>); Pictar (<http://pictar.org/>); e MirGen (DIANA MicroT) (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Targets.cgi>). Para detalhes dos algoritmos utilizados em cada um dos programas, veja tabela 1.

4.3 – Resultados e Discussão

Primeiramente, foi realizada uma compilação de todos os miRNAs preditos para o alvejamento do mRNA do gene *DNMT3B/Dnmt3b* em humanos e camundongos nos 5 sites de predição descritos na tabela 2.

Tabela 2. MiRNAs preditos de alvejar DNMT3B/Dnmt3b em humanos e camundongos por 5 diferentes sites de predição. Em destaque, miRNAs preditos por mais de um programa.

Microna.org (Miranda)		Mirnaviewer (Miranda)		Targetscan.org		Pictar		Mirgen (Diana-MicroT)	
<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	Vertebrados	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>
9		22 24							
						26a 26b 29a	26a 26b 29a	26a 26b 29a	
29b		29b		29b	29b	29b	29b	29b	
		29c		29c	29c	29c	29c	29c	
30c									
103									
107									
125b-3p								129-3p	
129-5p								129-5p	
140									
142-3p								141	
186									
						188	188	188	188
								200a	
203				203	203	203	203	203	
216a									
								221 222	
291b-3p									
326		326							326
		328							
330-5p	330								
		337							
365									365
367									

Tabela 2. Continuação.

374				370
379				379
				429
				450
450B				450b
451				451
452				
488				
				491
				500
509-5p				
				519e*
				543
582-3p				
				598
				618
				635
654-5p				
				665
680				
742				
743b-3p				
875-3p				

Dos 55 miRNAs preditos pelos 5 programas, 14 foram selecionados por estarem presentes nas predições de 2 ou mais programas, sendo estes: miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-129-5p, miR188, miR-203, miR-326, miR-337, miR-365, miR-379, miR-450b e miR-451.

A seguir, foi verificado se estes miRNAs selecionados preditos de alvejarem *DNMT3b/Dnmt3b* eram também preditos de alvejarem *MECP2/Mecp2* (Tabela 3). Com exceção de miR-188 e miR-451, preditos por somente um programa, e de miR-337 e miR-365, que não foram preditos por nenhum programa, todos os outros miRNAs antes

preditos por mais de um programa de alvejarem *DNMT3B/Dnmt3b*, também foram preditos de alvejarem *MECP2/Mecp2* por mais de um programa, evidenciando, assim, que estes miRNAs podem ter função na regulação de ambos os genes da mesma via.

Tabela 3. MiRNAs preditos de alvejarem DNMT3B/Dnmt3b e MECP2/Mecp2. Em destaque, miRNAs selecionados para estudo.

Microna.org (Miranda)		Mirnaviewer (Miranda)	Targetscan.org		Pictar		Mirgen (Diana-MicroT)	
<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	Vertebrados	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>
26a e 26b	26a e 26b	29a	26	26	26b e 26a	26a e 26b	26a e 26b	
	29a						29b	
	29b						29c	
	29c						129 e 5p	
129-5p	129-5p							
188-5p e 3p	188-3p							
203	203		203.1	203.1	203	203	203	
326		326					326	
379		379						
450b-3p e 5p	450b-5p e 3p						450	450 e 450b
	451							

A partir desta segunda tabela, foram então selecionados 6 miRNAs com maior probabilidade de alvejarem ambos os genes, os quais são: miR-26a, miR-26b, mi29a, miR-29b, miR-29c e miR-203. As interações entre os mRNAs e miRNAs preditos podem ser observados na figura 2.

Com base na tabela 2, observa-se que os miRNAs da família miR-29 são os miRNAs que têm maior potencial de alvejarem o gene DNMT3B, em especial miR-29c, o qual é predito por todos os sites consultados. De fato, Fabbri e colegas (2007) observaram que os miRNAs desta família regulam a expressão dos genes DNMT3B e DNMT3A em células não pequenas oriundas de câncer de pulmão, através de sua expressão ectópica. Neste estudo, foi observada a correlação inversa da expressão dos miRNAs da família e dos genes

DNMT3A e DNMT3B em tecidos de câncer de pulmão. Adicionalmente, a reexpressão deste miRNAs foi capaz de inibir a expressão das DNA metiltransferases *de novo*, tendo como consequência a redução dos níveis de metilação global e reexpressão de genes supressores tumorais antes epigeneticamente silenciados. Além disso, a expressão ectópica de membros da família miR-29 foi capaz de inibir o crescimento celular e induzir apoptose *in vitro*, bem como de reduzir o crescimento tumoral *in vivo*.

Esta interação entre miRNAs da família miR-29 X DNA metiltransferases foi também validada em células de leucemia mielóide aguda (AML) por Garzon et al. (2009). Os autores observaram que, além da família miR-29 de miRNAs regularem a metilação global através do silenciamento direto das DNA metiltransferases de novo DNMT3A e DNMT3B, estes miRNAs regulam indiretamente a expressão da DNA metiltransferase de manutenção DNMT1, através da inibição de seu fator de transcrição, SP1. Assim, a reexpressão destes miRNAs em células tumorais onde antes encontravam-se pouco expressos têm importante papel na diminuição da metilação global e, portanto, atuam como supressores tumorais (Garzon et al., 2009). Desta forma, a predição desta família de miRNAs pela maioria dos sites de predição estudados demonstra que o método utilizado no presente trabalho para seleção *in silico* de potenciais miRNAs que regulam DNMT3B é válido, uma vez que algumas destas interações preditadas já foram validadas como verdadeiras.

Os únicos miRNAs já validados que alvejam DNMT3B são os pertencentes à família miR-29, como já visto acima, e o miR-148. Este último, por sua vez, constitui uma exceção, uma vez que alveja a região codificante do mRNA de DNMT3B, o que ocorre mais comumente em plantas. Este miRNA alveja uma região que sofre *splicing* alternativo e

que está presente em apenas algumas isoformas, revelando assim uma regulação específica de variantes de *splicing*. Como pode ser observado na tabela X, este miRNA não é predito de alvejar DNMT3B por nenhum dos sítios de predição. Isto deve-se ao fato de que poucos programas de predição são capazes de reconhecer sítios de ligação inseridos na região codificante.

Tabela 4. Informações sobre os 6 miRNAs maduros selecionados para estudo, tanto em humanos (acima) quanto em camundongos (abaixo). Dados obtidos através de consulta no banco de dados MiRBase (<http://www.mirbase.org>).

MicroRNA	Número de acesso pre-miR	ID pre-miR	Localização no genoma	Sentido	Organizado em cluster?	Posição no genoma	Número de acesso miR maduro	Sequência miR maduro
hsa-miR-26a	MI0000083	hsa-mir-26a-1	Cr. 3	+	Não	Intragênico	MIMAT0000082	5' - uucaaguaauccaggauaggu - 3'
	MI0000750	hsa-mir-26b-2	Cr. 12	-	Não	Intragênico		5' - uucaaguaauccaggauaggu - 3'
hsa-miR-26b	MI0000084	hsa-mir-26b	Cr. 2	+	Não	Intragênico	MIMAT0000083	5' - uucaaguaauccaggauaggu - 3'
hsa-miR-29a	MI0000087	hsa-mir-29a	Cr. 7	-	hsa-mir-29a e hsa-mir-29b-1	Intragênico	MIMAT0000086	5' - uagcaccuugaaaucgguu - 3'
hsa-miR-29b	MI0000105	hsa-mir-29b-1	Cr. 7	-	hsa-mir-29a e hsa-mir-29b-1	Intragênico	MIMAT0000100	5' - uagcaccuugaaaucagugu - 3'
	MI0000107	hsa-mir-29b-2	Cr. 1	-	hsa-mir-29b-2 e hsa-mir-29c	Intergênico		5' - uagcaccuugaaaucgguu - 3'
hsa-miR-29c	MI0000735	hsa-mir-29c	Cr. 1	-	hsa-mir-29b-2 e hsa-mir-29c	Intergênico	MIMAT0000681	5' - uagcaccuugaaaucgguu - 3'
hsa-miR-203	MI0000283	hsa-mir-203	Cr. 14	+	hsa-mir-203 e hsa-mir-3545	Intergênico	MIMAT0000264	5' - gugaaauguuuaggaccacuag - 3'

MicroRNA	Número de acesso pre-miR	ID pre-miR	Localização no genoma	Sentido	Organizado em cluster?	Posição no genoma	Número de acesso miR maduro	Sequência miR maduro
mmu-miR-26a	MI0000573	mmu-mir-26a-1	Cr. 9	+	Não	Intragênico	MIMAT0000533	5' - uucaaguaauccaggauaggu - 3'
	MI0000706	mmu-mir-26a-2	Cr. 10	+	mmu-mir-26a-2 e mmu-mir-546	Intragênico		5' - uucaaguaauccaggauaggu - 3'
mmu-miR-26b	MI0000575	mmu-mir-26b	Cr. 1	+	Não	Intragênico	MIMAT0000534	5' - uucaaguaauccaggauaggu - 3'
mmu-miR-29a	MI0000576	mmu-mir-29a	Cr. 6	-	mmu-mir-29a e mmu-mir-29b-1	Intergênico	MIMAT0000535	5' - uagcaccuugaaaucgguu - 3'
mmu-miR-29b	MI0000143	mmu-mir-29b-1	Cr. 6	-	mmu-mir-29a e mmu-mir-29b-1	Intergênico	MIMAT0000127	5' - uagcaccuugaaaucaguguu - 3'
	MI0000712	mmu-mir-29b-2	Cr. 1	+	mmu-mir-29b-2 e mmu-mir-29c	Intragênico		5' - uagcaccuugaaaucgguu - 3'
mmu-miR-29c	MI0000577	mmu-mir-29c	Cr. 1	+	mmu-mir-29b-2 e mmu-mir-29c	Intragênico	MIMAT0000536	5' - uagcaccuugaaaucgguu - 3'
mmu-miR-203	MI0000246	mmu-mir-203	Cr. 12	+	Não	Intergênico	MIMAT0000236	5' - gugaaauguuuaggaccacuag - 3'

<p>3' ucggauaggaccuaaUGAACUu 5' hsa-miR-26a </p> <p>250:5' uccuaaaacuuuaaACUUGAa 3' DNMT3B</p>	<p>3' ucGGAUAGGACCUA-AUGAACUu 5' hsa-miR-26a : : </p> <p>3287:5' uuUCAUUUUUGUCUGUACUUGAa 3' MECP2</p>
<p>3' uggauaggacuuaaUGAACUu 5' hsa-miR-26b </p> <p>251:5' ccuaaaacuuuaaACUUGAa 3' DNMT3B</p>	<p>3' ucggauaGGACCUAUGAACUu 5' hsa-miR-26a : </p> <p>6750:5' caaaaggCUUGCAGAACUUGAa 3' MECP2</p>
<p>3' auuggcuaaagucuaCCACGAu 5' hsa-miR-29a </p> <p>217:5' ggagcagccuaacacGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' auuggcuaaagucuaCCACGAu 5' hsa-miR-29a </p> <p>1054:5' aaaacugcaagcucGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' auUGGCUAAAGUCUACCACGAu 5' hsa-miR-29a : : </p> <p>1189:5' uuACUCUUCUUA-CUGGUGCua 3' DNMT3B</p>	<p>3' ugGAUAGGACUUA-AUGAACUu 5' hsa-miR-26b : </p> <p>3288:5' uuCAAUUUUUGUCUGUACUUGAa 3' MECP2</p> <p>3' uggauaGGACUUAUGAACUu 5' hsa-miR-26b : </p> <p>6751:5' aaaaggCUUGCAGAACUUGAa 3' MECP2</p>
<p>3' uugugacuaaaguuuaCCACGAu 5' hsa-miR-29b </p> <p>216:5' uggagcagccuaacacGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' uugugacuaaaguuuaCCACGAu 5' hsa-miR-29b </p> <p>1053:5' gaaaacugcaagcucGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' uuUGGACUAAAGUUUACCACGAu 5' hsa-miR-29b : : </p> <p>1188:5' uuUACU-CUUCUACUGGUGCua 3' DNMT3B</p>	<p>3' gaucaccAGGAUUUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 :: : </p> <p>1230:5' uucugccUUUUGUUAUUUCAu 3' MECP2</p> <p>3' gaucaccagGAUUUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 </p> <p>1870:5' gccagaacaCCACAUUUUCac 3' MECP2</p> <p>3' gauCACCAGGAUUUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 : : : </p> <p>2195:5' uguGUUGUCUUGUGUAUUUCag 3' MECP2</p>
<p>3' auuggcuaaaguuuaCCACGAu 5' hsa-miR-29c </p> <p>217:5' ggagcagccuaacacGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' auuggcuaaaguuuaCCACGAu 5' hsa-miR-29c </p> <p>1054:5' aaaacugcaagcucGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' auuggcuAAAGUUUACCACGAu 5' hsa-miR-29c : </p> <p>1188:5' uuuacucUUCUACUGGUGCua 3' DNMT3B</p>	<p>3' gaucaCCAGGAUUUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 : </p> <p>2915:5' gguugGGAACACAGCAUUUCAa 3' MECP2</p> <p>3' gaucaccaggauuuUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 : </p> <p>2932:5' uucaagcgucacuuUAUUUCAu 3' MECP2</p>
<p>3' auuggcuaaaguuuaCCACGAu 5' hsa-miR-29c </p> <p>1054:5' aaaacugcaagcucGGUGCuc 3' DNMT3B</p> <p>3' auuggcuAAAGUUUACCACGAu 5' hsa-miR-29c : </p> <p>1188:5' uuuacucUUCUACUGGUGCua 3' DNMT3B</p>	<p>3' gaucaccaggauuugUAAAGUg 5' hsa-miR-203 </p> <p>622:5' uccacaugaugaugAUUUCag 3' DNMT3B</p> <p>3' gaucaccaggauuUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 : </p> <p>1137:5' auucagacaagcuGCAUUUCag 3' DNMT3B</p>
	<p>3' gaucaccaggauuugUAAAGUg 5' hsa-miR-203 </p> <p>3271:5' uggggugugaccucaAUUUCaa 3' MECP2</p> <p>3' gaucaccAGGAUUUGUAAAGUg 5' hsa-miR-203 : </p> <p>8433:5' aaggaaaUUUGUACCAUUUCag 3' MECP2</p>

Figura 2. Interações preditas entre miRNAs selecionados e mRNAs de *DNMT3B* (à esquerda) e *MECP2* (à direita) em *Homo sapiens*. Resultado obtido a partir de consulta ao banco de dados Microna.org (<http://www.microna.org>).

<p>3' ucggauaggaccuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26a </p> <p>247:5' ccugaaacuuuaaaACUUGAa 3' Dnmt3b</p> <p>3' ucggauaggaccuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26a </p> <p>404:5' ucaugcugcaaaacACUUGAg 3' Dnmt3b</p>	<p>3' ucggauaggaccuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26a </p> <p>1848:5' uggugaauuuuauagACUUGAc 3' Mecp2</p> <p>3' ucgGAUAGGACCUAUGAACUu 5' mmu-miR-26a </p> <p>4347:5' augCUAAAGGGGAAAACUUGAa 3' Mecp2</p>
<p>3' uggauaggacuuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26b </p> <p>248:5' ccugaaacuuuaaaACUUGAa 3' Dnmt3b</p> <p>3' uggauaggac---UUAAUGAACUu 5' mmu-miR-26b </p> <p>402:5' guucAUGCUGCAAAACACUUGAg 3' Dnmt3b</p>	<p>3' ucggauaggaccuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26a </p> <p>6830:5' caaaaggcuuacagaACUUGAa 3' Mecp2</p>
<p>3' auuggcuaaagucuaCCACGAu 5' mmu-miR-29a </p> <p>160:5' uugcaggggagccccGGUGCUc 3' Dnmt3b</p> <p>3' auuggcuaaaGUC-UACCACGAu 5' mmu-miR-29a : </p> <p>213:5' uagaguagccCGGCAUGGUGCUc 3' Dnmt3b</p> <p>3' auugGCUAAAGUCUACCACGAu 5' mmu-miR-29a : : : </p> <p>991:5' auugUGUUUUUAAGGGGUGCUu 3' Dnmt3b</p> <p>3' auuggcuaaagucuaCCACGAu 5' mmu-miR-29a </p> <p>1083:5' uuuuaccuaauuacaGGUGCUa 3' Dnmt3b</p>	<p>3' uggauaggacuuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26b </p> <p>4348:5' ugcuaaaggggaaaACUUGAa 3' Mecp2</p> <p>3' uggauaggacuuaaUGAACUu 5' mmu-miR-26b </p> <p>6831:5' aaaaggcuuacagaACUUGAa 3' Mecp2</p> <p>3' auUGGCUAAAGUCUACCACGAu 5' mmu-miR-29a : : </p> <p>3454:5' caGCUCCUUUCUGCUGGUGCUg 3' Mecp2</p> <p>3' uugUGACUAAAGUUUACCACGAu 5' mmu-miR-29b : : </p> <p>3453:5' acaGCUCCUUUCUGCUGGUGCUg 3' Mecp2</p> <p>3' auUGGCUAAAGUUUACCACGAu 5' mmu-miR-29c : : : </p> <p>3454:5' caGCUCCUUUCUGCUGGUGCUg 3' Mecp2</p>
<p>3' uugugacuaaaguuuaCCACGAu 5' mmu-miR-29b </p> <p>159:5' cuugcaggggagccccGGUGCUc 3' Dnmt3b</p> <p>3' uugugacuaaaguuUACCACGAu 5' mmu-miR-29b </p> <p>213:5' uagaguagcccggaUGGUGCUc 3' Dnmt3b</p> <p>3' uugugACUAAAGUUUACCACGAu 5' mmu-miR-29b : : </p> <p>990:5' gauugUGUUUUUAAGGGGUGCUu 3' Dnmt3b</p> <p>3' uugugacuaaaguuuaCCACGAu 5' mmu-miR-29b </p> <p>1082:5' cuuuuaccuaauuacaGGUGCUa 3' Dnmt3b</p>	<p>3' gaucaccAGGAUUUGUAAAGUg 5' mmu-miR-203 </p> <p>1198:5' ucuuccuUCCU-UCCAUUUCAu 3' Mecp2</p> <p>3' gaucaccaggauuUGUAAAGUg 5' mmu-miR-203 : </p> <p>1806:5' aucagcacaucccAUUUUCAa 3' Mecp2</p> <p>3' gaucaccaggauuugUAAAGUg 5' mmu-miR-203 </p> <p>2867:5' cuguanguagaacugAUUUUCAa 3' Mecp2</p> <p>3' gaucaccaggauuugUAAAGUg 5' mmu-miR-203 </p> <p>3830:5' gaugagaccagccugAUUUUCAu 3' Mecp2</p> <p>3' gaucaccaGGAUUUGUAAAGUg 5' mmu-miR-203 : : : </p> <p>5492:5' uauauauaUCUGUAUUUUCa 3' Mecp2</p> <p>3' gaucaccaggauuugUAAAGUg 5' mmu-miR-203 </p> <p>5821:5' gguacaggacaguuCAUUUCAg 3' Mecp2</p> <p>3' gaucaccAGGAUUUGUAAAGUg 5' mmu-miR-203 : </p> <p>8470:5' aaggaaaUUUGUACCAUUUCAg 3' Mecp2</p>
<p>3' auuggcuaaaguuuaCCACGAu 5' mmu-miR-29c </p> <p>160:5' uugcaggggagccccGGUGCUc 3' Dnmt3b</p> <p>3' auuggcuaaaguuUACCACGAu 5' mmu-miR-29c </p> <p>214:5' agaguagcccggaUGGUGCUc 3' Dnmt3b</p> <p>3' auugGCUAAAGUUUACCACGAu 5' mmu-miR-29c : : : </p> <p>991:5' auugUGUUUUUAAGGGGUGCUu 3' Dnmt3b</p> <p>3' auUGGCUAAAGUUUACCACGAu 5' mmu-miR-29c </p> <p>1085:5' uuACCUAUU--ACAGGUGCUa 3' Dnmt3b</p>	
<p>3' gaucaccaggauuUGUAAAGUg 5' mmu-miR-203 : </p> <p>1032:5' agauaagaaagcuGCAUUUCAg 3' Dnmt3b</p>	

Figura 3. Interações preditas entre miRNAs selecionados e mRNAs de *Dnmt3b* (à esquerda) e *Mecp2* (à direita) em *Mus musculus*. Resultado obtido a partir de consulta ao banco de dados Microna.org (<http://www.microna.org>).

Apesar de os miRNAs da família 29 terem sido validados como reguladores de DNMT3B, sabe-se que um mesmo mRNA pode ser alvejado por diversos miRNAs, potencializando-se assim a inibição do mRNA alvo. Desta forma, é de extrema importância a validação de outros miRNAs que regulem DNMT3B, bem como outros genes da maquinaria epigenética, como MECP2. O miR-203 foi predito por diversos sites de predição (tabela 3), tornando-se assim um potencial regulador da expressão dos genes da maquinaria epigenética estudados.

De acordo com o observado, é possível concluir que:

- De acordo com a predição através de 5 diferentes sites, os miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 são fortes candidatos à miRNAs reguladores da expressão de dois genes pertencentes à maquinaria epigenética: DNMT3B e MECP2, tanto em humanos quanto em camundongos.
- Uma vez que os miRNAs da família miR-29 já foram validados como reguladores de DNMT3B em células de câncer de pulmão e leucemia humanos, e em células germinativas primordiais de camundongos, a predição destes miRNAs indica que as ferramentas utilizadas para predição são válidas, e que novos estudos com os outros miRNAs devem ser realizados, a fim de validá-los.

5. Capítulo 2 - Correlação da expressão entre
microRNAs e seus possíveis alvos *DNMT3B/Dnmt3b* e
MECP2/Mecp2 em células-tronco embrionárias humanas
e murinas, antes e após a diferenciação

5.1. Introdução

Células tronco embrionárias (ESCs – *Embryonic Stem Cells*) são células pluripotentes extraídas do massa celular interna do blastocisto, sendo capazes de originar todos os tipos de células de um determinado organismo, com exceção da placenta e anexos embrionários, diferentemente das células tronco adultas, as quais são multipotentes, diferenciando-se em apenas um número restrito de tipos celulares (revisto em Leeb et al., 2011).

Ambos os tipos de células-tronco, devido às suas propriedades de auto-renovação e capacidade de se diferenciarem em diversos tecidos, têm ganhado crescente atenção da comunidade científica devido ao seu potencial uso terapêutico no tratamento de diversas doenças. De fato, as células tronco adultas tem sido utilizadas com sucesso no tratamento de diversas doenças (revisto em Leeb et al., 2009), por serem mais seguras e eticamente aceitáveis que as células tronco embrionárias, embora possuem capacidade de diferenciar em uma menor variedade de células. Entre as células tronco adultas, destacam-se as células tronco hematopoiéticas, localizadas em tecidos como medula óssea e cordão umbilical, e que podem se diferenciar em diversas linhagens de células hematopoiéticas; as células tronco mesenquimais também tem sido alvo de diversos estudos, devido ao fato de serem capazes de se diferenciar em diversas linhagens mesodermas. Por outro lado, ESC podem se diferenciar em uma maior variedade de tipos celulares em relação às células tronco adultas, porém sua utilização pode apresentar também inúmeras desvantagens, como as implicações éticas do uso de embriões humanos, maior risco de formação de câncer devido à sua alta capacidade proliferativa, e menor chance de compatibilidade

imunológica, ao serem introduzidas em um paciente heterólogo (revisto em Leeb et al., 2011).

Porém, além de apresentarem um importante potencial terapêutico, também podem representar importantes modelos de estudo na pesquisa básica elucidando vias que ocorrem no início do desenvolvimento embrionário. A primeira linhagem murina de ESC (mESC) foi obtida em 1981 (Evans e Kaufman, 1981), o mesmo tendo ocorrido para ESC humanas (hESC) quase duas décadas depois (Thomson et al., 1998). No Brasil, a primeira linhagem de hESC foi recentemente obtida (Fraga et al., 2010), o que possibilitou um maior acesso a esse modelo biológico a ser empregado na pesquisa básica no país.

Apesar de questões acerca da segurança da utilização de células tronco embrionárias na terapia permanecerem controversas, o primeiro ensaio clínico utilizando células tronco embrionárias no tratamento de injúrias na medula espinhal obteve permissão em 2009, sendo que o tratamento do primeiro paciente iniciou-se em 2011, seguido por outro estudo que obteve recentemente permissão para utilização de células tronco embrionárias no tratamento de degeneração macular.

Uma forma de sobrepujar a incompatibilidade imunológica das células tronco embrionárias no tratamento de diversas doenças, seria através da reprogramação de células adultas do paciente a um estado pluripotente, gerando células pluripotentes induzidas (iPSCs – *Induced Pluripotent Stem Cells*), através da adição de fatores de transcrição específicos de células tronco. As primeiras células iPS foram obtidas em camundongos através da reprogramação de fibroblastos embrionários murinos (MEFs), resultado da transdução das células com 4 fatores de transcrição específicos de células-tronco e envolvidos com a manutenção de sua pluripotencialidade, *Oct3/4*, *Sox3*, *Klf4* e *c-Myc*, conhecidos coletivamente pelas suas iniciais OSKM (Takahashi e Yamanaka, 2006).

A seguir, com a utilização dos mesmos fatores OSKM, foi possível a reprogramação de fibroblastos adultos da derme humanos, gerando células capazes de se diferenciarem nas 3 camadas germinativas (Takashi et al, 2007). Em estudos posteriores, foi observado que, apesar do proto-oncogene *C-myc* em células murinas ter papel importante na auto-renovação de células tronco, em células humanas sua ativação leva à indução da apoptose e diferenciação das células tronco (Sumi et al., 2007). Assim, uma nova combinação de fatores de transcrição poderia ser capaz de otimizar a reprogramação de células adultas somáticas humanas, o que foi obtido através da introdução dos fatores *OCT4*, *SOX2*, *LIN28* e *NANOG* (OSNL) (Yu et al., 2007). Por outro lado, a utilização dos fatores de transcrição *Oct3/4*, *Sox* e *Klf4*, sem introdução de *C-myc* (OSK), também mostrou-se efetiva na reprogramação de células adultas murinas e humanas (Nakagawa et al., 2008 e Wernig et al., 2008).

Apesar de a utilização de células iPS superar os problemas éticos da utilização de células tronco embrionárias em humanos e a incompatibilidade imunológica de sua utilização, uma vez que células do próprio paciente poderiam ser reprogramadas e utilizadas no tratamento de doenças, tal método seria extremamente dispendioso e caro, sendo portanto atualmente inviável na terapia. Adicionalmente, a baixa eficiência de reprogramação e a utilização de vetores retrovirais ainda representam obstáculos a serem superados para a utilização destas células em terapia. Estudos utilizando métodos não integrativos já foram realizados, obtendo porém uma baixa eficiência (Okita et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008; Kim et al., 2009; Woltjen et al., 2009; Zhou et al., 2009). Além disso, apesar de células iPS serem capazes de diferenciarem-se em células das três camadas germinativas, exibindo transcriptoma e morfologia semelhantes às células tronco embrionárias,

os mecanismos moleculares envolvidos na reprogramação ainda permanecem pouco conhecidos (revisto em Yoshida e Yamanaka, 2010). De fato, estudos recentes têm demonstrado um maior número de alterações genéticas e epigenéticas em células iPS em relação às células tronco embrionárias ou aos fibroblastos dos quais se originaram, incluindo variações no número de cópias (Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011), mutações pontuais (Gore et al., 2011), reprogramação epigenética incompleta (Lister et al., 2011) e aneuploidia (Mayshar et al., 2010). Desta forma, as bases moleculares e o fenótipo de células somáticas submetidas à reprogramação devem ser melhor estudados, objetivando a maior segurança de sua utilização.

5.1.1. Modificações Epigenéticas Durante a Embriogênese

As marcas epigenéticas sofrem extensivas modificações durante a gametogênese e o início do desenvolvimento embrionário, sendo essencial para a correta reprogramação celular e para o estabelecimento do silenciamento parental específico, o *imprinting* genômico.

Durante a gametogênese, ocorre a desmetilação global do DNA de células germinativas primordiais (PGCs – *primordial germ cells*), seguida de nova metilação, sendo tal processo essencial no estabelecimento do padrão parental-específico de genes que sofrem *imprinting* (Figura 1b) (Chaillet et al., 1991), o que promoverá uma expressão diferencial dos alelos paternos e maternos no futuro embrião (Hata et al., 2002). Adicionalmente, em PGCs masculinos, as histonas são substituídas por protaminas (Kimmins e Sassone-Corsi, 2005). O mesmo processo de desmetilação, seguida de metilação do DNA, também ocorre durante o desenvolvimento embrionário. Após a fertilização do oócito, são formados os pró-núcleos masculino e

feminino, e então ocorre a substituição das protaminas do pró-núcleo masculino por histonas acetiladas, além de uma extensiva desmetilação ativa do DNA presente no mesmo (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000), seguida por uma desmetilação passiva do pró-núcleo feminino (revisto em Shi e Wu, 2009). Logo após a fertilização do oócito até o período pré-implantacional ocorre uma onda, que promove uma desmetilação global do DNA, onde apenas as regiões que sofrem *imprinting* são mantidas. Após a implantação, o embrião passa por uma onda de metilação *de novo*, estabelecendo um novo padrão (Monk et al., 1987; Kafri et al., 1992).

Figura 1. Dinâmica das modificações epigenéticas durante a embriogênese. (a) Ondas de desmetilação durante a embriogênese e em células primordiais germinativas (PGCs). ICM: Massa celular interna. TE: Trofoectoderma.

Modificada de Feng et al., 2010. (b) Reprogramação das modificações das histonas, da fertilização à singamia. Modificada de Shi e Wu, 2009.

Estas ondas de desmetilação são acompanhadas por uma diminuição da expressão de Dnmt3b. Inversamente, quando o novo padrão de metilação está sendo estabelecido, há um concomitante aumento da expressão de Dnmt3b (Figura 1a) (revisto em Dean et al., 2005). Isto está de acordo com sua função, já que Dnmt3b é uma metiltransferase envolvida com a metilação *de novo*, como descrito anteriormente. De forma análoga, o complexo proteico MeCP2/Sin3A não foi detectado em embriões pré-implantação (Kantor et al., 2003).

Figura 2. Expressão das DNA metiltransferases ao longo da embriogênese. Modificado de Dean et al. (2005).

Concomitante com as duas ondas de desmetilação e metilação do DNA, o padrão das modificações pós-traducionais encontradas nas histonas também sofrem mudanças. Como já visto anteriormente, após a fecundação, as protaminas do pró-núcleo paterno são substituídas por histonas altamente acetiladas (Adenot et al., 1997), sendo os grupos acetil rapidamente substituídos por grupos monometil (Lepikhov e Walter, 2004), surgindo depois então finalmente histonas di e trimetiladas

(Santos et al., 2005). No pró-núcleo feminino, por outro lado, histonas acetiladas (H4ac), monometiladas na lisina 4 (H3K4me1) e 27 (H3K27me1), di ou tri metiladas na lisina 9 (H3K9me2/me3) e trimetiladas na lisina 20 (H3K20me3) são marcas comumente encontradas (Adenot et al., 1997; Kourmouli et al., 2004; Santos et al., 2005). Além disto, durante onda de metilação do embrião pós implantação, ocorre a metilação das regiões satélites pericentroméricas, sendo este processo mediado pelas enzimas SUV39H, as quais são histonas metiltransferases responsáveis pela trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) (Fuks et al., 2003; Lehnertz et al., 2003).

Em geral, para a realização do estudo de diferenciação nos primeiros estágios do desenvolvimento de mamíferos, células troncos pluripotentes são diferenciadas em corpos embrióides *in vitro*, os quais mostram grande similaridade com a porção fetal do embrião, inclusive quanto à onda de desmetilação e remetilação do embrião pré-implantacional (Kremenskoy, 2003)(Fig. 3), sendo, portanto, um modelo experimental importante no estudo dos primeiros estágios da formação do embrião.

Figura 3. Mudanças no nível de metilação de ilhas CpG durante desenvolvimento normal (células ES—feto—cérebro e rim) e desenvolvimento *in vitro* (células ES—Corpo Embrióide—teratomas). O balance de metilação e desmetilação foi diferente dependendo do tipo celular e tecidos. O nível de

metilação foi menor em tecido fetal e corpo embriônico que em células ES. Figura retirada de Kremensky et al. (2003).

Apesar de ocorrer uma onda de metilação global durante a implantação do embrião, o padrão de metilação estabelecido é bimodal, sendo que a maior parte dos dinucleotídeos CpG estão metilados, exceto aqueles pertencentes às ilhas CpG presentes nas regiões promotoras de mais de metade dos genes (revisto em Cedar e Bergman, 2009). Evidências sugerem diversos mecanismos responsáveis pela proteção das ilhas CpG durante a onda de metilação, como a presença de elemento em cis capaz de desmetilar e proteger a sequência alvo da metilação *de novo* (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994; Gidekel e Bergman., 2002). O outro modelo proposto é o de que a RNA polimerase II, a qual liga-se à região promotora dos genes, seria capaz de recrutar enzimas histona metiltransferases H3K4, as quais confeririam a essas regiões promotoras a metilação destes resíduos de lisina (H3K4me), sendo esta uma marca envolvida com a ativação da expressão gênica. A ligação de DNMT3b ao DNA mediada por DNMT3L, por sua vez, seria impossibilitada devido a esta modificação das histonas (Ooi et al., 2007), o que impediria a metilação das regiões promotoras e o consequente silenciamento do gene.

Figura 4. Estabelecimento de metilação bimodal. Modificado de Cedar e Bergman (2009).

5.1.2. miRNAs no início do desenvolvimento embrionário

MicroRNAs (miRNAs) desempenham um importante papel no início do desenvolvimento embrionário, tanto na manutenção da pluripotencialidade quanto na diferenciação das células-tronco embrionárias. De fato, estudos demonstraram que mESC deficientes em Dicer, apesar de viáveis, apresentavam defeitos na diferenciação, bem como silenciamento epigenético da heterocromatina corrompido (Kanellopoulou et al., 2005). Além disso, mESC deficientes para Dgcr8 mantêm a pluripotência, apesar de expressarem alguns genes envolvidos no processo de diferenciação (Wang et al., 2008). A introdução de alguns miRNAs nas células de camundongo nocaute para Dgcr8 foi capaz de recuperar as taxas normais de proliferação, dentre eles membros dos clusters miR-290, miR-302 e miR-17-92 (Wang et al., 2008). De fato, os

membros do cluster miR-290 encontram-se altamente expressos em mESC, ocorrendo a perda de sua expressão após a diferenciação (Houbaviy et al., 2003). Em células tronco embrionárias humanas, a expressão dos clusters miR-302 e miR-371 está aumentada e sofre drástica redução após a diferenciação, sendo estes clusters análogos aos clusters miR-302 e miR-290 murinos, respectivamente (Suh et al., 2004). Tal expressão destes clusters específica de células tronco embrionárias indicariam possível papel dos mesmos na manutenção da pluriptencialidade.

Foi demonstrado que o cluster miR-302-367, em células tronco embrionárias humanas, é regulado por fatores de transcrição específicos de células tronco, como Oct3/4, Sox2 e Nanog (Barroso-delJesus et al., 2008; Card et al., 2008). Adicionalmente, a indução da expressão deste cluster em células adultas induz a saída da fase G1, tendo entre seus genes alvo, Ciclina D1 e Cdk4. Além de desempenhar importante papel na auto-renovação e proliferação celular, evidências sugerem que este cluster pode estar relacionado também na manutenção do estado indiferenciado, controlando o balanço entre especificação celular e pluripotencialidade (Barroso-DelJesus et al., 2011).

Já a expressão ectópica do cluster miR-290 em mESC deficientes em Dicer é capaz de reverter muitos dos defeitos causados por esta deficiência (Sinkkonen et al., 2008). Sua expressão foi associada ao silenciamento da expressão de uma série de inibidores de ciclo celular, incluindo Rbl2 (*Retinoblastoma-like 2 protein*) (Benetti et al., 2008; Sinkkonen et al., 2008). Rbl2 está envolvido com diversos processos celulares, como a elongação dos telômeros (Kong et al., 2006), a repressão da proliferação celular (Wang et al., 2008), bem como, a repressão de algumas isoformas de Dnmt3a e Dnmt3b, sendo, em parte, capaz de manter a pluripotencialidade através da manutenção da

expressão de genes como *Oct4* e desmetilação global do DNA (Benetti *et al.*, 2008; Sinkkonen *et al.*, 2008).

De fato, a introdução dos miRNAs miR-291-3p, miR-294 e miR-295 em conjunto com a introdução de retrovírus expressando os fatores de transcrição OSK em fibroblastos embrionários murinos foi capaz de potencializar a reprogramação destas células, sendo o miR-294 o miRNA que apresentou o maior efeito na formação das células tronco pluripotente induzidas, em níveis comparáveis à reprogramação com os fatores de transcrição OSKM. Além destes, outro miRNA com a mesma sequência semente, o miR-302d, foi também capaz de potencializar a reprogramação (Judson *et al.*, 2009).

Figura 5. Função dos miRNAs em ESCs. (a) Manutenção da pluripotencialidade através do cluster miR-302-367. Modificado de Barroso-delJesus *et al.* (2009). (b) Papel dos miRNAs miR-296, miR-22, let-7 e cluster mirR-290-295 em ESC. Modificada de Gangaraju e Lin (2009).

No entanto, é provável que o *cluster* miR-290 não seja o único regulador da maquinaria epigenética no início do desenvolvimento, desempenhando importante papel na diferenciação celular, já que os

experimentos destes trabalhos foram realizados através da super-expressão do mesmo, em células cuja maquinaria de miRNAs está totalmente comprometida. De fato, outros trabalhos recentes vêm mostrando que miRNAs podem alvejar diferentes membros envolvidos com as modificações epigenéticas (Sato *et al.*, 2011), como exemplo, a super-expressão da família miR-29 em células de tumor de pulmão, a qual foi capaz de diminuir a expressão de Dnmt3a e Dnmt3b (Fabbri *et al.*, 2007). Dentre os miRNAs da família, o miR-29b demonstrou ser bastante importante no silenciamento da expressão de DNA metiltransferases DNMT3A e 3B e, indiretamente, de DNMT1, em células de Leucemia Mielóide Aguda (AML), onde a expressão forçada deste miRNA resultou em redução acentuada da expressão destas metiltransferases, nos níveis de RNA e proteínas (Garzon *et al.*, 2009b). O mesmo foi observado em células germinativas (Takada *et al.*, 2009). Além do miR-29b, outro miRNA foi identificado para o alvejamento de Dnmt3b, o miR-148. Entretanto, este miRNA tem como alvo um éxon que sofre *splicing* alternativo, que não está presente na isoforma mais abundante de Dnmt3b (Duursma *et al.*, 2008).

Uma vez que a função da maioria dos miRNAs é pouco conhecida e que podem ter um importante impacto na manutenção da pluripotencialidade e na auto-replicação de células ES, bem como em sua diferenciação, é imprescindível que os mecanismos pelos quais estas pequenas moléculas atuam na regulação de componentes da maquinaria epigenética no início do desenvolvimento embrionário sejam elucidados. Além disso, uma vez que células ES possuem uma alta expressão de Dnmt3b, a qual é significativamente reduzida após a diferenciação (Ren *et al.*, 2009), a utilização destas células antes e após a diferenciação em corpos embrióides *in vitro*, tornando-se um poderoso modelo para o estudo da expressão dos miRNAs que potencialmente alvejam tanto

Dnmt3b quanto Mecp2, possibilitando inferir correlações entre os miRNAs candidatos e os genes possivelmente regulados por eles.

5.2.1. Cultura de Células

As células tronco murinas indiferenciadas da linhagem I-14 foram cultivadas sobre uma camada de fibroblastos embrionários murinos (MEFs) tratados com mitomicina. Um dia antes da coleta das amostras de RNA/proteína, as células foram submetidas a dois pré-plaqueamentos em gelatina para retirada dos MEFs. A diferenciação espontânea das mESC foi realizada mantendo-se as células em suspensão por 4 dias e plaqueando-se os corpos embrióides (EBs) resultantes em gelatina. Os EBs aderidos foram mantidos em cultura por cerca de 24 dias.

As células-tronco humanas indiferenciadas da linhagem BR-1 (Fraga et al., 2011) foram cultivadas diretamente sobre matrigel. Para obtenção da amostra diferenciada, fragmentos de colônias foram mantidos em suspensão por 6 dias e os corpos embrióides resultantes plaqueados sobre gelatina e mantidos por cerca de 22 dias.

Esta etapa do trabalho foi realizada por Naja Vergani e Ana Maria Fraga do Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias (LaNCE) na USP/SP, e as linhagens foram gentilmente cedidas para a subsequente extração de RNA e proteínas.

5.2.2. Extração de proteínas citoplasmáticas e totais

As proteínas totais e citoplasmáticas foram extraídas conforme descrito na metodologia geral.

5.2.3. *Western blotting*

O Western blotting destas células foi realizado da maneira descrita na metodologia geral.

5.2.4. Extração de RNA e retrotranscrição de genes codificantes

Estas etapas foram realizadas conforme descrito na metodologia geral.

5.2.5. PCR em tempo real de genes codificantes

O PCR em tempo real foi realizado conforme descrito na metodologia geral, tendo sido utilizados os seguintes primers:

Tabela 1. Primers utilizados para PCR. * Não foi calculada a eficiência de Oct4, uma vez não foi feita PCR quantitativa para este gene, tendo sido verificada sua expressão qualitativamente. ** Não foi calculada a eficiência deste primer, pelo mesmo motivo descrito anteriormente.

Primer	Eficiência	Diluição cDNA	Sentido	Sequência (5' → 3')
Dnmt3b humano	1,92	15ng/uL	Sense	AAG CTG TAC CCT GCC ATT CC
			Antisense	CCT ACC TTT ATG CCC AAC TCT TT
Dnmt3b camundongo	1,94	15ng/uL	Sense	CCA GCC TTC TGA ATT ACA CG
			Antisense	ATC AGA GCC ATT CCC ATC A
Mecp2 humano/camundongo	1,95	15ng/uL	Sense	CGG GGA CCT ATG TAT GAT GA
			Antisense	CTT TTC CCT GGG GAT TGA T
Oct4 humano	*	**	Sense	GTG GAG GAA GCT GAC AAC AA
			Antisense	ATT CTC CAG GTT GCC TCT CA
Oct4 camundongo	*	**	Sense	CTG AGG GCC AGG CAG GAG CAC GAG
			Antisense	CTG TAG GGA GGG CTT CGG GCA CTT
Beta actina humano	1,99	5ng/uL	Sense	CCA GCT CAC CAT GGA TGA TG
			Antisense	ATG CCG GAG CCG TTG TC
Beta actina camundongo	1,9	5ng/uL	Sense	TGG CAC CAC ACC TTC TAC AA
			Antisense	GGT CAT CTT TTC ACG GTT GG
U6 humano/camundongo	1,97	5ng/uL	Sense	CGC TTC GGC AGC ACA TAT ACT AAA ATT GGA AG
			Antisense	GCT TCA CGA ATT TGC GTG TCA TCC TTG C

5.2.6. Retrotranscrição e PCR em tempo real de miRNAs

Esta etapa foi descrita conforme descrito na metodologia geral.

Células hES foram lisadas e tiveram suas proteínas e RNAs extraídos ainda em seu estado indiferenciado (fig. 6A) e após 28 dias de diferenciação em corpos embrióides (fig 6B). Após a síntese do cDNA a partir do RNA extraído de hESC e seus respectivos corpos embrióides (hEB), foi verificada a expressão do RNA mensageiro do fator de transcrição *OCT4*, o qual é expresso somente em ES indiferenciadas e possui importante função na manutenção da pluripotencialidade (Scholer et al., 1990; Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000). As células após a diferenciação (hEB – corpos embrióides humanos) apresentaram uma redução drástica na expressão deste marcador (figura 6C).

Figura 6. Microscopia de luz de células tronco embrionárias humanas indiferenciadas e diferenciadas e expressão do gene *OCT4* em ambos os tipos celulares. (A) Células tronco embrionárias humanas indiferenciadas, aumento de 40X. (B) Células tronco embrionárias humanas após 28 dias de diferenciação, aumento de 40X. Barra de escala: 1000um. (C) RT-PCR de células tronco embrionárias humanas indiferenciadas (hES) e diferenciadas (hEB) para o gene *OCT4*.

A expressão do RNA mensageiro de *DNMT3B* está reduzida em cerca de 95% a de *MECP2* apresenta-se reduzida pela metade após a diferenciação, tendo sido ambos os resultados significativos (fig. 7).

Figura 7. Expressão de *DNMT3B* e *MECP2* através de PCR quantitativa em tempo real em células torçco embrionárias humanas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas. Expressão em células indiferenciadas foi considerada 100%. Resultado de triplicata biológica e duplicata experimental, normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

A diminuição na expressão do RNA mensageiro de ambos os genes foi acompanhada por uma redução na expressão proteica dos mesmos (fig.8).

Figura 8. Expressão da proteína de *DNMT3B* e *MECP2* através de *Western blotting*. (A) Acima: Expressão de proteína citoplasmática de *DNMT3B* em hES e hEB. Abaixo: Expressão de proteína citoplasmática de *MECP2* em hES e hEB. (B) Acima: Expressão de proteína total de *DNMT3B* em hES e hEB. Abaixo: Expressão de proteína total de *MECP2* em hES e hEB. Figuras representativas de duplicatas biológicas e experimentais.

A expressão de todos os microRNAs selecionados apresentou um aumento após a diferenciação, tendo sido este estatisticamente significativo para os microRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a e miR-29c (fig. 9).

Figura 9. Expressão dos microRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real em células tronco embrionárias humanas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas. Expressão em células indiferenciadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental, normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Assim, houve uma correlação inversa entre a expressão de todos os microRNAs candidatos e de seus possíveis alvos, *DNMT3B* e *MECP2*, ou seja, após a diferenciação ocorreu um aumento da expressão dos microRNAs selecionados, concomitantemente a uma diminuição na expressão dos genes *DNMT3B* e *MECP2*, tanto em nível de RNA quanto

em nível proteico (fig. 10 e 11).

Figura 10. Correlação entre a expressão do RNA de *DNMT3B* e dos microRNAs selecionados.

Figura 11. Correlação entre a expressão do RNA de *MECP2* e dos microRNAs selecionados.

De forma análoga, a expressão de *Oct4* foi verificada em mESC (fig. 12a) e mEBs derivados após a diferenciação (fig 12c), tendo sofrido uma drástica redução no segundo em relação ao primeiro (fig. 12d).

Figura 12. Microscopia de luz de células tronco embrionárias murinas indiferenciadas e diferenciadas e expressão do gene *Oct4* em ambos os tipos celulares. (A) Células tronco embrionárias murinas em suspensão, aumento de 40X. (B) Células tronco embrionárias murinas após 8 dias de diferenciação, aumento de 40X. Barra de escala: 1000um.(C) Células tronco embrionárias murinas após 22 dias de diferenciação, aumento de 40X. Barra de escala: 1000um. (D) RT-PCR de células tronco embrionárias murinas indiferenciadas (mES) e diferenciadas (mEB) para o gene *Oct4*.

A expressão do RNA mensageiro de *Dnmt3b* em células murinas sofreu uma significativa redução de cerca de 84% após a diferenciação, tendo o inverso ocorrido com *Mecp2*, o qual apresentou expressão cerca de duas vezes maior àquela das células-tronco indiferenciadas (fig. 13).

Figura 13. Expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* através de PCR quantitativa em tempo real em células torçco embrionárias murinas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas. Expressão em células indiferenciadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental, normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Uma redução na expressão de *Dnmt3b* e um aumento na expressão de *Mecp2* após a diferenciação também foram observados a nível proteico (fig. 14).

Figura 14. Expressão da proteína de *Dnmt3b* e *Mecp2* através de Western blotting. (A) Acima: Expressão de proteína citoplasmática de *Dnmt3b* em mES e mEB. Abaixo: Expressão de proteína citoplasmática de *Mecp2* em mES e mEB. (B) Expressão de proteína total de *Dnmt3b* em mES e mEB. Figuras representativas de duplicatas biológicas e experimentais.

Assim como nas hESC, em mESC foi verificado um aumento na expressão dos microRNAs após a diferenciação, tendo este sido estatisticamente significativo para os microRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29b e miR-29c (fig.15).

Figura 15. Expressão dos microRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real em células tronco embrionárias murinas submetidas à diferenciação, em relação às indiferenciadas. Expressão em células indiferenciadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental, normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Assim, a expressão dos microRNAs selecionados apresentou uma correlação inversa em relação à expressão de *Dnmt3b*, o qual teve sua expressão diminuída após a diferenciação (fig. 16). O contrário ocorreu em relação ao gene *Mecp2*, cuja expressão aumenta em células murinas após a diferenciação (fig. 17).

Figura 16. Correlação entre a expressão do RNA de *Dnmt3b* e dos microRNAs selecionados.

Figura 17. Correlação entre a expressão do RNA de *Mecp2* e dos microRNAs selecionados.

No presente trabalho, foi observado que tanto hESC e mESC apresentam uma drástica diminuição na expressão de *DNMT3B/Dnmt3b*, tanto no nível proteico quanto de RNA, quando submetidas à diferenciação *in vitro* (figuras 7, 8, 13 e 14). Esta diminuição já foi descrita anteriormente por diversos outros grupos. Watanabe e colegas (2002) observaram que *Dnmt3b* é somente expresso em células tronco totipotentes, em embriões de camundongos, e sua expressão é perdida após a diferenciação. Dado semelhante foi obtido por Ren et al. (2009) que encontraram o gene *DNMT3B* superexpresso em células tronco embrionárias humanas, em comparação a corpos embrióides e células somáticas adultas. Conforme exposto anteriormente, o nível de metilação em ilhas CpG diminui no feto em relação às ESCs, o mesmo ocorrendo com o modelo *in vitro*, ou seja, na diferenciação de células tronco embrionárias em corpos embrióides. Estes dados indicam, portanto, um importante papel de *DNMT3B/Dnmt3b*, tanto em humanos quanto em camundongos, na regulação gênica nos primeiros estágios do desenvolvimento e representam um importante modelo de estudo do início do desenvolvimento embrionário (Kremenskoy et al., 2003).

Porém, resultados contraditórios foram obtidos quando da análise da expressão de *MECP2/Mecp2*, onde esta encontra-se diminuída após a diferenciação em humanos (figuras 7 e 8), e aumentada em camundongos (figuras 13 e 14). Em estudo feito por Martín Caballero e colegas (2009), foram analisadas a função de 3 proteínas que reconhecem sítios metilados (*Methyl Binding Proteins* – MBPs), dentre elas a *Mecp2*. Nenhuma das proteínas estudadas demonstrou ser necessária para o início da

embriogênese, já que a deleção simultânea das MBPs foi compatível com a embriogênese normal em camundongos, sendo essencial somente no comprometimento de células tronco neuronais na diferenciação em uma linhagem específica. Desta forma, considerando-se que *Mecp2* não tenha um papel fundamental no início do desenvolvimento embrionário, seria esperado que não houvesse uma diferença significativa da expressão desta proteína no início da diferenciação.

Contudo, em humanos, a mutação no gene *MECP2* parece ser mais severa, bastando um alelo mutado para o desenvolvimento da Síndrome de Rett. O mesmo não ocorre em camundongos, onde ambos os alelos devem estar mutados para que o organismo apresente fenótipo parecido com o da Síndrome de Rett (Chen et al., 2001; Guy et al., 2001). Considerando-se que a mutação deste gene pode ter diferentes efeitos fenotípicos dependendo do organismo afetado, espera-se que *MECP2/Mecp2* possa desempenhar diferentes papéis em organismos diferentes, o que poderia em parte explicar a diferença em sua expressão em humanos e camundongos.

Adicionalmente, a diferença na expressão desta proteína nas diferentes espécies estudadas pode refletir o fato de as células encontrarem-se em diferentes estágios de diferenciação, uma vez que foram induzidas à diferenciação por períodos semelhantes, e considerando-se que o desenvolvimento embrionário humano ocorre de forma mais lenta em relação ao murino.

Uma vez que no início do desenvolvimento, *MECP2* é expresso principalmente em tecidos embrionários cerebrais (Shahbazian et al., 2002), a maior ou menor expressão do mesmo após a diferenciação poderia indicar um maior ou menor comprometimento das células na diferenciação de linhagens celulares cerebrais. Shahbazian e colegas (2002) relataram diversas diferenças, tanto no padrão temporal expressão

do gene quanto em sua localização sub-celular, quando comparados humanos e murinos. Como exemplo disto, foi observado o fato de que em camundongos, há um acréscimo na porcentagem de neurônios que expressam *Mecp2* principalmente durante a embriogênese, enquanto que em humanos, apesar de haver um aumento significativo na porcentagem de neurônios expressando *MECP2* durante a embriogênese, esta porcentagem continua a aumentar mesmo após o nascimento, e permanece até os 10 anos de idade. Assim, estas diferenças na expressão de *MECP2* podem dever-se às diferenças espécie-específicas.

Os microRNAs selecionados em ambas as espécies, por outro lado, apresentaram um aumento na maior parte das vezes significativo em sua expressão após a diferenciação em corpos embrióides (figuras 9 e 15).

Recentemente, Ren e colegas (2009) compararam a expressão de diversos genes codificantes e miRNAs em hESC, diferenciadas em hEB e células adultas. Neste estudo, foi observado que os microRNAs da família miR-26 são expressos principalmente em corpo embrióide, corroborando os dados obtidos no presente trabalho. Ainda no estudo mencionado, foi relatada uma alta expressão dos microRNAs da família miR-29 em células adultas, em comparação aos outros dois tipos celulares. Adicionalmente, não foi observada alteração na expressão de miRNA-203 entre os tipos celulares (Ren et al., 2009).

A superexpressão de microRNAs da família miR-29 em células adultas já havia sido relatada anteriormente, no primeiro estudo que procurou analisar a expressão de microRNAs em hESC indiferenciadas, em comparação à sua derivada diferenciada (Suh et al., 2004). Os microRNAs da família miR-26, porém, mostraram-se expressos na maioria das células testadas pelo grupo, contrariando o observado por Ren e colegas (2009). Em nossos resultados, apesar dos microRNAs da família miR-29 apresentarem um aumento em sua expressão após a

diferenciação, tendo este sido significativo para os miRNAs miR-29a e miR-29c em células humanas, e para os miRNAs miR-29b e miR-29c em células murinas, este aumento ocorreu em menores proporções em relação àquele dos miRNAs da família miR-26 em ambos os organismos, indicando que os miRNAs miR-26a e miR-26b podem desempenhar um importante papel no início do desenvolvimento embrionário.

De fato, diversos dos microRNAs estudados parecem ter funções essenciais na diferenciação celular em diferentes tecidos. O miRNA miR-26a parece estar envolvido com a modulação de modificações epigenéticas já que promove a miogênese através da repressão da expressão de Ezh2, uma histona metiltransferase, a qual tem função conhecida na supressão da diferenciação de células do músculo esquelético (Wong e Tellan, 2008). Além disto, o miRNA miR-26a parece ter função importante também na diferenciação osteogênica de células tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hADSCs) (Luzi et al., 2007). Os miRNAs da família miR-29, por sua vez, parecem ter importante função no desenvolvimento do pulmão, uma vez que sua expressão encontra-se aumentada em pulmão adulto comparado ao pulmão neonatal de camundongos e fetal humano (Williams et al., 2007). Os microRNAs desta família também parecem ter função na diferenciação de células musculares, uma vez que reprimem a expressão de HDAC4, uma histona deacetilase que atua como inibidora do comprometimento miogênico (Winbanks et al., 2011). Por fim, o miR-203 é capaz de alvejar o gene Δ Np62, diminuindo a capacidade proliferativa de queratinócitos da camada basal da epiderme adulta, tornando as células terminalmente diferenciadas nas camadas suprabasais (Lena et al., 2008).

Uma vez que um mesmo microRNA muitas vezes é capaz de regular a expressão de diversos genes de uma mesma via (Yuan et al.,

2009) , tornando assim o silenciamento mais eficiente, e que os microRNAs da família miR-29 são um exemplo disso, alvejando HDAC4 (Winbanks et al., 2011) e DNMT3A e DNMT3B (Fabbri et al., 2007), todos genes pertencentes à maquinaria epigenética, o fato de que os miRNAs da família miR-26 regulam a expressão de Ezh2, pertencente a esta mesma via (Wong e Tellan, 2008), provê evidência de que estes miRNAs também podem atuar na regulação de DNMT3B e MECP2.

Uma vez que os microRNAs estudados, no presente trabalho, apresentaram um aumento em sua expressão após a diferenciação, assim como ocorre com a maior parte dos miRNAs (Lu et al., 2005), esperaria-se que estes microRNAs tivessem uma expressão reduzida em células tumorais, as quais apresentam diversas características de células indiferenciadas, como alta taxa de proliferação e perda de capacidade de diferenciação. De fato, todos os microRNAs selecionados no presente estudo têm sido recorrentemente relatados com função supressora tumoral e, portanto, com baixa expressão nas células tumorais (Fabbri et al., 2007; Garzon et al., 2009; Lu et al., 2011; Viticchiè et al., 2011).

No presente trabalho, foi observada uma correlação inversa entre os miRNAs estudados e os genes *DNMT3B* e *MECP2* em humanos, bem como entre os miRNAs e o gene *Dnmt3b* em camundongos. A correlação inversa entre um microRNA e seus alvos preditos constitui importante evidência de que o miRNA em questão regula a expressão do gene alvo, sendo necessária a realização de novos experimentos com o objetivo de validação desta interação. Interessantemente, os miRNAs que apresentaram uma maior correlação inversa foram o miR-203 e os da família miR-26. Uma vez que a interação entre os miRNAs da família miR-29 e o gene *DNMT3B/Dnmt3b* já foi validada em câncer de pulmão (Fabbri et al., 2007) e leucemia (Garzon et al., 2009) em humanos, bem como em células primordiais germinativas de camundongos (Takada et

al., 2009), esperaria-se uma forte correlação negativa entre a expressão dos miRNAs desta família e da expressão de *DNMT3B/Dnmt3b*. Em nossos resultados, no entanto, a correlação negativa entre a expressão de miR-26a, miR-26b e miR-203, e a expressão de *DNMT3B/Dnmt3b* mostrou-se ainda maior, indicando que estes três miRNAs podem ter importante papel na regulação de *DNMT3B*, sendo que novos experimentos são requeridos para validação destas interações.

Adicionalmente, pouco se sabe sobre o papel dos miRNAs no início do desenvolvimento embrionário, sendo esta uma área de estudo bastante recente e que tem despertado o interesse de diversos cientistas, especialmente no que refere-se à reprogramação de células somáticas, gerando as células tronco pluripotentes induzidas. Como revisto anteriormente, estudos recentes têm utilizado com sucesso miRNAs na reprogramação celular (Judson et al., 2009; Miyoshi et al., 2011). Além disso, sabe-se que a reprogramação de células somáticas tem uma eficiência baixa devido à diversos fatores, dentre eles a possível hipermetilação persistente da região promotora de genes associados à pluripotência (Mikkelsen et al., 2008). Assim, a inibição das DNA metiltransferases mostrou-se eficaz na geração de células iPS (Huangfu et al., 2008; Mikkelsen et al., 2008; Shi et al., 2008). Desta forma, a identificação de microRNAs capazes de regular a expressão das DNA metiltransferases constitui uma importante promessa no emprego de miRNAs na reprogramação de células somáticas, aumentando a eficiência na geração de células iPS.

Por último, a linhagem de hESC utilizada no presente estudo constitui a primeira e única linhagem brasileira estabelecida descrita na literatura, até o presente momento, denominada BR-1 (Fraga et al., 2011). Assim, uma caracterização molecular desta linhagem, como por exemplo a verificação da expressão global de microRNAs em células

indiferenciadas e após a diferenciação, faz-se necessária tanto para elucidação de semelhanças e diferenças entre as células brasileiras em comparação às obtidas por outros países, bem como para fornecer dados para futuras pesquisas nas quais se utilize esta linhagem celular.

De acordo com os dados apresentados, é possível concluir que:

- Os genes *DNMT3B* e *MECP2* apresentam uma diminuição em sua expressão em corpos embrióides humanos, quando comparados à células tronco embrionárias humanas indiferenciadas, tanto à nível proteico quanto à nível de RNA.
- O gene *Dnmt3b* encontra-se com expressão diminuída em corpos embrióides murinos, em comparação à células tronco embrionárias murinas, ocorrendo o contrário com o gene *Mecp2*, tanto à nível proteico quanto em nível de RNA.
- Os microRNAs selecionados, miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-203 apresentam um aumento em sua expressão após a diferenciação das células tronco embrionárias, em comparação às células indiferenciadas.
- A correlação inversa entre a expressão de *DNMT3B* e *MECP2* em humanos e de *Dnmt3b* em camundongos em relação à expressão dos microRNAs sugere que estes podem regular a expressão dos genes citados, fazendo-se necessária a realização de novos experimentos para a validação das interações.

6. Capítulo 3 - Análise da função dos microRNAs na
expressão dos genes *Dnmt3b* e *Mecp2* em melanócitos e
melanomas

6.1.1. Modificações Epigenéticas no Câncer

As modificações epigenéticas presentes no DNA ou histonas são essenciais para a expressão correta dos diferentes genes, tendo estas modificações grande importância no desenvolvimento, no estabelecimento do cromossomo X inativo em mamíferos, no *imprinting* genômico, entre outros. Regiões ricas em dinucleotídeos CpG, conhecidas como ilhas CpG (Bird, 1986), localizam-se próximo às regiões promotoras de cerca de 60% dos genes e encontram-se hipometiladas nos os tecidos normais (Jones & Baylin, 2002). Apenas cerca de 6% destas regiões encontram-se metiladas em células normais, de maneira tecido-específica (Straussman et al., 2009). Outras regiões ricas em CpG são as regiões de DNA repetitivo, que contêm os DNA satélites e genomas invasores, como os retrovírus e transposons (Robertson, 2002). Tais regiões encontram-se altamente metiladas em células humanas normais, garantindo a estabilidade genômica, inibindo a reativação dos elementos transponíveis (Walsh et al., 1998; Gaudet et al., 2003; Esteller & Almouzni, 2005).

Em células tumorais, entretanto, o padrão de metilação do DNA genômico encontra-se bastante alterado, e muitas regiões promotoras de genes específicos encontram-se hipermetiladas (Weber et al., 2005). Muitos destes genes são supressores tumorais envolvidos com o ciclo celular, a apoptose, a angiogênese, o reparo do DNA, a invasão e a adesão celular. O perfil de hipermetilação das regiões promotoras destes supressores tumorais varia de acordo com o tipo de tumor (Costello et al., 2000; Esteller et al., 2001; Sjoblom et al., 2006). A metilação global do

DNA também é afetada, sendo que em células tumorais normalmente é observada uma hipometilação global, diferindo do observado em células normais (Weber et al., 2005). A hipometilação de regiões repetitivas do DNA parece estar relacionada com a instabilidade genômica encontrada em tais células (Yoder et al., 1997; Widschwendter et al. 2004; Deng et al., 2006). Adicionalmente, a hipometilação global também é responsável pela expressão de oncogenes normalmente silenciados em células normais (Jun et al., 2009). Além das modificações no padrão de metilação, outras alterações epigenéticas também ocorrem nestas células, como modificação pós-traducional de histonas e alteração da expressão de miRNAs.

Figura 1. Metilação do DNA e seus efeitos em células normais e tumorais. Em células normais, a metilação correta do DNA é essencial para a manutenção celular, sendo importante no silenciamento de sequências parasitas, inativação do cromossomo X em mamíferos, organização da cromatina, ativando ou desativando a expressão dos genes, metilação tecido específica e imprinting genômico. Nestas células, ocorre uma hipermetilação global e uma hipometilação de ilhas CpG

localizadas em regiões promotores dos genes. Em células tumorais, ocorre uma hipermetilação das ilhas CpG, especialmente de genes supressores tumorais, levando a um silenciamento dos mesmos e afetando diversas vias essenciais para o correto funcionamento celular. Há também uma hipometilação global, levando a uma instabilidade cromossômica, ativação de transposons e superexpressão de oncogenes antes silenciados. Adicionalmente, a persistência de citosinas metiladas pode levar a uma mutação das mesmas em timina. Figura modificada de Esteller e Herman (2002).

Além disto, evidências sugerem que as modificações epigenéticas pode preceder as mutações genéticas que contribuem para a tumorigênese, podendo portanto apresentar papel essencial na iniciação tumoral (Feinberg et al., 2006).

Assim, uma vez que alterações epigenéticas são capazes de modificar a expressão gênica, promovendo a tumorigênese e a manutenção do fenótipo tumoral, e que estas alterações são reversíveis, diversos estudos têm focado na utilização de drogas epigenéticas com o objetivo de reverter as marcas epigenéticas aberrantes em células tumorais, como inibidores de DNA metiltransferases (DNMTi), como 5-Azacitidina e Decitabina, e inibidores de proteínas que desacetilam histonas (HDACi), como ácido valpróico e fenilbutirato de sódio.

6.1.2. Inibidores de DNMTs

Os inibidores de DNMTs mais estudados são 5-Azacitidina e Decitabina (5-azadeoxicitidina), os quais incorporam-se ao DNA de células que estão de replicando, possuindo atividade desmetilante (Vesely e Cihak, 1977). Estes inibidores possuem atividade anti-tumoral através de dois mecanismos principais, citotoxicidade provocada pela sua incorporação do DNA genômico ou RNA, e desmetilação de genes

supressores tumorais (Jones e Liang, 2009). A Decitabina é incorporada ao DNA e forma uma ligação covalente com a DNA metiltransferase, aprisionando-a para degradação proteossomal e levando à sua inativação (Santi et al., 1984). A 5-Azacitidina também pode incorporar-se ao DNA através de sua conversão por fosforilação e redução (Stresemann et al., 2006). Adicionalmente, esta droga incorpora-se ao RNA, afetando seu processamento tanto no citoplasma quanto no núcleo, impedindo a biogênese dos ribossomos e a síntese proteica (Cihak, 1974), podendo atuar portanto de maneira independente da desmetilação do DNA (Momparler et al., 1984). Ambos os inibidores, portanto, são capazes de levar à hipometilação através da diminuição da quantidade de citosinas metiladas, o que ocorre de forma passiva ao longo de sucessivas divisões celulares (Ghoshal et al., 2005, Kuo et al., 2007). Assim, células com altas taxas de proliferação são mais suscetíveis à ação destas drogas, como no caso de células tumorais. Adicionalmente, estudos indicam que Decitabina parece ser menos tóxica e mais específica que 5-azacitidina (Momparler et al., 1984). De fato, após resultados positivos de diversos

Figura 2. Diferenças dos padrões de metilação o DNA, acetilação de histonas e compactação da cromatina entre células normais e tumorais. (a) em células normais, a maior parte dos genes encontram-se com DNA hipometilado, histonas acetiladas, estrutura aberta da cromatina, acessíveis a fatores de transcrição e, portanto, transcricionalmente ativos. (b) em células tumorais, genes antes ativos tornam-se metilados. Estes sítios metilados são reconhecidos por MBPs (proteínas que reconhecem dinucleotídeos CpG metilados), as quais recrutam desacetilases de histonas (HDACs). As histonas então encontram-se desacetiladas, o que favorece a atração entre as histonas e a fita do DNA, levando a uma compactação da cromatina e

inacessibilidade aos fatores de transcrição. Assim, o gene fica transcricionalmente inativo. (c) no tratamento com DNMTi, as DNMTs ficam covalentemente ligadas ao inibidor, sendo impedidas de metilarem citosinas. (d) assim, a metilação é passivamente diminuída ao longo de sucessivas replicações. As histonas voltam a serem acetiladas e o gene volta a ser acessível a fatores de transcrição, e portanto, torna-se transcricionalmente ativo. Figura modificada de Ren et al. (2011).

estudos clínicos, foi aprovada pelo FDA a utilização de ambas os análogos de pirimidina, 5-Azacitidina e Decitabina, no tratamento de síndromes mielodisplásicas (MDS) (Silverman et al., 2006), e diversos estudos têm indicado um potencial anti-tumoral destas drogas em diversos tipos de tumores. Além disto, o tratamento combinado de tumores com drogas inibidoras de DNMTs e drogas inibidoras de HDACs parece ser mais eficaz em relação aos efeitos da monoterapia (Xiong et al., 2005, Raza et al., 2008). Uma vez que o silenciamento epigenético de genes resulta de diversas alterações, incluindo metilação do DNA e desacetilação das histonas, o tratamento com ambas as drogas parece ter um efeito sinérgico (Luszczek et al., 2010).

6.1.3. MicroRNAs no câncer

Os primeiros miRNAs associados ao câncer foram miR-15a e miR-16-1, os quais estão localizados na região 13q14, entre os exons 5 e 6 do gene LEU2, a qual está frequentemente deletada em CLL indolente (Leucemia Mielóide Crônica), tipo de leucemia que frequentemente progride para um estado agressivo da doença (Calin et al., 2002). Em células normais, estes miRNAs reduzem a apoptose através da regulação do proto-oncogene anti-apoptótico BCL2 (Cimmino et al., 2005). Nos últimos anos, diversos outros miRNAs com expressão alterada em câncer foram identificados, e diversas são as causas desta regulação.

Uma análise sistemática da localização dos miRNAs no genoma de mamíferos mostrou que mais de 50% dos mesmos localizam-se em sítios frágeis do genoma, em regiões de perda de heterozigosidade (LOH), e em regiões mais suscetíveis a mutações, quebras e rearranjos, todas essas situações frequentemente encontradas em células tumorais (Calin et al., 2004). Portanto, alterações no número de cópias de genes de miRNAs têm um importante papel na formação de tumores (Calin et al., 2002). Além disto, desregulação da expressão de miRNAs pode dever-se a outras causas, como a desregulação da expressão de fatores de transcrição, modificações epigenéticas, mutações e polimorfismos no miRNA ou na sequência do sítio de ligação no mRNA alvo, e desregulação de proteínas que participam da biogênese do miRNA (revisto em Vasques et al., 2011).

Figura 3. MiRNAs em células normais e em tumores. Em tecidos normais, há uma expressão de determinados miRNAs essenciais para um tipo celular ou estágio do desenvolvimento específico, bloqueando a tradução de seus genes alvo.

Em células tumorais, miRNAs com função supressora tumoral (b) apresentam uma baixa expressão, possibilitando a expressão de seu gene-alvo, um oncogene. Os oncomiRs (c), por sua vez, apresentam-se super-expressos em células tumorais, inibindo a expressão de genes supressores tumorais. Estas alterações na expressão dos genes-alvo devido à desregulação dos miRNAs que os alvejam possibilita a tumorigênese e manutenção do fenótipo tumoral. Figura modificada de Esquela-Kerscher e Slack (2006).

Desde então, outros estudos têm verificado a expressão de diferentes miRNAs descritos até então, comparando a expressão dos mesmos entre células tumorais e normais. Os dados obtidos mostram que existe uma diminuição na expressão da maioria dos miRNAs em tumores, quando comparadas às células normais (Lu et al., 2005). Adicionalmente, existe uma relação direta entre a expressão dos miRNAs e a origem do tecido. Consequentemente, cada tipo de tumor possui um perfil de expressão de miRNAs específico, o que pode prover informação a respeito de sua origem, grau de malignidade e estado de diferenciação (Lu et al., 2005). Este fato tem grande importância para o diagnóstico e prognóstico de tumores, uma vez que de 3 a 5% de todas as malignidades humanas são tumores metastáticos de origem primária desconhecida (Pavlidis e Fizazi, 2005).

Figura 4 . Mecanismos responsáveis pela alteração da expressão de miRNAs. Diversos mecanismos podem ser os responsáveis pela desregulação da expressão de miRNAs em diversas patologias, como no câncer. Na figura, estão exemplificados alguns deles, como mutações, anormalidades genômicas e amplificações e deleções gênicas, inibição ou promoção da transcrição através de alterações epigenéticas e desregulação de fatores de transcrição, desregulação de proteínas importantes na biogênese dos miRNAs, como Drosha, Dicer e proteínas do complexo RISC, além de mutações e SNPs na região-alvo do mRNA, impedindo a ligação do miRNA ou criando ligações ilegítimas. Figura modificada de Lee e Dutta (2009).

Apesar de haver uma diminuição na expressão da maioria dos miRNAs em células tumorais, miRNAs específicos podem estar super-expressos, assim como pouco expressos, causando a desregulação dos níveis de expressão dos genes alvo. MiRNAs que inibem a expressão de prot-oncogenes e são capaz de prevenir o desenvolvimento e manutenção do estado tumoral estão usualmente pouco expressos em células tumorais e são denominados “miRNAs supressores tumorais”. Por outro lado, “oncomiRs” são miRNAs que geralmente modulam a expressão de genes

supressores tumorais, e estão usualmente super-expressos ou amplificados em células tumorais, contribuindo para o desenvolvimento tumoral.

6.1.4. MicroRNAs e epigenética no câncer

Foi estimado que cerca de metade dos genes de miRNAs estão associados a ilhas CpG, o que poderia indicar um importante mecanismo para a regulação transcricional de miRNAs. (Weber et al., 2007).

A primeira evidência de expressão alterada de miRNAs causada por modificações epigenéticas foi por proposta por Scott e colegas (Scott et al., 2006). Células de câncer de mama SKBr3 foram submetidas a uma dose pró-apoptótica de um inibidor de histona desacetilase (HDACi), LAQ824, o que levou as células a uma rápida alteração no perfil de expressão dos miRNAs, sendo que 22 miRNAs tiveram uma significativa redução de sua expressão, enquanto que 5 miRNAs tiveram um significativo aumento (Scott et al., 2006). No entanto, Diederichs e Harber (2006) não encontraram alterações significativas na expressão de miRNAs em células de câncer de pulmão A549 submetidas ao tratamento com inibidores de DNMTs (5-aza-CdR or 5-AZA-C) ou de histonas desacetilases (TSA ou butirato de sódio), sugerindo portanto que linhagens diferentes de células apresentam diferentes respostas, assim como diferentes efeitos dose-dependentes (Diederichs e Harber, 2006).

Porém, a correlação direta entre miRNAs e os mecanismos epigenéticos em câncer foi primeiramente observada por Saito et al. (2006). Nest estudo, foram encontrados 17 miRNAs superexpressos em células de câncer de bexiga T24 submetidas a tratamento com inibidores de DNMTs e HDACs. Entre eles, miR-127 foi particularmente analisado por encontrar-se altamente expresso após o tratamento. Este miRNA

pertence a um cluster localizado na região genômica 14q32.31 e está inserido em uma ilha CpG (Altuvia et al., 2005; Saito et al., 2006). Este miRNA encontra-se expresso em tecidos normais, mas está pouco expresso ou silenciado na maioria das linhagens tumorais analisadas no estudo (Saito et al., 2006). O tratamento levou à desmetilação de sua região promotora e, portanto, foi capaz de reativar sua expressão, resultando na inibição de expressão do proto-oncogene BCL6, cujo RNA é seu alvo (Saito et al., 2006). Este trabalho, portanto, trouxe novas perspectivas ao tratamento de tumores através da correção da expressão de miRNAs através tratamento com drogas.

Figura 5. Inter-relação entre miRNAs e modificações epigenéticas em células normais e tumorais. Em células normais, miRNAs com função supressora tumoral são capazes de inibir a tradução de RNAs mensageiros de oncogenes, bem como de DNA metiltransferases. Em células tumorais, porém, estes miRNAs supressores tumorais encontram-se pouco expressos, o que pode resultar de diversos fatores, dentre eles a hipermetilação de dinucleotídeos CpG localizados em sua região promotora. Além disto, em células tumorais, oncomiRs são expressos, inibindo a expressão de genes supressores tumorais através do impedimento da tradução de seus RNAs (regulação pós-transcricional). Adicionalmente, em células tumorais, DNA metiltransferases encontram-se mais expressas, e consequentemente há uma hipermetilação na região promotora de genes supressores tumorais, impedindo a sua transcrição (regulação transcricional). Linhas completas indicam vias que ocorrem em células tumorais, e linhas tracejadas indicam vias que ocorrem em células normais. Círculos preenchidos nos genes indicam dinucleotídeos CpG metilados, e círculos não preenchidos indicam dinucleotídeos CpG não metilados.

Em outro estudo, Lujambio et al. (2007) compararam a expressão de miRNAs em células de câncer de cólon HCT116 com sua linhagem derivada duplo nocaute para DNMT3b/DNMT1 (DKO). Os autores encontraram o miR-124 como o único miRNA dentre os 320 analisados, embebido em uma ilha CpG, super-expresso em células DKO quando comparado à linhagem parental HCT116, metilado em HCT116 e desmetilado em células normais de cólon. Foi observado também que o proto-oncogene CDK6 é um alvo de miR-124 e, portanto, este gene está super-expresso em células HCT116 quando comparado a células controle normais, e sua expressão sofre redução em células tratadas com agentes desmetilantes, ou em células DKO, quando comparada a células parentais não tratadas HCT116.

De fato, a hipermetilação aberrante do DNA silenciando miRNAs com função supressora tumoral tem sido frequentemente observada em tumores, como miR-9-1 em câncer de mama (Lehmann et al., 2008), miR-370 em colangiocarcinomas (Meng et al., 2008); miR-342 e seu gene hospedeiro, EVL, em células de câncer colorretal (Grady et al., 2008), miR-137 e miR-193 em câncer oral (Kozaki et al., 2008), e miR-

203 em malignidades hematopoiéticas (Bueno et al., 2008).

Por outro lado, a super-expressão de oncomiRs também foi observada como resultado de alterações epigenéticas em células tumorais, como por exemplo o let-7a-3. A região promotora deste gene está altamente metilada em células HCT116, possui um menor grau de metilação em células derivadas nocaute para DNMT1 (1KO) e DNMT3B (3bKO), e está quase completamente desmetilada em células derivadas duplo-nocaute (DKO), indicando que esta região é regulada por ambas as metilases, DNMT1 e DNMT3b (Brueckner et al., 2007).

Desde então, um crescente número de estudos tem recentemente associado metilação aberrante e alterações na estrutura da cromatina com a expressão desregulada de miRNAs e, conseqüentemente, com a tumorigênese.

O oposto também é possível, ou seja, miRNAs podem regular a expressão de componentes da maquinaria epigenética, demonstrando a complexidade de ambas vias e de suas interações. Em diversos tipos de câncer, DNMTs apresentam altos níveis de expressão (Patra et al., 2002; Girault et al., 2003). Portanto, miRNAs que regulam estes miRNAs podem ser bons candidatos para o controle da metilação aberrante de genes supressores tumorais em câncer. A primeira evidência de miRNAs regulando a expressão de genes associados com a maquinaria epigenética foi reportado por Chen e colegas (2006). Neste estudo, foi observada a regulação da Histona Desacetilase 4 (HDAC) por miR-1, o que promove a miogênese. Adicionalmente, membros da família miR-29 tem sido frequentemente associados com tumores, estando pouco expressos nestes, o que indica uma função supressora tumoral dos mesmos (Fabbri et al., 2007; Garzon et al., 2009). De fato, Fabbri e colegas (2007) demonstraram que membros desta família são capazes de

regular diretamente o mRNA de DNMT3a e DNMT3b em células de câncer de pulmão, e a expressão ectópica destes miRNAs inibe a expressão destas DNA metiltransferases, causando aumento nos níveis de metilação global e re-expressão de genes supressores tumorais. Além disto, a expressão ectópica de miR-29 foi capaz de inibir o crescimento celular e induzir a apoptose *in vitro*, bem como reduzir o crescimento de tumores *in vivo*. A seguir, Garzon e colegas (2009) observaram uma regulação indireta também de DNMT1 por miR-29b em células de leucemia, uma vez que este miRNA inibe a expressão de SP1, um fator de transcrição que regula a expressão de DNMT1. Em outro estudo, Duursma et al (2008) observaram que miR-148 é capaz de inibir a expressão de DNMT3b através da ligação com sua ORF (Open Reading Frame); sendo um dos poucos estudos a demonstrar este tipo de interação, mais comum em plantas. Interessantemente, este miRNA alveja da isoforma DNMT3b1, mas não DNMT3b3, revelando uma regulação específica de determinadas variantes de *splicing*.

6.1.5. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele resultante da transformação maligna de melanócitos (Schatton e Frank, 2008), os quais são células pigmentadas localizadas principalmente na pele e olhos, sendo responsável pela síntese de melanina (Gray-Schopfer et al., 2007). Os melanócitos da pele encontram-se na camada basal da epiderme e são capazes de proteger a pele dos efeitos danosos causados pela exposição da mesma aos raios ultravioleta (Gray-Schopfer et al., 2007).

O câncer de pele é a terceira malignidade humana mais comum, e o melanoma, apesar de não ser o tipo mais comum de câncer de pele, é o

que apresenta maior letalidade (Gray-Schopfer et al., 2007). Quando detectado precocemente, o melanoma pode ser extraído cirurgicamente na maior parte dos casos. Porém, em estágios avançados, o melanoma metastático usualmente torna-se refratário a terapias e, portanto, com baixas taxas de sobrevivência (Gray-Schopfer et al., 2007).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, a incidência de casos novos de melanoma no Brasil no ano de 2010 foi de 2960 homens e 2970 mulheres, representando cerca de 5% de todos os casos novos de câncer de pele no Brasil neste período, onde a região sul do país onde se observaram as maiores taxas de pacientes com este tipo de desordem.

Para o presente estudo, foram utilizadas células de melanócitos derivadas de melanoblastos epidermais normais de embriões de camundongos C57BL, melan-a (Bennett *et al*, 1987), bem como células tumorais derivadas obtidas através de exposição repetitiva ao bloqueio de ancoragem (Oba-Shinjo et al., 2006). Este modelo de transformação maligna de melanócitos foi alcançado através da submissão de melanócitos normais a bloqueio de adesão ao substrato. Em cada ciclo, a maior parte das células sofreram *anoikis*, ou seja, apoptose induzida por bloqueio de ancoragem, sendo que apenas uma pequena porcentagem sobreviveu ao estresse microambiental gerado. As linhagens celulares obtidas após 1, 2, 3 ou 4 ciclos de bloqueio de ancoragem foram nomeadas, respectivamente, 1C, 2C, 3C e 4C, sendo estas mais resistentes a *anoikis* que sua parental melan-a e, quando submetidas à uma diluição limitante, originaram sublinhagens com capacidade de formarem tumores *in vivo*, quando injetadas em camundongos sineigéticos (Oba-Shinjo et al., 2006). Tal modelo de transformação maligna de melanócitos sugere um acúmulo de alterações ocasionado pelo estresse microambiental, resultando na tumorigênese celular. Adicionalmente, modificações epigenéticas parecem ter um papel

fundamental na transformação maligna, uma vez que o tratamento com o inibidor de DNMTs, 5-aza-deoxicitidina, antes de cada ciclo de bloqueio de ancoragem foi capaz de impedir a transformação dos melanócitos *in vitro*. Além disto, mecanismos epigenéticos também parecem ser fundamentais na manutenção do fenótipo tumoral, uma vez que o tratamento de células transformadas com inibidores de DNMTs e HDACs resultou numa diminuição do crescimento tumoral *in vivo* (Molognoni et al., 2011).

Figura 6. Modelo de transformação maligna de melanócitos através de exposição repetitiva a estresse microambiental.

Assim, no presente trabalho, buscou-se analisar a expressão dos genes DNMT3B, MECP2 e de seus potenciais miRNAs regulatórios, miR-26a, miR-26, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 em melanócitos murinos melan-a e em melanomas derivados não-metastáticos (4C3-) e metastáticos (4C3+), comparando suas expressões entre as diferentes linhagens, bem como o efeito do tratamento com 5-aza-deoxicitidina na expressão dos mesmos.

6.2.1. Cultura de células

Melanócitos melan-a, bem como melanomas metastáticos (4C3+) e não metastáticos (4C3-) foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis (UNIFESP/SP). A linhagem murina de melanócito foi cultivada em meio RPMI (Gibco) com 5% de soro fetal bovino (Vitrocell), 200 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA – Sigma Aldrich) e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Invitrogen) e as linhagens tumorais derivadas, 4C3- e 4C3+, foram cultivada nas mesmas condições, sem adição de PMA. Todas as linhagens foram cultivadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, em garrafas de células de 25 ou 75 cm² (TPP) e repicadas regularmente, assim que atingissem confluência de cerca de 80%.

6.2.2. Tratamento com 5-aza-CdR

Para o tratamento com 5-aza-CdR, 10⁶ células foram plaqueadas em células de 10cm de diâmetro em meio completo. Após 6 horas, foi adicionado 5-aza-CdR (Sigma Aldrich) de forma a ficar numa concentração final de 10uM. Após 24 horas, o meio foi trocado por novo meio completo contendo 10uM de 5-aza-CdR. Após 24 horas, as células foram submetidas à extração de RNA e proteína. Nas células controle (não tratadas), foram plaqueadas 10⁶ células em placas de 10 cm de diâmetro, mantidas com meio completo sem 5-aza-CdR. Após 24 horas, o meio foi trocado novamente por meio completo sem 5-aza-CdR e 24 horas depois, as células foram coletadas.

6.2.3. Extração de proteínas, *Western blotting*, extração de RNA e Retrotranscrição de genes codificantes, retrotranscrição de miRNAs e PCR em tempo real de miRNAs

Esta etapa procedeu-se de forma semelhante ao descrito na metodologia geral.

6.2.4. PCR em tempo real de genes codificantes

O procedimento para realização de PCR em tempo real de genes codificantes deu-se conforme descrito na metodologia geral. Na tabela abaixo encontram-se listados os primers utilizados para esta etapa.

Tabela 1. Primers utilizados para PCR.

Primer	Eficiência	Diluição cDNA	Sentido	Sequência (5' → 3')
Dnmt3b camundongo	1,94	15ng/uL	Sense	CCA GCC TTC TGA ATT ACA CG
			Antisense	ATC AGA GCC ATT CCC ATC A
Mecp2 camundongo	1,95	15ng/uL	Sense	CGG GGA CCT ATG TAT GAT GA
			Antisense	CTT TTC CCT GGG GAT TGA T
Beta actina camundongo	1,9	5ng/uL	Sense	TGG CAC CAC ACC TTC TAC AA
			Antisense	GGT CAT CTT TTC ACG GTT GG
U6 camundongo	1,97	5ng/uL	Sense	CGC TTC GGC AGC ACA TAT ACT AAA ATT GGA AG
			Antisense	GCT TCA CGA ATT TGC GTG TCA TCC TTG C

6.3.1. Comparação entre linhagens de melanócito e melanomas

A expressão de *Dnmt3b* foi verificada no nível de RNA entre as linhagens de melanócito murino normal, melan-a, e duas linhagens tumorais derivadas, obtidas através da submissão dos melanócitos a sucessivos ciclos de bloqueio de ancoragem, 4C3-, não metastática, e 4C3+, metastática. Neste caso, foi observado que não houve mudança significativa na expressão de *Dnmt3b* em células 4C3- em relação à sua parental melan-a. Já em células 4C3+ metastáticas, porém, houve uma diminuição significativa de cerca de 36,5% na expressão de *Dnmt3b* em relação à parental, tendo diminuído significativamente em relação à não metastática também (figura 7).

Figura 7. Expressão de *Dnmt3b* através de PCR quantitativa em tempo

real nas linhagens de melanoma 4C3- e 4C3+, em relação à linhagem de melanócitos normais da qual se derivam, Melan-a. Expressão de Melan-a foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Padrão de expressão semelhante foi encontrado para o gene *Mecp2*, o qual não apresentou diferença significativa de expressão em células 4C3- em relação à melan-a, tendo havido significativa redução de cerca de 43,3% em sua expressão em células 4C3+ em relação a células Melan-a (figura 8).

Figura 8. Expressão de *Mecp2* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de melanoma 4C3- e 4C3+, em relação à linhagem de melanócitos normais da qual se derivam, Melan-a. Expressão de Melan-a foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Em relação à expressão dos miRNAs pertencentes à família miR-26 nas diferentes linhagens, foi observada expressão de cerca de 54,9% de

miR-26a, e 215,1% em miR-26b em células 4C3- em relação a células Melan-a, consideradas 100%. Adicionalmente, houve aumento significativo na expressão de miR-26a, miR-26b e miR-29c em células 4C3+ em relação à Melan-a, representando cerca de 141,4%, 206,9% e 213% de sua expressão, respectivamente. Houve diferença significativa na expressão de miRNA entre 4C3- e 4C3+ somente para o miR-26a, o qual encontrou-se mais expresso em células metastáticas, em relação ao melanoma não metastático (figura 9).

Figura 9. Expressão dos miRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de Melan-a, 4C3- e 4C3+. Expressão em células Melan-a foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Assim, em células 4C3- em relação à Melan-a, houve correlação inversa somente entre o miRNA miR-26a e os RNAs mensageiros de *Dnmt3b* e *Mecp2* (figura 10). Desta forma, houve uma diminuição somente deste miRNA em células 4C3- , em relação a células Melan-a (figura 9), ocorrendo o contrário com os RNAs de *Dnmt3b* e *Mecp2*, os quais sofreram discreto aumento de expressão, embora não significativo, nas células tumorais não-metastáticas 4C3- em relação aos melanócitos Melan-a (figuras 7 e 8)

Em células 4C3+ em relação às células melan-a, por outro lado, houve correlação inversa entre a expressão de todos os miRNAs, com exceção de miR-29a, em relação à expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* em células 4C3+(figura 10). Assim, células 4C3+ apresentam menores níveis de expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* em relação ao seus níveis em Melan-a (figuras 7 e 8), concomitantemente a uma maior expressão de todos os miRNAs, com exceção de miR-29a, tendo sido este aumento significativo apenas em miR-26a, miR-26b e miR-29c (figura 9).

Figura 10. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados *versus* a expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* em 4C3- e 4C3+, em comparação a células Melan-a. Acima: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* na linhagem 4C3-, em comparação à linhagem Melan-a. Abaixo: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* na linhagem 4C3+, em comparação à linhagem Melan-a.

6.3.2. Comparação entre linhagens tratadas com 5-aza-CdR e células controle

A seguir, a linhagem de melanócito normal, Melan-a, e as linhagens de melanoma derivadas, 4C3- e 4C3+ foram tratadas por 48 horas com 5-Aza-deoxicitidina (5-aza-CdR) 10uM, e a expressão de *Dnmt3b*, *Mecp2* e dos miRNAs selecionados foi analisada.

Em relação à expressão no nível do RNA de *Dnmt3b*, foi observada uma diminuição significativa em sua expressão nas 3 linhagens após o tratamento com 5-aza-CdR, em comparação às células

não tratadas, tendo sido a expressão deste gene de cerca de 60,6%, 73,8% e 67% (figura 11).

Figura 11. Expressão de *Dnmt3b* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de Melan-a, 4C3- e 4C3+ após tratamento com 5-aza-CdR em relação às respectivas linhagens não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

A expressão do RNA de *Mecp2*, por outro lado, não pareceu sofrer alterações significativas após o tratamento das células com 5-aza-CdR em nenhuma das linhagens estudadas (figura 12).

Figura 12. Expressão de *Mecp2* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de Melan-a, 4C3- e 4C3+ após tratamento com 5-aza-CdR em relação às respectivas linhagens não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Adicionalmente, não houve diferença significativa na expressão de nenhum dos miRNAs estudados em células de melanócito Melan-a após o tratamento, em relação às células controle. Por outro lado, houve aumento significativo na expressão de todos os miRNAs estudados em células 4C3- tratadas, correspondendo a sua expressão a cerca de 27,7 (miR-26a); 18,5 (miR-26b); 27,5(miR2-29a); 29,5 (miR-29b); 52,4 (miR-29c) e 26,1 (miR-203) vezes, em relação às células controle. Por fim, em 4C3+, todos os miRNAs apresentaram aumento significativo após o tratamento com 5-aza-CdR, com exceção do miR-203. Este aumento correspondeu a cerca de 2,7(miR-26a); 2,8(miR-26b); 5,9 (miR29a); 1,6 (miR29b) e 3,6 (miR-29c) nas células tratadas, em relação às células controle não tratadas (figura 13).

Figura 13. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens Melan-a, 4C3- e 4C3+ após tratamento com 5-aza-CdR, em relação às células não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Assim, houve correlação inversa entre a expressão de todos os miRNAs e a expressão dos RNAs de *Dnmt3b* e *Mecp2* em células Melan-a, quando comparadas células tratadas e não tratadas (figura 14). Isto deve-se ao fato de que, após o tratamento destas células, houve diminuição na expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* (figuras 11 e 612), concomitantemente a um aumento na expressão de todos os miRNAs estudados, embora este aumento não tenha sido significativo (figura 13).

Em células 4C3-, por sua vez, houve correlação inversa entre a expressão de todos os miRNAs e de *Dnmt3b* (figura 14), uma vez que após o tratamento houve diminuição significativa do RNA de *Dnmt3b* (figura 11) e aumento significativo na expressão de todos os miRNAs (figura 13). Em relação à expressão de *Mecp2*, porém, não foi observada uma correlação inversa entre sua expressão e a dos miRNAs selecionados, uma vez que a expressão de *Mecp2* não apresentou alteração significativa após o tratamento (figura 12).

Por fim, em células de melanoma metastáticas 4C3+, houve correlação inversa entre a expressão de todos os miRNAs estudados e a expressão de *Dnmt3b* (figura 14). Assim, células tratadas apresentaram maior expressão de todos os miRNAs de forma significativa, com exceção de miR-203, que embora tenha apresentado um aumento, o mesmo não foi estatisticamente significativo (figura 13). Além disto, estas células tratadas apresentaram expressão significativamente diminuída de *Dnmt3b* (figura 11). Em relação ao RNA de *Mecp2*, da mesma forma que ocorreu em células 4C3-, não houve correlação inversa (figura 14) uma vez que a expressão de *Mecp2* não apresentou diferenças significativas em sua expressão após o tratamento (figura 12).

Figura 14. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados *versus* a expressão de *Dnmt3b* e *Mecp2* em células Melan-a, 4C3- e 4C3+ tratadas com 5-aza-CdR, em comparação a células controle. Acima: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *DNMT3B* nas 3 linhagens de estudadas. Abaixo: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *MECP2* nas 3 linhagens estudadas.

Além disto, o nível de expressão de proteína dos genes codificantes nas linhagens estudadas e entre os tratamentos com 5-azadeoxicitidina foi analisada através da extração da proteína total das células e realização de Western blotting. Em relação à expressão de Dnmt3b, foi observada uma maior expressão de sua proteína em melanócitos Melan-a, sendo menos expressas nos melanomas murinos não metastáticos 4C3-, e em menor proporção ainda nos melanomas metastáticos 4C3+ (figura 15), de forma semelhante ao observado no nível de RNA (figura 7). Adicionalmente, em todas as linhagens, houve diminuição expressiva da expressão de sua proteína após o tratamento com 5-aza-CdR em relação à célula não tratada (figura 15), novamente de acordo com o observado em nível de RNA (figura 11).

Figura 15. Expressão da proteína de Dnmt3b através de Western blotting. Expressão de proteína total de Dnmt3b e *Beta-actina* em células Melan-a, 4C3- e 4C3+ controle e tratadas com 5-aza-CdR. Figura representativas de duplicatas biológicas e experimentais.

Em relação a expressão de Mecp2, foi feita análise densitométrica da expressão das bandas resultantes do Western, tendo sido observado que não houve alteração significativa na expressão desta proteína entre as 3 linhagens estudadas (figura 16), diferentemente do que ocorreu no nível de RNA (figura 8). Adicionalmente, não houve alteração significativa na expressão da proteína de Mecp2 nas 3 linhagens após o tratamento, em relação às células controle (figura 16), de forma semelhante ao que

ocorreu ao nível de RNA (figura 12).

Figura 16. Expressão da proteína de Mecp2 através de *Western blotting*.
Expressão de proteína total de *Mecp2* e *Beta-actina* em células Melan-a, 4C3- e 4C3+ controle e tratadas com 5-azadeoxicitidina. Figura representativas de duplicatas biológicas e experimentais.

Em tumores é comum ocorrer uma alteração no padrão das marcas epigenéticas, havendo uma hipometilação global, o que contribui para a expressão de oncogenes e para a instabilidade cromossômica, e uma hipermetilação sítio-específica, silenciando genes supressores tumorais (Weber et al., 2005). De fato, a metilação global de melanócitos e melanomas obtidos através do mesmo modelo experimental, utilizando células transformadas 4C11- e 4C11+, medida através de citometria de fluxo com utilização de anticorpos específicos para 5-metilcitosina (5-meC), demonstrou uma diminuição nos níveis de 5-meC nas células transformadas 4C11- e 4C11+, sendo esta diminuição significativa nas células metastáticas 4C11+ (Molognoni et al., 2011). No estudo citado, porém, não foi observada uma alteração na expressão de *Dnmt3b* em nível de RNA ou proteico em células transformadas, em relação aos melanócitos normais. De acordo com estes achados, no presente trabalho, células de melanoma não-metastático, 4C3-, não apresentaram alteração da expressão de *Dnmt3b* em relação à sua expressão em melanócitos normais no nível do RNA. Porém, células de melanoma metastático, 4C3+, apresentaram significativa diminuição de cerca de 1/3 em sua expressão (figura 7). O mesmo foi observado a nível proteico, onde houve uma menor expressão de *Dnmt3b* nas células transformadas (figura 15). As diferenças encontradas entre o presente trabalho e o estudo citado (Molognoni et al., 2011) pode dever-se ao fato de que tratam-se de linhagens de melanoma diferentes, apesar de terem sido obtidas pela mesma forma, através de repetitivos ciclos de bloqueio de ancoragem (Oba-Shinjo et al., 2006).

Adicionalmente, houve diminuição significativa na expressão de

Dnmt3b após o tratamento com o inibidor de Dnmts, 5-aza-CdR, tanto a nível de RNA (figura 11), quanto a nível proteico (figura 15). Como descrito anteriormente, 5-aza-CdR, quando introduzido na célula, é fosforilado e incorporado ao DNA (Stresemann e Lyko, 2008). Após a incorporado, então, é capaz de desfazer a ligação das DNMTs com o DNA, levando à sua degradação por proteases (Ghoshal et al., 2005; Kuo et al., 2007). Portanto, uma menor quantidade da proteína de Dnmt3b em células tratadas com o inibidor de Dnmts é esperada. A diminuição na expressão do RNA de Dnmt3b após o tratamento com 5-aza-CdR, por sua vez, possivelmente resulta de um mecanismo de feedback positivo, ou seja, o aumento da expressão de Dnmt3b levaria à indução da transcrição de seu gene. Assim, a degradação de sua proteína, de forma contrária, levaria à um baixo nível de transcrição de seu gene. Tal mecanismo, porém, ainda não é validado ou descrito na literatura, mas o mesmo efeito da utilização de inibidores de Dnmts na diminuição da expressão do RNA de Dnmt3b tem sido observado em outros tipos celulares, como em células de leucemia (Stankov et al., 2011) e células de câncer de endométrio humanos (Cui et al., 2010). Uma possível explicação para a diminuição na expressão do RNA de Dnmt3b após o tratamento seria a regulação através de miRNAs, os quais se ligariam de maneira específica ao seu RNA mensageiro, impedindo sua transcrição e levando ao seu processamento em P-bodies, com sua consequente desestabilização e degradação.

A expressão de *Mecp2*, por sua vez, não sofreu alteração na expressão de seu RNA em células 4C3- em relação à Melan-a, tendo sofrido uma significativa diminuição em sua expressão em células 4C3+, tanto em relação os melanócitos normais, quanto em relação ao melanoma murino não-metastático (figura 8). No nível proteico, porém, não foi observada nenhuma diferença significativa em sua expressão

entre as 3 linhagens estudadas (figura 16). Uma vez o RNA de Mecn2 está menos expresso em células 4C3+, em relação às outras duas linhagens, mas o nível proteico é semelhante, é possível que este RNA sofra uma regulação pós-transcricional nos melanócitos e melanomas não-metastáticos. Molognoni e colegas, porém, observaram uma menor expressão de Mecn2, tanto a nível de RNA quanto a nível proteico, em melanomas não-metastáticos e metastáticos em relação a melanócitos (Molognoni et al., 2011). Porém, conforme descrito anteriormente, embora as células utilizadas no presente estudo tenham sido obtidas da mesma forma que no estudo citado, correspondem a linhagens diferentes.

Adicionalmente, não foi observada diferença significativa na expressão de Mecn2 no nível do RNA e no nível proteico após o tratamento das linhagens com 5-aza-CdR, em relação às células não tratadas (figura 12), sendo isto o esperado, uma vez que não há descrições na literatura a respeito da presença de ilhas CpG em sua região promotora, possivelmente não sendo portanto afetado por alterações epigenéticas.

Em relação à expressão dos miRNAs estudados entre as linhagens, foi observado uma diminuição na expressão de miR-26a em células 4C3-, em relação às células Melan-a, tendo havido porém um aumento na expressão do mesmo em células 4C3+ em relação às células melan-a e 4C3- (figura 9). No outro miRNA da mesma família, miR-26b, houve aumento significativo de sua expressão em células 4C3- e 4C3+ em comparação a células Melan-a. Além disto, houve também aumento na expressão de miR-29b em células 4C3+ em relação às células Melan-a (figura 9). Uma vez que estes miRNAs têm sido recorrentemente descritos como supressores tumorais em diversos tipos de câncer (Fabbri et al., 2007; Garzon et al., 2009; Lu et al., 2011), o esperado seria sua diminuição ao longo da transformação maligna das células, o que

somente ocorreu para o miR-26a em células 4C3- em relação aos melanócitos dos quais se derivam. A superexpressão dos outros miRNAs descritos em 4C3+, porém, evidencia o possível papel regulador dos mesmos na expressão de Dnmt3b, o qual encontra-se com expressão significativamente diminuída em células 4C3+ em relação às células Melan-a. A correlação inversa entre a expressão de miR-26a e miR-26b versus a expressão de Dnmt3b em células 4C3+ em comparação às células Melan-a (figura 10) indicam a possibilidade de estes miRNAs estarem regulando a expressão desta DNA metiltransferase em melanomas metastáticos obtidos através de repetitivos ciclos de bloqueio de adesão, em relação aos melanócitos normais dos quais se derivam. Também houve correlação inversa entre a expressão de miR-29c e de Dnmt3b em células 4C3+ em relação às células Melan-a, e que a interação deste miRNA com Dnmt3b (figura 10), e o consequente silenciamento deste último já foi validada em estudos anteriores (Fabbri et al., 2007), sendo este um forte indício de que os miRNAs da família miR-26 também podem ter papel fundamental na regulação de Dnmt3b nestas células.

Por fim, a expressão de todos os miRNAs estudados apresentou aumento significativo após o tratamento com 5-aza-CdR nos melanomas 4C3- e 4C3+, sendo a única exceção o miR-203 em 4C3+, não tendo havido alteração significativa em sua expressão após o tratamento (figura 13), apesar de altamente expresso. Nos melanócitos, por outro lado, não houve alteração significativa na expressão de nenhum miRNA estudado após o tratamento com 5-aza-CdR (figura 13), o que explicita o fato de que células tumorais apresentam maior sensibilidade ao tratamento com drogas epigenéticas, uma vez que as marcas epigenéticas aberrantes são mais instáveis. De fato, Molognoni et al (2011) observaram uma maior quantidade de genes codificantes e miRNAs super-expressos após o

tratamento com 5-aza-CdR ou 5-aza-CdR e TSA, respectivamente, nas linhagens tumorais obtidas através de repetitivos ciclos de bloqueio de ancoragem, em relação aos melanócitos não tumorais dos quais se derivam (Molognoni et al., 2011).

Estima-se que cerca de metade dos miRNAs estejam embebidos em ilhas CpG e, portanto, estejam sob regulação das marcas epigenéticas (Weber et al., 2007), o que justificaria a super-expressão da maioria dos miRNAs estudados após o tratamento de células de melanoma com 5-aza-CdR. Além disto, como dito anteriormente, os miRNAs estudados têm sido recorrentemente descritos com função supressora tumoral, estando pouco expressos em tumores. Assim, sua super-expressão após o tratamento com 5-aza-CdR indica o potencial anti-tumoral desta droga em células de melanoma. Em concordância com isto, Molognoni et al (2011) observaram que a introdução de 5-aza-CdR em células de melanoma metastáticas e não metastáticas é capaz de diminuir a proliferação *in vitro* o crescimento tumoral *in vivo* (Molognoni et al., 2011). Por fim, a correlação inversa entre super-expressão dos miRNAs em células 4C3- e 4C3+ e a diminuição da expressão de Dnmt3b nas mesmas células após o tratamento com 5-aza-CdR (figura 14) indicam que o aumento da expressão destes miRNAs após a introdução de inibidores de DNMTs pode, pelo menos em parte, ser responsável pela diminuição na expressão de Dnmt3b após o tratamento. Assim, maiores estudos buscando a validação da interação dos miRNAs selecionados e do RNA mensageiro de Dnmt3b devem ser feitos, a fim de verificar o papel destes miRNAs em melanomas, e o efeito de 5-aza-CdR em sua expressão.

Finalmente, uma vez que não há alteração na expressão proteica ou de RNA de Mecp2 após a introdução de 5-aza-CdR nas linhagens de melanoma estudadas, este RNA não parece estar sendo regulado pelos

miRNAs estudados nestas linhagens.

No presente trabalho, buscou-se observar a expressão dos genes codificantes Dnmt3b e Mecp2, além dos miRNAs selecionados e suas correlações em melanócitos não tumorigênicos e melanomas derivados obtidos através de estresse microambiental sustentado, bem como os efeitos do tratamento das linhagens com a droga inibidora de Dnmts, 5-aza-CdR, sobre os mesmos.

Assim, as conclusões obtidas no presente trabalho são:

- Dnmt3b sofre significativa diminuição em sua expressão em células 4C3+, em relação às melanócitos normais, tanto em nível proteico quanto de RNA.
- A expressão no nível de RNA e da proteína de Dnmt3b encontra-se significativamente diminuída em todas as linhagens estudadas após a introdução de 5-aza-CdR, demonstrando que outro mecanismo de regulação, que não metilação de seu promotor, deve estar regulando-o negativamente.
- A expressão do RNA de Mecp2 encontra-se diminuída em células 4C3+, em comparação a melanócitos normais, não estando esta alteração refletida em nível proteico, o qual permanece inalterado.
- A expressão de Mecp2, tanto em nível de RNA quanto de proteína, permanece inalterada após o tratamento das linhagens com 5-aza-CdR.
- Os miRNAs miR-26a, miR-26b e miR-29c encontram-se mais expressos em células 4C3+, quando comparados aos melanócitos normais, sendo portanto o inverso ao que ocorre à expressão de Dnmt3b nestas células. Assim, estes miRNAs podem estar atuando na regulação de

Dnmt3b em células transformadas.

- Todos os miRNAs estudados encontraram-se super-expressos significativamente na linhagens 4C3- e 4C3+ após o tratamento com 5-aza-CdR, com exceção de miR-203 em células 4C3+. Uma vez que a expressão de Dnmt3b é diminuída após a introdução desta droga, é possível que estejam atuando na inibição deste gene nestas linhagens como resposta ao tratamento com 5-aza-CdR. Novos estudos devem ser realizados a fim de validar estas interações.

7. Capítulo 4- Análise da função dos microRNAs na
expressão dos genes DNMT3B e MECP2 em células de
leucemia

7.1.1. Leucemia

A leucemia corresponde a um grupo de doenças hematológicas que ocorrem principalmente em crianças e idosos, sendo responsáveis por 2% de todos os cânceres no mundo (Hodgson et al., 2007). As leucemias podem ser agrupadas em quatro sub-tipos, dependendo do tipo de evolução da doença, podendo ser aguda ou crônica, e da linhagem celular comprometida, linfoblástica ou mieloblástica (Hodgson et al., 2007). Segundo o Instituto Nacional de Câncer, em 2010, a incidência de casos de leucemia apresentou taxas mais elevadas nos estados da região sul e sudeste do Brasil, com estimativas de cerca de 6,22 casos para cada 100 mil homens, e 5,08 casos para cada 100 mil mulheres, somente no estado de São Paulo (disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/>).

A leucemia linfoblástica (ou linfocítica) aguda (ALL) é mais comum em crianças, correspondendo a cerca de 80% de todos os casos de leucemia em pessoas desta faixa etária, sendo causada por uma proliferação exacerbada de células precursoras de linfócitos T e B (Hodgson et al., 2007). Pouco se sabe a respeito das causas desta doença na maioria dos casos, sendo que um pequeno percentual deve-se à anormalidades genéticas e exposição à radiação (Hodgson et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o consumo de álcool por gestantes durante a gravidez é capaz de aumentar a incidência de leucemias agudas infantis(ALL e leucemias mieloblásticas (ou mielóides) agudas (AML)) (Shu et al., 1996). A sobrevivência de crianças após 5 anos do diagnóstico desta doença ainda é baixo, correspondendo a cerca de 40 a 50% (Pui et al., 1995; Stam et al., 2006) e cerca de 60% dos diagnósticos

desta doença se dão em pessoas de menos de 20 anos de idade (Howlader et al., 2011). Casos de AML, ao contrário do que ocorre em ALL, são mais comuns em idosos (Hodgson et al., 2007), sendo que mais de metade dos diagnósticos se dão em pessoas com mais de 65 anos de idade (Howlader et al., 2011). Além disto, neste tipo de leucemia, taxa de sobrevivência após 5 anos do diagnóstico é baixa, correspondendo a menos de 25% dos casos (Howlader et al., 2011).

A leucemia linfoblástica crônica (CLL) é o tipo mais comum de leucemia, atingindo principalmente a porção idosa da população, e parece ter bastante influência de fatores genéticos (Hodgson et al., 2007). Apesar disto, este tipo de leucemia apresenta taxas de sobrevivência após 5 anos de diagnóstico relativamente altas, correspondendo a cerca de 75% dos casos (Howlader et al., 2011). Atualmente, o tratamento mais empregado em casos de CLL consistem na combinação de três drogas: fludarabina, ciclofosfamida e rituximab e, apesar de apresentar altas taxas de resposta, frequentemente os pacientes apresentam recidivas (Hallek et al., 2009).

A leucemia mielóide crônica (CML) apresenta um curso trifásico, correspondendo a uma fase inicial crônica, seguida por uma fase acelerada e então, por fim, por uma fase aguda blástica, a qual apresenta baixa resposta à terapia. Este tipo de leucemia resulta da transformação maligna de células tronco da medula óssea (Hodgson et al., 2007). Em cerca de 90% dos casos de CML, observa-se a presença do cromossomo Philadelphia (Kurzrock et al., 1988). Esta aberração cromossômica é dada através da translocação dos cromossomos 9 e 22 (t(9; 22)(q34; q11), resultando na fusão do gene ABL (*Abelson*) presente no cromossomo 9 e o gene BCR (*Breakpoint Cluster Region*) presente no cromossomo 22, formando o gene híbrido BCR-ABL (Rowley, 1973; Bartram et al., 1983; Kurzrock et al., 1988). Esta translocação porém, não é exclusiva de CML, ocorrendo também em poucos casos de ALL e AML (Hodgson et

al., 2007). O tratamento desta doença se dá, atualmente, através do transplante da medula óssea (Speck et al., 1984), ou, quando isto não é possível, são empregadas drogas inibidoras de tirosina quinase, como mesilato de imatinibe (MI) (Druker et al., 1996), o qual liga-se especificamente a uma trinca de aminoácidos da estrutura terciária inativa da proteína ABL, impedindo a ligação da molécula de ATP a esta proteína (Schindler et al., 2000; Nagar et al., 2003). A CML ocorre mais comumente em idosos, sendo que cerca de 66% dos casos acometem indivíduos de mais de 55 anos de idade, e a taxa de sobrevivência após 5 anos de diagnóstico corresponde a pouco mais de metade dos casos (Howlader et al., 2011).

O gene BCR, apesar de não ter sua função ainda claramente definida, parece regular a atividade de quinase tanto de ABL quanto de BCR-ABL (Liu et al., 1996), além de estar possivelmente envolvido no mecanismo de reparo de DNA por excisão (Canitrot et al., 2003). O gene ABL, por sua vez, possui uma localização preferencialmente nuclear (Van Etten, 1999), possui atividade de tirosina quinase e tem função em diversos processos, como na apoptose (Wang, 2000; Yoshida et al., 2008) e indução de parada do ciclo celular (Sawyers, 1999), entre outros, sendo considerado portanto um gene supressor tumoral (Sawyers et al., 1994). O ponto de quebra do gene BCR ocorre numa região denominada “*Major breakpoint cluster region*”, entre os éxons 12 e 16 (Groffen et al., 1989), o qual, quando justaposto ao gene ABL, pode dar origem a dois transcritos diferentes b2a2 e b3a2, dependendo do éxon do gene BCR em que ocorreu a quebra, codificando para uma proteína quimérica BCR-ABL de 210KDa, denominada p210^{BCR-ABL} (Shtalrid et al., 1988). Quebras no gene BCR podem ocorrer também nas regiões “*Minor breakpoint cluster*” e “*Micro breakpoint cluster region*”, que quando se justapõe ao gene ABL, dão origem às isoformas p190^{BCR-ABL} (Kurzrock et al., 1987) e

p230^{BCR-ABL} (Pane et al., 1996), estando estas isoformas associadas à ALL Ph-positiva e à Leucemia neofílica crônica (LNC), respectivamente.

7.1.2. Epigenética na leucemia

Como já descrito na Introdução Geral, as marcas epigenéticas têm importante função na regulação da expressão de diversos genes, tendo portanto papel no desenvolvimento embrionário, na inativação do cromossomo X em mamíferos, estabelecimento do *imprinting* genômico, entre outros. Desregulações nestas marcas, por outro lado, são capazes de ocasionar diversos tipos de doenças, entre elas o câncer, onde genes supressores tumorais podem estar silenciados de forma aberrante, bem como proto-oncogenes, antes silenciados, voltam a ser expressos.

De fato, diversos estudos têm apontado para padrões epigenéticos aberrantes em todo os tipos de leucemia. O primeiro estudo a observar alterações epigenéticas em células tumorais oriundas de pacientes com AML ocorreu em 1987, onde foi descrita uma metilação aberrante no gene da Calcitonina (Baylin et al., 1987). Hoje, sabe-se que, em nestas células, ocorre uma hipometilação global (Costello e Plass, 2001) que pode contribuir para a resistência à terapia (Pfeifer et al., 1988). Apesar desta hipometilação global, diversos genes em AML encontram-se epigeneticamente silenciados, os quais estão envolvidos com diversos processos, como apoptose, reparo de DNA e ciclo celular (Issa et al., 1996; Herman et al., 1997; Issa et al., 1997; Melki et al., 2000; Seedhouse et al., 2003; Voso et al., 2004; Agrawal et al., 2007). Em um estudo recente, foi possível agrupar pacientes com AML em 16 sub-grupos, baseado no padrão de metilação específico das células tumorais. Deste sub-grupos, a maioria apresentou hipermetilação em relação às

células CD34+ da medula óssea (Figueroa et al., 2010).

De fato, em um modelo murino de CLL, foi observado um aumento no nível de metilação global, sendo que a maioria dos genes aberrantemente expressos devido a alterações epigenéticas foram os mesmos encontrados desregulados em CLL humana. Além disto, neste modelo, os níveis proteicos de Dnmt3a e Dnmt3b estavam aumentados nos estágios mais avançados da leucemia, apesar de não ser observada uma diferença no nível de mRNA destes dois genes, indicando uma possível regulação pós-transcricional dos mesmos. De fato, foi observada uma diminuição na expressão dos microRNAs (miRNAs) miR-29b e miR-29c, que sabidamente regulam a expressão destas DNA metiltransferases (Chen et al., 2009). Recentemente, outro estudo descreveu que, de 281 amostras de AML, cerca de 22% apresentavam mutações no gene DNMT3A, tendo consequências na tradução de sua proteína. Essas mutações, no entanto, não parecem ter efeito nos níveis de metilação global dos tumores, uma vez que amostras de AML com presença de DNMT3A mutado apresentaram a mesma taxa de citosinas metiladas do que amostras sem mutações neste gene. Foram observadas, no entanto, 182 regiões genômicas diferencialmente metiladas quando comparas amostras de AML com DNMT3A normal e mutado, não tendo sido observada, apesar disto, mudanças drásticas na expressão gênica. Pacientes com mutações no gene DNMT3A apresentaram, ainda, menores taxas de sobrevivência (Ley et al., 2010). Outros genes pertencentes à maquinaria epigenética encontram-se aberrantemente expressos em leucemias, como o EZH2, uma histona metiltransferase que possui uma expressão aumentada em pacientes com AML em comparação a voluntários saudáveis, e o tratamento destes pacientes com Decitabina resultou em uma diminuição significativa na expressão deste gene (Xu et al., 2011)

Drogas que atuam nas vias epigenéticas têm sido cada vez mais estudadas, visando o tratamento dos diferentes tipos de leucemia. Estas drogas, tendo como exemplos 5-Azacitidina e Decitabina, são utilizadas no tratamento de Síndrome Mielodisplásica (SMD), com aprovação da Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (*US Food and Drug Administration* – FDA), e seu emprego tem sido cada vez mais estudado em outros tipos de doenças hematológicas, como nos diferentes tipos de leucemia (Silverman et al., 2002; Sudan et al., 2006). Inibidores de Histonas Deacetilases (HDACi) podem ter um grande potencial terapêutico também, uma vez que em leucemia promielocítica aguda, a administração de Fenilbutirato de Sódio (PB), um HDACi, em combinação com ácido all-trans-retinoico (ATRA), levou à remissão do tumor (Warrell et al., 1998; Warrell, 1999). Uma vez que estudos que utilizam inibidores de DNA metiltransferases (DNMTi) ou inibidores de histonas deacetilases (HDACi) como monoterapia, ou seja, como único agente, apresentam baixas taxas de respostas, e que diversos estudos já demonstraram a ação sinérgica do tratamento combinado de ambos os tipos de drogas, estudos recentes têm dado atenção à atuação conjunta dos dois tipos de inibidores, objetivando o aumento da eficiência do tratamento (revisto em Jain et al., 2009).

7.1.3. MicroRNAs na leucemia

MiRNAs apresentam importante função na diferenciação de células hematopoiéticas (Chen et al., 2004; Georgantas et al., 2007), tanto da linhagem mielóide, quanto da linhagem linfocítica. De fato, a deleção de Dicer em células B precoces impede sua diferenciação (Koralov et al., 2008), o que, em parte pode ser explicado pela ausência do miR-17-92, pois em sua ausência não ocorre a maturação de células B, e há um

aumento nos níveis da proteína pró-apoptótica Bim (Ventura et al., 2008). Uma desregulação na expressão global dos miRNAs está presente na maioria dos tipos de câncer (Lu et al., 2005), e diversos estudos recentes têm buscado a identificação de miRNAs com expressão alterada em células leucêmicas.

De fato, os primeiros miRNAs identificados associados ao câncer foram os miRNAs miR-15a e miR-16-1, os quais localizam-se em uma região frequentemente deletada em CLL. Em células normais, estes miRNAs induzem a apoptose através da regulação do proto-oncogene anti-apoptótico BCL2 (Cimmino et al., 2005). Além disso, em CLL, miR-29b e miR-181b parecem ter uma importante função supressora tumoral, uma vez que quando presentes, são capazes de inibir a expressão de TCL1 (Pekarsky et al., 2006), proto-oncogene que regula diversas vias envolvidas na proliferação, morte e sobrevivência celular (Chan et al., 1999).

Em CML, o cluster miR-17-92 encontra-se super-expresso através de uma transativação por c-MYC e BCR-ABL (Venturini et al., 2007). Este cluster regula a expressão do fator de transcrição E2F1, tendo portanto um papel na regulação do ciclo celular (O'Donnel et al., 2005).

A expressão diferencial de miRNAs entre diferentes tipos de leucemia também possibilita a correta classificação da leucemia. Exemplo disto são os miRNAs miR-128a, miR-128b, let-7b e miR-223, os quais possuem expressão alteradas quando comparadas ALL e AML, onde os dois primeiros encontram-se mais expressos em ALL e os dois últimos em AML, possibilitando a distinção dos dois tipos de leucemia aguda (Mi et al., 2007)

Além disto, um miRNA com papel bastante importante em CML, o miR-203 está frequentemente pouco expresso, tanto devido à deleção cromossômica, quanto ao silenciamento epigenético. Este miRNA, por

sua vez, é capaz de regular a expressão do gene ABL, bem como de BCR-ABL (Bueno et al., 2008), e a reexpressão deste miRNA é capaz de reduzir a proliferação celular, desempenhando importante papel de supressor tumoral (Bueno et al., 2008). A hipermetilação da região promotora deste miRNA é frequentemente observada em tumores Ph⁺ (Bueno et al., 2008), e a sua re-expressão é capaz de reduzir a proliferação de forma indireta, através da redução da expressão de seu gene alvo ABL (Bueno et al., 2008).

Assim, fica claro que diversos miRNAs parecem estar envolvidos na patogênese dos diferentes tipos de leucemia, mas suas funções exatas, os genes que estão regulando e sua contribuição para o desenvolvimento e manutenção da leucemia ainda permanecem pouco conhecidos.

7.1.4. Violaceína

A violaceína, pigmento isolado de uma bactéria encontrada na região Amazônica brasileira, tem recebido crescente atenção uma vez que apresenta diversas funções biológicas. Dentre elas, estudos relatam sua função bactericida (Lichstein e Van de Sand, 1945; De Moss, 1967; Durán, 2007), impedindo o crescimento e promovendo a morte celular, através de mecanismos ainda desconhecidos (Nakamura et al., 2003). Além disto, este pigmento violeta parece também ter função fungicida (Shirata et al., 1997), antiparasitária (Durán e Menck, 2001; Leon et al., 2001; Costa et al., 2005; Lopes et al., 2009), anti-viral (May et al., 1991), anti-oxidante (De Azevedo et al., 2000; Konzen et al., 2006), anti-tumoral (Durán e Haun, 1997; Durán e Menck, 2001, Durán et al., 2007), entre outros (revisto em Durán et al., 2011).

Recentes estudos têm descrito a importância deste pigmento em diversos tipos de tumores, como na leucemia. Em células HL60, oriundas

de paciente com leucemia promielocítica aguda, por exemplo, foi observado que a introdução de violaceína é capaz de inibir a proliferação celular e induzir a diferenciação, bem como a apoptose, induzindo a expressão de caspases, proteases que atuam na morte celular programada (Melo et al., 2003).

Figura 1. Estrutura química da violaceína. Retirado de Durán et al., 2007.

Este efeito citotóxico de violaceína em células leucêmicas, no entanto, parece ser específico de células HL60, uma vez que sua introdução não apresentou os mesmos efeitos em K562, linhagem representativa de CML; em U937, linhagem de linfoma; ou em linfócitos e monócitos normais. Além disto, este efeito citotóxico específico em células HL60 parece ser mediado pelo receptor 1 de TNF, o qual é capaz de ativar a caspase 8, envolvida com a apoptose. Adicionalmente, a violaceína causou uma diminuição da expressão de c-jun, a qual, quando parte do fator de transcrição complexo AP-1, é capaz de promover e proliferação e progressão do ciclo celular (Ferreira et al., 2004).

Apesar de a violaceína ser um metabólito cada vez mais estudado, devido a suas diversas propriedades com grande potencial biotecnológico

e terapêutico, pouco se sabe ainda sobre seu mecanismo de ação nos diferentes tipos de leucemia, bem como sobre seus efeitos na expressão de diversos genes normalmente desregulados nestes tipos de câncer. Assim, foi objetivo do presente trabalho avaliar o efeito do tratamento com violaceína de diferentes linhagens de CML e AML na expressão dos genes codificantes frequentemente desregulados em leucemia, ABL e BCR-ABL, de genes participantes da maquinaria epigenética DNMT3B e MECP2, bem como dos microRNAs que preditos de regularem suas expressões, miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203.

7.2.1. Cultivo de células

Células das linhagens de leucemia mielóide humanas K562 e HL60, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Nutricell, Campinas, SP) suplementado com 25 mM de Hepes, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, SP) (meio completo) em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. As células da linhagem Lucena 1, variante da linhagem K562 resistente a múltiplas drogas (RUMJANEK et al., 2001), foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Vivian Rumjanek (Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ) e mantidas em meio completo na presença de 60 nM de vincristina (RUMJANEK et al., 2001) em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Nos experimentos de avaliação dos efeitos da violaceína, as células Lucena foram cultivadas em meio completo sem vincristina.

7.2.2. Tratamento com violaceína

Células K562 e Lucena (1x10⁵ células/mL) foram tratadas com 3 µM de violaceína em meio completo, por 24 h em estufa úmida a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As células HL60 (3x10⁵ células/mL) foram tratadas com 1 µM de violaceína por 24 h, conforme descrito previamente (Ferreira et al., 2004). Após o tratamento, as células foram coletadas em Trizol (Invitrogen) para extração do RNA.

O cultivo das células e o tratamento com violaceína foram realizados pela Prof. Dra. Giselle Zenker Justo (UNIFESP/Diadema) e os

extratos foram gentilmente cedidos para a realização deste trabalho.

7.2.3.Extração de proteínas e *Western-blot*

A extração de proteínas e o *Western blotting* foram realizados de acordo com o descrito na Metodologia Geral. Nesta etapa, foi utilizado um anticorpo o qual é capaz detectar tanto c-ABL quanto BCR-ABL (Cell Signaling Technology, # 2862), seguido por anticorpo secundário anti-rabbit (Millipore, # AP304P). Esta etapa foi realizada pelo grupo da Profa. Dra. Giselle Zenker Justo (UNIFESP/Diadema).

7.2.4. Extração de RNA e Retrotranscrição de genes codificantes, retrotranscrição de miRNAs e PCR em tempo real de miRNAs

Estas etapas foram realizadas conforme descrito na metodologia geral.

7.2.5. PCR em tempo real de genes codificantes

O PCR em tempo real de genes codificantes foi realizado conforme descrito na metodologia, e os primers utilizados encontram-se listados na tabela abaixo.

Tabela 1. *Primers* utilizados para PCR.

Primer	Eficiência	Diluição cDNA	Sentido	Sequência (5' → 3')
Dnmt3b humano	1,92	15ng/uL	Sense	AAG CTG TAC CCT GCC ATT CC
			Antisense	CCT ACC TTT ATG CCC AAC TCT TT
Abl humano	2,04	15ng/uL	Sense	TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T
			Antisense	GAT GTA GTT GCT TGG GAC CCA
Mecp2 humano	1,95	15ng/uL	Sense	CGG GGA CCT ATG TAT GAT GA
		15ng/uL	Antisense	CTT TTC CCT GGG GAT TGA T
Bcr-Abl humano	1,99		Sense	TCC ACT GGC CAC AAA ATC ATA CAG T
			Antisense	TCA GAA GCT TCT CCC TGA CAT CCG T
Beta actina humano	1,99	5ng/uL	Sense	CCA GCT CAC CAT GGA TGA TG
			Antisense	ATG CCG GAG CCG TTG TC
U6 humano	1,97	5ng/uL	Sense	CGC TTC GGC AGC ACA TAT ACT AAA ATT GGA AG
			Antisense	GCT TCA CGA ATT TGC GTG TCA TCC TTG C

7.3.1. Comparação entre linhagens

Primeiramente, foram avaliadas as expressões dos genes selecionados entre as diferentes linhagens estudadas, HL60, K562 e Lucena.

A expressão de *DNMT3B* é significativamente maior nas linhagens de CML estudadas, K562 e Lucena, em relação à linhagem de AML, HL60, em cerca de 60 e 49 vezes, respectivamente. As linhagens K562 e Lucena, por sua vez, não apresentam diferença significativa entre si na expressão deste gene (figura 2).

Figura 2. Expressão de *DNMT3B* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena. Expressão em células HL60 foi considerada 100%. Resultado de triplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

O gene *MECP2*, por sua vez, tem expressão cerca de 3 vezes maior em K562 e 5,8 vezes maior em Lucena em relação às células HL60. Adicionalmente, células Lucena apresentam uma expressão significativamente maior na expressão deste gene em relação à célula da qual se deriva, K562 (figura 3).

Figura 3. Expressão de *MECP2* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena. Expressão em células HL60 foi considerada 100%. Resultado de triplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

A expressão do gene *ABL* é cerca de 13 vezes maior em células K562 e cerca de 28 vezes maior em células Lucena em relação às células HL60 (figura 4).

Figura 4. Expressão de *ABL* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena. Expressão em células HL60 foi considerada 100%. Resultado de triplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Como já visto anteriormente, a linhagem HL60 não apresenta a translocação que gera o cromossomo filadélfia e, assim, não expressa o gene híbrido BCR-ABL. A linhagem K562, por sua vez, apresenta uma expressão 2,5 vezes menor deste gene que em sua derivada Lucena (fig. 5)

Figura 5. Expressão de *BCR-ABL* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia K562 e Lucena. Expressão em células K562 foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

A maioria dos miRNAs estudados, por fim, encontram-se menos expressos nas linhagens de CML estudadas, em comparação à linhagem HL60 (figura 6). O miRNA miR-26a tem expressão de cerca de 26% e 24% em K562 e Lucena, respectivamente, em relação às células HL60. O outro miRNA pertencente à mesma família, miR-26b tem expressão ainda menor, de cerca de 17 e 18% em células K562 e Lucena, respectivamente. O miRNA miR-29a, por outro lado, não apresentou diferença significativa entre as linhagens. Já os outros dois miRNAs da família 29, miR-29b e miR-29c encontram-se menos expressos nas linhagens de CML, em relação a HL60. Em K562, a expressão de miR-29b é de cerca de 29% e de miR-29c, de cerca de 13% em relação à expressão dos mesmos miRNAs em HL60. Em Lucena, por sua vez, a expressão de miR-29b é de cerca de 3%, e a de miR-29c, de cerca de 7% em relação à expressão dos mesmos em células HL60. Por fim, a expressão de miR-203 é de cerca de 16% em K562 e de cerca de 10% em Lucena, em relação à linhagem de AML, HL60. O único miRNA que apresentou uma diferença significativa entre as linhagens de CML foi o miR29c, que está aumentado em K562, quando comparado a sua derivada Lucena.

Figura 6. Expressão dos miRNAs selecionados através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena. Expressão em células HL60 foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

Foi observado que a expressão de todos os miRNAs selecionados para o presente estudo é inversa a expressão de seus potenciais alvos *DNMT3B* e *MECP2* em células Lucena quando comparadas à células HL60 (figura 7). Ou seja, em células Lucena há uma expressão maior destes genes codificantes, quando comparada às células HL60, concomitantemente a uma expressão menor dos microRNAs selecionados. O mesmo ocorre para a linhagem K562. Nesta linhagem há uma maior expressão de *DNMT3B* e *MECP2* e uma menor expressão de todos os miRNAs estudados, com exceção de miR-29a, quando comparados a linhagem HL60 (figura 7).

- miR-26a
- miR-26b
- ▲— miR-29a
- ▼— miR-29b
- ◆— miR-29c
- ⊕— miR-203

Figura 7. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados versus a expressão de *DNMT3B* e *MECP2* em K562 e Lucena, em comparação a células HL60 . Acima: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *DNMT3B* nas linhagens K562 e Lucena, em comparação à linhagem HL60. Abaixo: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *MECP2* nas linhagens K562 e Lucena, em comparação à linhagem HL60.

7.3.2. Comparação entre células tratadas com violaceína e células controle

Linhagens de leucemia mielóide crônica humanas, K562 e sua derivada Lucena, bem como de leucemia promielocítica aguda, HL60, tiveram seu RNA extraído antes e após a submissão das células ao tratamento com violaceína, conforme descrito na metodologia. A seguir, a expressão dos genes codificantes e miRNAs selecionados foi verificada através de PCR em tempo real.

A expressão de *DNMT3B* apresentou uma diminuição significativa de cerca de 50% em ambas as linhagens de CML após o tratamento das células com violaceína, em comparação às células não tratadas. A linhagem HL60, por outro lado, não apresentou diferença na expressão de *DNMT3B* após o tratamento com violaceína (figura 8).

Figura 8. Expressão de *DNMT3B* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***; p menor que 0.001.

A expressão de *MECP2* encontra-se diminuída em cerca de 2/3 em células HL60. Por outro lado, em células K562 houve um aumento de cerca de 2,4 vezes em relação à célula não tratada. Em células Lucena, no entanto, a expressão deste gene não apresentou mudanças significativas de expressão após o tratamento (figura 9).

Figura 9. Expressão de *MECP2* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Além disto, foi observada uma diminuição significativa de cerca de 24% e 33% na expressão de *ABL* após o tratamento com violaceína das linhagens K562 e Lucena, respectivamente, em comparação às mesmas linhagens não tratadas. Em HL60, no entanto, não houve diferença na expressão deste gene após o tratamento (figura 10).

Figura 10. Expressão de *ABL* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia HL60, K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Por outro lado, a expressão de gene BCR-ABL apresentou um significativo aumento de cerca de 30% em K562 após o tratamento com violaceína, em comparação à célula não tratada. Na linhagem Lucena, porém, não houve significativa diferença na expressão deste gene quando comparadas as células tratadas e não tratadas (figura 11). A expressão de BCR-ABL em células HL60 não foi detectada, uma vez que esta linhagem é Ph negativa, ou seja, não possui a translocação que origina o gene híbrido BCR-ABL.

Figura 11. Expressão de *BCR-ABL* através de PCR quantitativa em tempo real nas linhagens de leucemia K562 e Lucena após tratamento com violaceína, em relação às respectivas linhagens não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de duplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com Beta Actina. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Na linhagem de leucemia promielocítica aguda HL60, houve aumento significativo de cerca de 10 vezes na expressão de miR-29a em células tratadas com violaceína, em relação ao controle. Os outros microRNAs não apresentaram mudança estatisticamente significante em sua expressão após o tratamento (figura 12).

Figura 12. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real na linhagem de leucemia HL60 após tratamento com violaceína, em relação às células não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de monoplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Em células K562, por sua vez, todos os miRNAs apresentaram aumento de expressão após o tratamento, com exceção de miR-29b. A expressão dos outros miRNAs estudados tiveram aumento de 30% (miR-26b, miR-29c, miR-203), 100% (miR-29a) e 120% (miR-26a) após o tratamento, quando comparados às células não tratadas (figura 13).

Figura 13. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real na linhagem de leucemia K562 após tratamento com violaceína, em relação às células não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de monoplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

Nas células da linhagem Lucena, por fim, somente o miRNA miR-26a apresenta uma expressão significativamente aumentada após o tratamento com violaceína, sendo este aumento de cerca de 1,5 vezes em relação à célula não tratada.

Figura 14. Expressão dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c e miR-203 através de PCR quantitativa em tempo real na linhagem de leucemia K562 após tratamento com violaceína, em relação às células não tratadas. Expressão em células não tratadas foi considerada 100%. Resultado de monoplicata biológica e duplicata experimental. Valores normalizados com U6. *: p entre 0.01 e 0.05, **: p entre 0.001 e 0.01, ***: p menor que 0.001.

A expressão de *DNMT3B* mostrou-se inversa à expressão de todos os microRNAs em células K562, com exceção do miR-29b, e em células Lucena, com exceção de miR-29c e miR-203. Ou seja, há um aumento na expressão destes miRNAs após o tratamento, concomitantemente a uma diminuição da expressão de seu potencial alvo, *DNMT3B* nestes dois tipos celulares. Em HL60, por outro lado, há aumento da expressão tanto de *DNMT3B* quanto dos miRNAs estudados, não demonstrando portanto

evidências de alvejamento deste gene codificante pelos miRNAs selecionados nesta linhagem (figura 15).

Em relação ao gene *MECP2*, há correlação inversa entre sua expressão e a de todos os miRNAs selecionados em HL60, somente em miR-29b em células K562, e para todos os miRNAs exceto miR-29c e miR-203 em células Lucena (figura 15).

Figura 15. Correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados *versus* a expressão de *DNMT3B* e *MECP2* em células tratadas com violaceína, em comparação a células controle. Acima: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *DNMT3B* nas 3 linhagens de leucemia. Abaixo: correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados em relação à expressão de *MECP2* nas 3 linhagens de leucemia.

7.3.3. Análise da expressão proteica de BCR-ABL e ABL em células de leucemia

Por fim foi feita análise densitométrica das bandas resultantes de Western blotting, e foi observada uma maior expressão de ABL em K562 e em Lucena, em comparação à células HL60 no nível proteico (figura 16), em concordância com o observado no nível do RNA (figura 4). Em concordância com os resultados obtidos a partir do RNA em células HL60, não há presença da proteína p210^{BCR-ABL}, uma vez que tais células não possuem o gene híbrido BCR-ABL. Por outro lado, é mais expressa em células Lucena, em relação a células K562 no nível proteico (figura 16), em concordância ao que ocorre no nível do RNA, onde BCR-ABL encontra-se igualmente mais expressa na linhagem Lucena (figura 5).

Figura 16. Expressão da proteína de *ABL* e *BCR-ABL* através de *Western blotting*. Expressão de proteína total de *ABL* e *BCR-ABL* em células HL60, K562 e Lucena controle e tratadas com violaceína. Figuras representativas de duplicatas

biológicas e experimentais.

Adicionalmente, houve uma discreta diminuição na expressão da proteína de ABL em células K562 e Lucena após o tratamento com violaceína em comparação à célula controle (figura 16), de forma semelhante ao que ocorre em nível de RNA (figura 10). A proteína quimérica BCR-ABL, por outro lado, tem sua expressão diminuída após o tratamento em Lucena (figura 16), diferentemente do que acontece no nível do RNA, onde não ocorre a alteração de sua expressão em células Lucena (figura 11). Em células K562, no entanto, ocorre um aumento na expressão do RNA mensageiro de BCR-ABL após o tratamento (figura 11), ocorrendo o mesmo a nível proteico (figura 16).

No presente estudo, foram utilizadas duas linhagens de CML, K562 (Lozzio e Lozzio, 1977) e sua derivada Lucena, a qual foi obtida através de exposição contínua a doses crescentes de Vincristina, droga utilizada no tratamento à leucemia, sendo a linhagem, portanto, resistente a esta droga (Rumjanek et al., 2001). Células Lucena apresentam super-expressão do gene MDR-1 (Brindeiro, 1999) quando comparada à K562, tendo este gene frequentemente aumento de sua expressão em linhagens resistentes a drogas (Gros et al., 1986). Adicionalmente, esta linhagem derivada apresenta resistência a outros quimioterápicos, como antraciclinas (Maia et al., 1996), e células Lucena também são mais resistentes a peróxido de hidrogênio e à radiação UVA (Trindade et al., 1998, 1999). Como comparação, foi também utilizado no presente estudo células HL60 (Lanotte et al., 1991), uma linhagem de AML Ph-, ou seja, não apresenta a translocação que origina o gene híbrido BCR-ABL.

Primeiramente, foi observada uma significativa diminuição na expressão de *DNMT3B* nas duas linhagens de CML após o tratamento com violaceína, o que não ocorreu em HL60 (figura 8). Uma possível explicação para haver uma diminuição da expressão de DNMT3B após o tratamento com violaceína somente nas linhagens de CML, K562 e Lucena, e o mesmo não ocorrer em HL60, é que o nível de expressão deste gene na linhagem de AML é baixo em comparação às linhagens de CML estudadas. Assim, o tratamento com violaceína seria capaz de reduzir a expressão deste gene somente nas linhagens em que o mesmo está super-expresso, não alterando porém sua expressão em HL60, onde os níveis já estão naturalmente baixos. Tal resultado está em concordância com o observado por Mizuno e colegas (2001), tendo estes

observado que a expressão do RNAm de DNMT3B é maior em células K562 em relação às células HL60. Além disto, neste estudo foi demonstrado que DNMT3B está mais expresso nas duas linhagens em relação às células hematopoiéticas normais, e que a expressão de outras duas DNA metiltransferases, DNMT1 e DNMT3A, não parece diferir entre células HL60 e K562 (Mizuno et al., 2001).

Como visto anteriormente, desregulações epigenéticas parecem contribuir de forma importante para a tumorigênese e manutenção do fenótipo tumoral, e a utilização de drogas que atuam nas vias da epigenética têm sido cada vez mais estudadas com o objetivo de reversão do fenótipo tumoral. Assim, a superexpressão de *DNMT3B* já foi observada em diversos tipos de leucemia (Chen et al., 2009; Garzon et al., 2009; Calin et al., 2005) e o emprego de drogas epigenéticas, como Decitabina e 5-Azacitidina parece ter um importante potencial na reversão do fenótipo tumoral, através da re-expressão de genes supressores tumorais aberrantemente silenciados através de mecanismos epigenéticos (Silverman et al., 2002; Sudan et al., 2006; Garzon et al., 2009). Portanto, uma diminuição na expressão deste gene após o tratamento com violaceína nas linhagens K562 e Lucena, embora por vias ainda desconhecidas, revela o potencial desta droga como possível agente terapêutico uma vez que parece atuar reprimindo a expressão do *DNMT3B*, possivelmente levando à uma re-expressão de genes antes silenciados. As vias pelas quais violaceína é capaz de alterar a expressão de *DNMT3B* nestas linhagens, bem como as consequências desta diminuição ainda devem ser elucidadas.

O gene *MECP2*, por outro lado, apresentou-se diminuído em HL60 e aumentado em K562 quando comparados aos controles não tratados, não apresentando diferença significativa de expressão em Lucena. Diversos estudos têm observado uma expressão aumentada deste gene em

células tumorais (Billard et al., 2002; Sato et al., 2002 e Kn et al., 2004) e, da mesma forma que *DNMT3B*, uma diminuição em sua expressão poderia resultar em um aumento na expressão de genes antes aberrantemente silenciados, uma vez que *MECP2* é capaz de reconhecer sítios metilados de DNA e recrutar desacetilases de histonas. As histonas desacetiladas apresentam uma maior afinidade com o DNA, levando a uma menor acessibilidade do mesmo à fatores de transcrição. Assim, a diminuição de sua expressão em HL60 após o tratamento pode indicar um possível efeito anti-tumoral desta droga, com a reativação de genes supressores tumorais antes silenciados, o que precisa ser melhor estudado. Como exemplo, *MECP2* foi associado como parcialmente responsável pelo silenciamento do gene C-EBP delta, comumente hipermetilado em AML (Agrawal et al., 2007). A resposta à violaceína, porém, foi diferente para as linhagens de CML, K562 e Lucena, refletindo diferenças específicas entre as linhagens. Este fenômeno evidencia que a caracterização molecular é bastante importante para a escolha do tratamento mais adequado para cada tipo de tumor. Além disso, ausência de resposta do gene *MECP2* na linhagem Lucena após o tratamento pode contribuir para a manutenção do fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Isto porque o gene *MDR* possui uma expressão 5 vezes maior em Lucena que nas célula originárias K562 (Brindeiro et al., 1999) e que *MECP2* está envolvido no silenciamento deste gene (El-Costa et al., 2002). Entretanto, o papel de *MECP2* neste processo deve ser melhor investigado.

Ao se comparar a expressão deste gene entre as diferentes linhagens, por outro lado, observamos uma maior expressão de *MECP2* nas células K562 e Lucena, em comparação às células HL60 (figura 3), de forma semelhante ao que ocorreu em *DNMT3B* (figura 2), o que pode indicar que ambos os genes podem estar atuando na mesma via em

celulas de CML. Assim, uma vez que as linhagens de CML apresentam maior expressão de *DNMT3B*, possivelmente apresentam maiores quantidades de sítios metilados e, portanto, maiores expressões de proteínas que são capazes de reconhecer estes sítios metilados, como *MECP2*, levando ao recrutamento de desacetilases de histonas. Além disto, conforme descrito anteriormente, *MECP2* é capaz de silenciar o gene *MDR* (El-Costa et al., 2002), o qual está super-expresso em células que apresentam resistência a múltiplas drogas, como acontece em Lucena (Brindeiro et al., 1999). No presente estudo, foi observada uma maior expressão de *MECP2* em Lucena em relação à linhagem da qual se deriva, K562 (figura 3), o que é o contrário do que seria esperado. Uma vez que a linhagem tem alta expressão de *MDR*, esperar-se-ia uma baixa expressão de *MECP2*, gene que o silencia.

O gene *ABL*, por sua vez, apresentou expressão diminuída após o tratamento com violaceína nas duas linhagens de CML, K562 e sua derivada Lucena (figura 10 e 16). Este gene parece apresentar uma função ambivalente, uma vez que a porção nuclear da proteína ABL é capaz de impedir o crescimento celular, desempenhando portanto um papel supressor tumoral (Sawyers et al., 1994). Adicionalmente, o gene ABL parece promover a apoptose e parada do ciclo celular em células em cultura após danos ao DNA (Sawyers et al., 1994; Yuan et al., 1997). Por outro lado, sua atividade de tirosina quinase é capaz de provocar a super-expressão de genes como MMP-1, uma metaloproteinase de matriz, a qual quando expressa em grandes quantidades é capaz de promover metástase em melanomas, tendo portanto neste caso, função de oncogene (Ganguly et al., 2011). Em concordância com esta função, foi observado que este gene está super-expresso em CLL em comparação à células B periféricas de sangue normais, e que o emprego de STI-571, droga inibidora da atividade quinase de *ABL*, foi capaz de induzir à

apoptose células de CLL com alta expressão deste gene através da inibição de NF-KappaB (Lin et al., 2006), o qual é importante para a sobrevivência celular neste tipo de leucemia (Rodriguez et al., 2004). Além disto, a expressão de ABL parece estar diretamente correlacionada à severidade da doença, indicando que a expressão deste gene aumenta com a progressão da doença (Lin et al., 2006). Adicionalmente, no citoplasma, esta proteína parece estar envolvida com a diferenciação e com a dinâmica da actina e, portanto, do citoesqueleto (Woodring et al., 2003). Em concordância com estes dados, outro estudo demonstrou que a introdução de violaceína em células de câncer colorretal é capaz de inibir Akt, a qual ativa Ikb quinase que degrada o inibidor de NF-KappaB. Assim, a introdução de violaceína neste tipo celular leva indiretamente à inativação de NF-KappaB, levando à apoptose (Kodach et al., 2006).

É importante ressaltar que em estudo recente foi observado que a introdução de violaceína em células HL60 tem efeito citotóxico através da ativação da sinalização do receptor TNF-alfa (*tumor necrosis factor*) bem como da ativação de NF-KappaB, tendo efeito semelhante ao que ocorre quando induzido por receptores proinflamatórios (Ferreira et al., 2004). Em células HL60, a super-expressão de TNF foi capaz de ativar caspase-8, o que leva à apoptose (Ferreira et al., 2004), enquanto que a ativação de NF-KappaB está associado com a sobrevivência celular (Bowie e O'Neill, 2000; Deng et al., 2003), sendo que neste caso, estes dois efeitos opostos acabam por resultar na apoptose, através da ativação concomitante de caspases. Interessantemente, não foi observada uma super-expressão de TNF-alfa e NF-KappaB em K562 após a introdução de violaceína, demonstrando que diferentes vias devem atuar entre os diferentes tipos de leucemia (Ferreira et al., 2004). Assim, pode-se inferir que a não-alteração na expressão de *ABL* em HL60 após o tratamento com violaceína, ao contrário do que ocorreu nas linhagens de CML

(figura 10, figura 16), esteja relacionada aos diferentes efeitos desta droga nos diferentes tipos de leucemia. Conforme descrito anteriormente, em CLL a inibição de *ABL* parece promover a apoptose (Lin et al., 2006). Assim, a diminuição de sua expressão após o tratamento com violaceína em células K562 e Lucena pode indicar um potencial anti-tumoral desta drogas nas linhagens celulares descritas.

Ao comparar-se a expressão da expressão de *ABL* entre as linhagens, foi observada uma maior expressão deste gene nas linhagens de CML em relação à HL60, sendo maior em Lucena em relação à linhagem da qual se deriva, K562, tanto em nível de RNA (figura 4) quanto à nível proteico (figura 16). Devido ao fato de que a expressão do gene *ABL* parece estar diretamente correlacionada à severidade da doença, e que este gene está envolvido com a ativação de sinais anti-apoptóticos em células leucêmicas (Lin et al., 2006), e que as células resistentes Lucena parecem encontrar-se em um estado menos diferenciado, uma vez que apresentam maior expressão de Oct4, gene marcador de pluripotência, indicando que estas células encontram-se em um estágio tumoral mais avançado em relação às células sensíveis K562, é de se esperar que células resistentes à múltiplas drogas tenham uma maior expressão deste gene. Isto justificaria o fato de células lucena apresentarem maior expressão deste gene em relação a células K562. Considerando-se que a resposta à violaceína parece ser diferente entre as linhagens de leucemia estudadas e que as vias ativadas pela introdução desta droga podem diferir entre as linhagens, conforme descrito anteriormente (Ferreira et al., 2004), é de se esperar que haja uma diferente expressão de genes envolvidos na tumorigênese e manutenção do fenótipo tumoral nos diferentes tipos de leucemia. Assim, a expressão aumentada de *ABL* em células de CML (figura 4) pode, em parte, justificar a diminuição de sua expressão em células deste tipo de

leucemia após a introdução de violaceína (figura 10). Ou seja, uma vez que células HL60 possuem uma menor expressão deste gene e a introdução de violaceína não parece alterar sua expressão, diferentes vias devem atuar nesta célula, induzindo a apoptose (Ferreira et al., 2004). As vias pelas quais a droga violaceína atua em células K562, por sua vez, necessita de maiores estudos.

Houve um aumento na expressão do gene híbrido *BCR-ABL* após o tratamento com violaceína em células K562, não tendo ocorrido o mesmo com sua derivada Lucena, na qual não houve uma diferença significativa em sua expressão em nível de RNA, porém houve uma diminuição a nível proteico (figura 11, figura 16). A proteína *BCR-ABL* tem uma localização principalmente citoplasmática e é responsável pela ativação das principais vias que sofrem alterações na transformação maligna celular, sendo elas a sinalização mitogênica constitutiva, a adesão à matriz extracelular ou às células estromais alterada, inibição da apoptose e independência dos fatores de crescimento (revisto em Deininger 2010). Assim, considerando-se o efeito anti-tumoral desta droga em células de leucemia HL60, esperaria-se o mesmo efeito em outros tipos de leucemia e que houvesse, portanto, uma diminuição da expressão do oncogene *BCR-ABL*. Considerando-se que este é o primeiro estudo a analisar o efeito da introdução de violaceína na expressão de *BCR-ABL* em células de leucemia, novas análises devem ser feitas a fim de se detectar os mecanismos pelos quais ocorre a desregulação deste gene em células K562.

A expressão de *BCR-ABL*, por sua vez, ao comparar-se as linhagens K562 e sua derivada resistente Lucena, foi significativamente maior na segunda em relação à primeira (figura 5, figura 16). Uma vez que este gene híbrido, devido à sua atividade de tirosina quinase e sua localização citoplasmática, conforme descrito anteriormente, é capaz de

ativar diversas vias envolvidas na transformação maligna (revisto em Deininger, 2010), e que sua expressão aumenta conforme a progressão da doença (Guo et al., 1991; Gaiger et al., 1995; Lin et al., 1996; Elmaagacli et al., 2000), é de se esperar uma maior expressão deste onco-gene em células resistentes, como em Lucena, de acordo com o observado neste estudo.

Uma vez que a desregulação da expressão de miRNAs têm papel fundamental na tumorigênese e manutenção tumoral, e que diversos estudos têm relatado miRNAs desregulados em células leucêmicas, buscou-se no presente trabalho estudar a expressão de miRNAs preditos de regular a expressão de DNMT3B e MECP2, entre as diferentes linhagens de leucemia, bem como o efeito do tratamento com violaceína sobre sua expressão.

Foi observado um aumento significativo na expressão de miR-29a em HL60 (figura 12), miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29c e miR-203 em K562 (figura 6) e miR-26a em Lucena (figura 14) após o tratamento das células com violaceína. Considerando-se que os microRNAs selecionados têm sido descritos em diversos estudos com função de supressores tumorais, estando menos expressos em tumores (Fabbri et al., 2007; Bueno et al., 2008; Garzon et al., 2009; Lu et al., 2011), a maior expressão destes após o tratamento pode indicar que os miRNAs estudados, ao serem expressos novamente após o tratamento, podem estar reprimindo a expressão de oncogenes antes expressos, contribuindo para um efeito anti-tumoral de violaceína.

A família miR-29 tem sido reportada com pouco expressa em diversos tipos de tumores (Calin et al., 2005; Iorio et al., 2005; Yanaihara et al., 2006; Mott et al., 2007). De fato, o cluster que contém os miRNAs miR-29a/miR-29b-1 localiza-se na região cromossômica 7q32, a qual está frequentemente deletada em síndromes mielodisplásicas (Le Beau et

al., 1996). Além disso, em estudo recente, foi observado que a introdução de miR-29b em K562 é capaz de reduzir a expressão de *DNMT3A* e *DNMT3B* de maneira direta e de *DNMT1* através da inibição de seu regulador *SP1*, tendo como consequência a hipometilação global e restauração da expressão de genes supressores tumorais antes aberrantemente hipermetilados (Garzon et al., 2009). Previamente, já havia sido descrito pelo mesmo grupo uma menor expressão dos miRNAs da família miR-29 em células de câncer de pulmão em comparação com células normais de pulmão, bem como a repressão de *DNMT3A* e *DNMT3B* pelos miRNAs desta família, tendo como consequência a hipometilação global e a re-expressão de genes supressores tumorais também neste tipo celular (Fabri et al., 2007). Outras funções já foram descritas para este mesmo miRNA, como função pro-apoptótica, uma vez que este miRNA também alveja Mcl-1, membro da família Bcl-2 com função anti-apoptótica (Mott et al., 2007). Assim, uma super-expressão destes miRNAs nas células de leucemia estudadas após o tratamento com violaceína pode ser mais um indicativo do efeito anti-tumoral que este droga pode apresentar, uma vez que o aumento na expressão deste miRNA pode ser capaz de promover diminuição da metilação global e indução da apoptose.

Como já mencionado anteriormente, Ferreira e colegas (2004) observaram que células HL60 tratadas com violaceína apresentaram uma ativação de NF-KappaB, e foi demonstrado posteriormente que NF-KappaB é capaz de regular negativamente a expressão de miR-29b (Wang et al., 2008). Assim nesta linhagem, de acordo com a literatura, seria esperado um aumento na expressão deste microRNA, o que não ocorreu, uma vez que o mesmo não apresentou alteração estatisticamente significativa após a introdução de violaceína.

No presente trabalho, o miR-29b foi o único miRNA estudado que

não apresentou correlação inversa com a expressão de *DNMT3B* (figura 15) em células K562, uma vez que apesar de a expressão de *DNMT3B* ter diminuído após o tratamento (figura 8), a expressão do miRNA não apresentou alteração significativa nestas células (figura 13). Considerando-se que o miR-29b foi o único miRNA entre os selecionados neste estudo que já foi validado como miRNA que alveja *DNMT3B* em células K562 (Garzon et al., 2009), é provável que os outros miRNAs, tendo suas expressões apresentado correlação inversa com a expressão de *DNMT3B* em células K562 sejam fortes candidatos a miRNAs reguladores da expressão deste gene. Houve correlação inversa também entre a expressão dos miRNAs miR-29a e miR-29c em células K562 e miR-29a e miR-29b em células Lucena e da expressão de *DNMT3B*, bem como houve correlação inversa entre a expressão de todos os miRNAs da família miR-29 em células HL60, em miR-29b para células K562 e miR-29a e miR-29b em células Lucena e a expressão de *MECP2* (figura 15). Tais observações estão em concordância com a já conhecida regulação de *DNMT3B* por miRNAs da família miR-29, e corroboram a hipótese de que estes miRNAs também podem estar atuando na inibição de outro gene da via epigenética, *MECP2*. Assim, novos experimentos devem ser realizados a fim de validar esta interação.

O miRNA miR-203, por sua vez, tem grande importância em doenças hematológicas. Este miRNA encontra-se em uma região cromossômica frequentemente deletada em camundongos em malignidades hematopoiéticas específicas, além de o outro alelo estar frequentemente metilado em CML e alguns casos de AML (Bueno et al., 2008; Chim et al., 2011). A região 3'UTR do gene ABL e BCR-ABL é alvejada por este miRNA em humanos e camundongos. Assim, em tumores hematológicos este miRNA encontra-se pouco expresso, levando à super-expressão de seus dois genes alvo, e a restauração da expressão

deste miRNA, seja por transfecção ou por drogas epigenéticas, é capaz de reduzir a expressão de ABL e BCR-ABL, bem como leva a uma menor taxa de proliferação das células tumorais (Bueno et al., 2008). Assim, no presente estudo foi observado que o tratamento com violaceína leva a um aumento na expressão de miR-203 (figura 13) em K562, o que pode ser a causa da diminuição da expressão de ABL após o tratamento nas mesmas células (figura 10). A expressão de seu outro alvo *BCR-ABL*, porém, aumentou em K562 após o tratamento no nível de RNA (figura 11), o que pode indicar que a super-expressão do miRNA regulador não foi capaz de diminuir a expressão do gene alvo e outros mecanismos devem estar atuando concomitantemente para que ocorra a super-expressão do gene híbrido. Adicionalmente, a expressão de miR-203 correlaciona-se inversamente à expressão de *DNMT3B* em K562 e à expressão de *MECP2* em HL60 (figura 15), indicando que nestas células, este miRNA pode estar alvejando a expressão de ambos os genes envolvidos na maquinaria epigenética, uma vez que o mesmo foi alvejado por mais de 2 programas de predição. Tal interação, porém, precisa ser validada através de novos experimentos.

Pouco se sabe a respeito da função dos miRNAs da família miR-26, porém em estudo recente foi observado que o miR-26a tem função supressora tumoral em carcinoma nasofaríngeo através da inibição de EZH2 (Lu et al., 2011), o qual é uma histona metiltransferase e, portanto, pertencente à maquinaria epigenética. O fato deste miRNA alvejar um gene que atua nas vias epigenéticas suporta a hipótese de que este miRNA pode estar alvejando outros genes da mesma via, como *DNMT3B* e *MECP2*, considerando-se que um mesmo miRNA pode alvejar diversos genes de uma mesma via, potencializando seu efeito inibitório (Yuan et al., 2009). Neste estudo, foi observado um aumento na expressão de miR-26a e miR-26b em células K562 (figura 13), bem como de miR-26a em

células Lucena (figura 14) após o tratamento com violaceína, o que pode indicar uma contribuição destes miRNAs ao efeito anti-tumoral do emprego de violaceína, uma vez que estudos prévios indicam uma função supressora tumoral para estes miRNAs (Lu et al., 2011). Além disto, houve uma correlação inversa entre a expressão dos miRNAs miR-26a e miR-26b em células K562 e Lucena e a expressão de *DNMT3B*, bem como entre a expressão de miR-26a e miR-26b em HL60 e Lucena e a de *MECP2* (figura 15), o que indica uma possível regulação da expressão destes genes da maquinaria epigenética pelos miRNAs da família miR-26.

Além disto, foi observada para todos os miRNAs, com exceção de miR-29a, uma expressão aumentada em células HL60 em relação a ambas as linhagens de CML, K562 e Lucena (figura 6). Em estudo recente, Vaz e colegas analisaram o transcriptoma de miRNAs de células K562, HL60 e de células mononucleares periféricas de sangue (PBMC), tendo observado uma expressão baixa da maioria dos miRNAs em células K562 em relação às células normais. Também foi observada, em células K562, uma expressão aumentada da diversos genes pertencentes à maquinaria de biogênese de miRNAs, porém foi observada também uma baixa expressão de DICER, o que resultaria em um acúmulo de pré-miRNAs no citosol mas baixa quantidade de miRNAs maduros (Vaz et al., 2010). Em células HL60, por outro lado, foi observada uma expressão aumentada da maior parte dos miRNAs analisados, bem como a super-expressão ou expressão igual dos genes da maquinaria de biogênese de miRNAs em relação às células normais (Vaz et al., 2010). Assim, tais dados corroboram os resultados obtidos neste trabalho, onde foi verificada uma expressão diminuída dos genes da maquinaria epigenética estudados nas linhagens de CML. Corroborando também estes resultados, temos que a expressão de ABL e BCR-ABL, os quais são alvos validados

de miR-203 (Bueno et al., 2008), apresentam correlação inversa ao seu miRNA regulador. Assim, nas células de CML estudadas, há uma alta expressão de ABL e BCR-ABL e uma baixa expressão do miRNA que os alveja. Por outro lado, células HL60 apresentam uma baixa expressão de ABL e BCR-ABL, bem como uma alta expressão de seu miRNA regulador, miR-203. Assim, é possível que a expressão destes genes codificantes esteja sendo regulada por este miRNA em células HL60, e a perda da expressão deste miRNA em células de CML possibilita um aumento na expressão de seus genes alvo.

Adicionalmente, houve uma correlação inversa também entre a expressão de todos os miRNAs e da expressão dos genes DNMT3B e MECP2 em células Lucena comparadas à HL60 (figura 7), ou seja, enquanto todos os miRNAs estavam com sua expressão reduzida na linhagem Lucena em relação à HL60 (figura 6), a expressão de DNMT3B (figura 2) e MECP2 (figura 3) mostrou-se aumentada. Em células K562, quando comparadas com HL60, o mesmo ocorreu para todos os miRNAs, com exceção do miR-29a (figura 7). Tal correlação inversa entre a expressão dos miRNAs e de seus possíveis alvos mais uma vez evidencia a possibilidade de estes miRNAs estarem regulando a expressão de DNMT3B e MECP2 em células de leucemia. Além disto, o fato de os miRNAs da família miR-29 já terem sido validados como reguladores da expressão de DNMT3B em células de câncer de pulmão (Fabbri et al., 2007), bem como o fato de miR-29b ter o mesmo efeito, regulando a expressão de DNMT3B também em células leucêmicas (Garzon et al., 2009) evidencia a possibilidade de que este miRNA pode também alvejar MECP2, e que os outros miRNAs podem também estar alvejando DNMT3B e MECP2, uma vez que também apresentaram uma correlação inversa entre suas expressões. Assim, faz-se necessário novos estudos *in vitro* para a validação da regulação destes genes codificantes pelos

miRNAs candidatos selecionados no presente estudo em células de leucemia.

É importante ressaltar que este é o primeiro estudo de que se tem conhecimento, no qual analisa-se o efeito do emprego de violaceína na expressão dos genes *DNMT3B*, *MECP2*, *ABL* e *BCR-ABL*, bem como dos miRNAs miR-26a, miR-26b, miR-29a, miR-29b e miR-203 em células CML e AML. Assim, visto o potencial anti-tumoral desta droga tendo sido relatado em diversos estudos como descrito anteriormente, embora pouco se saiba a respeito das vias ativadas por esta droga nos diferentes tipos celulares, a análise da expressão de genes envolvidos em vias com papel fundamental na tumorigênese, como as vias epigenéticas e dos miRNAs, é de fundamental importância para a compreensão dos efeitos desta droga em células de leucemia.

O presente trabalho buscou analisar a expressão de genes pertencentes a vias frequentemente desreguladas em células de leucemia, como os genes da maquinaria epigenética *DNMT3B* e *MECP2*, genes com função de tirosina quinase, como *ABL* e *BCR-ABL*, e microRNAs com função de supressores tumorais, os quais encontram-se frequentemente pouco expressos em células tumorais, miRNAs da família miR-26, miR-29 e miR-203. Neste trabalho, buscou-se analisar o efeito da introdução da droga violaceína sobre a expressão destes genes em células de leucemia mielóide aguda e crônica, bem como buscou-se estabelecer uma correlação entre a expressão dos miRNAs selecionados e de seus potenciais genes-alvo, a fim de fornecer indícios do alvejamento dos RNAs codificantes pelos miRNAs estudados.

Assim, foram observadas diferenças na resposta à introdução de violaceína entre os diferentes tipos celulares estudados, e a alteração da expressões dos genes estudados, seja direta ou indiretamente, através da introdução de violaceína, pode indicar quais vias são afetadas por esta droga, sendo que novos estudos são requeridos para a compreensão dos mecanismos que possibilitam a desregulação destes genes.

Figura 17. Esquema das possíveis vias afetadas pela introdução de violaceína em células HL60, K562 e Lucena. Em vermelho, genes com expressão diminuída ou vias inibidas pela introdução de violaceína; em azul, genes com expressão aumentada ou vias induzidas pela introdução de violaceína; e em cinza, genes ou vias inalteradas após a introdução de violaceína.

Sabe-se que a via epigenética e o correto padrão de expressão de miRNAs é fundamental para o início do desenvolvimento embrionário e manutenção do estado diferenciado celular, sendo a desregulação de ambas as vias capaz de alterar a homeostase celular, provocando o surgimento de diversas patologias. Assim, é de extrema importância o estudo destas vias e da regulação de seus genes nos diferentes tipos de tecido. Apesar de atualmente existirem diversos miRNAs descritos, pouco sabe-se a respeito de seus respectivos genes-alvo e de sua função nos diferentes tecidos, tendo isto gerado uma crescente atenção a esta área de estudo pela comunidade científica.

Assim, o presente trabalho buscou observar a correlação inversa entre a expressão de *DNMT3b/Dnmt3b* e *MECP2/Mecp2*, cujos RNAs são traduzidos em proteínas que atuam na maquinaria epigenética, e a expressão de microRNAs preditos por diversos algoritmos como reguladores da expressão destes RNAs-alvo. De fato, tal correlação inversa foi observada entre diversos miRNAs estudados e seus possíveis alvos em diferentes tecidos e organismos. No presente trabalho foram utilizados como modelos de estudo o início do desenvolvimento embrionário em humanos e camundongos, a transformação maligna de melanócitos murinos e o tratamento de melanócitos e melanomas murinos com o quimioterápico 5-aza-deoxicitidina, bem como o tratamento de células leucêmicas humanas com a droga violaceína. Assim, esta correlação fornece evidências que sugerem a regulação dos genes codificantes estudados pelos miRNAs selecionados, o que deve ser validado através de novos experimentos.

Além disto, uma vez que a linhagem de células-tronco embrionárias humanas utilizada no presente estudo ainda é pouco caracterizada no aspecto molecular, buscou-se através do presente trabalho contribuir para análise da expressão dos genes selecionados nestas células ao longo de sua diferenciação.

Adicionalmente, pouco se sabe a respeito do efeito do emprego de violaceína em células de leucemia, sendo este o primeiro estudo a observar o efeito desta droga sobre a expressão de genes pertencentes à maquinaria epigenética, bem como, sobre a expressão de miRNAs em linhagens de leucemia. Assim, foi observado que o tratamento destas células com violaceína foi capaz de alterar significativamente a expressão de diversos dos genes estudados, sugerindo um envolvimento das vias epigenética e de miRNAs na resposta celular a esta droga. Assim, estudos complementares devem ser realizados a fim de elucidar as vias moleculares afetadas pelo tratamento de células leucêmicas com violaceína.

A metilação do DNA em mamíferos é uma importante modificação epigenética, sendo essencial no silenciamento de DNAs repetitivos, de regiões que sofrem *imprinting* genômico e no estabelecimento do cromossomo X inativo em fêmeas. Existem 5 tipos de DNA Metiltransferases, tendo a DNMT3B um importante papel na metilação *de novo*. A MeCP2, por sua vez, é uma proteína capaz de reconhecer sítios de DNA metilados e recrutar proteínas responsáveis pela desacetilação das histonas. Isto provoca alterações na conformação da cromatina, impedindo a transcrição gênica. Alterações nos padrões de expressão de DNMT3B e na metilação do DNA encontradas em diferentes tipos de tumores, e a temporalidade de expressão de *Dnmt3b* e de *Mecp2* durante ondas de desmetilação e de metilação que ocorrem no início do desenvolvimento embrionário, podem auxiliar na identificação de fatores envolvidos no estabelecimento e manutenção do padrão de metilação do DNA, os quais ainda são pouco conhecidos. Por sua vez, uma nova classe de pequenos RNAs, os microRNAs, envolvidos com a regulação da expressão gênica pós-transcricional, têm grande importância na manutenção do estado diferenciado de diferentes tipos celulares. Trabalhos recentes demonstram também que há alterações nos padrões de expressão de microRNAs entre tecidos normais e tumorais. Assim, é objetivo deste trabalho a identificação de possíveis miRNAs envolvidos na modulação da expressão dos genes *DNMT3B/Dnmt3b* e *MeCP2/Mecp2* em diferentes linhagens de células normais e tumorais, bem como, em células tronco embrionárias humanas e murinas submetidas à diferenciação. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os microRNAs selecionados são capazes de modular a

expressão destes genes pertencentes à maquinaria epigenética, em diferentes linhagens humanas e murinas.

Palavras-chave: DNMT3B, MECP2, epigenética, microRNAs, câncer, células-tronco embrionárias

DNA methylation in mammals is an important epigenetic modification, playing an essential role in the silencing of repetitive DNA, in genomic imprinting and, in females, the establishment of X chromosome inactivation. There are 5 DNA methyltransferases, and one of them, DNMT3B has an important role in *de novo* methylation. MeCP2, by its turn, is a protein capable of recognizing methylated DNA sites and of recruiting proteins responsible for histones deacetylation. This causes alterations in chromatin conformation, therefore inhibiting gene transcription. Changes in the expression patterns of DNMT3B and in DNA methylation are found in several types of tumors, and temporal expression of Dnmt3b and Mecp2 during global demethylation and *de novo* methylation waves, which occur in early embryonic development, could give a better understanding of the factors involved in the establishment and maintenance of DNA methylation patterns, which are still largely unknown. Additionally, a new class of small RNAs, the microRNAs, involved in the post-transcriptional gene silencing, has great importance in maintaining the differentiated state of several cell types. Recent studies have demonstrated alterations in miRNAs expression patterns between normal and tumor tissues. Thus, the aim of this work was to identify possible miRNAs involved in the modulation of Dnmt3b and Mecp2 RNAs in different normal and tumoral cell lines, as well as in human and murine embryonic stem cells and their respectively differentiated embryoid bodies. The results obtained in the present study suggest that the selected microRNAs are capable of modulating the expression of genes belonging to the epigenetic machinery, in different human and murine cell lines.

Keywords: DNMT3B, MECP2, epigenetics, microRNAs, cancer, embryonic stem cells

Adenot, P. G., Y. Mercier, *et al.* Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. Development, v.124, n.22, Nov, p.4615-25. 1997.

Agrawal, S., W. K. Hofmann, *et al.* The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. Blood, v.109, n.9, May 1, p.3895-905. 2007.

Alexiou, P., M. Maragkakis, *et al.* Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. Bioinformatics, v.25, n.23, Dec 1, p.3049-55. 2009.

Altuvia, Y., P. Landgraf, *et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs. Nucleic Acids Res, v.33, n.8, p.2697-706. 2005.

Barbato, C., I. Arisi, *et al.* Computational challenges in miRNA target predictions: to be or not to be a true target? J Biomed Biotechnol, v.2009, p.803069. 2009.

Barroso-Del Jesus, A., G. Lucena-Aguilar, *et al.* The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. Cell Cycle, v.8, n.3, Feb 1, p.394-8. 2009.

Barroso-Deljesus, A., G. Lucena-Aguilar, *et al.* The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. Faseb J, v.25, n.5, May, p.1497-508.

Barroso-Deljesus, A., C. Romero-Lopez, *et al.* Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. Mol Cell Biol, v.28, n.21, Nov, p.6609-19. 2008.

Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.281-97. 2004.

Bartram, C. R., A. De Klein, *et al.* Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature, v.306, n.5940, Nov 17-23, p.277-80. 1983.

Bashirullah, A., A. E. Pasquinelli, *et al.* Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of Drosophila metamorphosis. Dev Biol, v.259, n.1, Jul 1, p.1-8. 2003.

Baskerville, S. e D. P. Bartel. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. Rna, v.11, n.3, Mar, p.241-7. 2005.

Basyuk, E., F. Suavet, *et al.* Human let-7 stem-loop precursors harbor features of

RNase III cleavage products. Nucleic Acids Res, v.31, n.22, Nov 15, p.6593-7. 2003.

Baylin, S. B., E. R. Fearon, *et al.* Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. Blood, v.70, n.2, Aug, p.412-7. 1987.

Benetti, R., S. Gonzalo, *et al.* A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. Nat Struct Mol Biol, v.15, n.3, Mar, p.268-79. 2008.

Bennett, D. C., P. J. Cooper, *et al.* A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. Int J Cancer, v.39, n.3, Mar 15, p.414-8. 1987.

Berezikov, E., W. J. Chung, *et al.* Mammalian mirtron genes. Mol Cell, v.28, n.2, Oct 26, p.328-36. 2007.

Bernstein, E., A. A. Caudy, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature, v.409, n.6818, Jan 18, p.363-6. 2001.

Bestor, T., A. Laudano, *et al.* Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. J Mol Biol, v.203, n.4, Oct 20, p.971-83. 1988.

Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet, v.9, n.16, Oct, p.2395-402. 2000.

Billard, L. M., F. Magdinier, *et al.* MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. Oncogene, v.21, n.17, Apr 18, p.2704-12. 2002.

Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature, v.321, n.6067, May 15-21, p.209-13. 1986.

Boggs, B. A., P. Cheung, *et al.* Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. Nat Genet, v.30, n.1, Jan, p.73-6. 2002.

Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, *et al.* Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. Rna, v.10, n.2, Feb, p.185-91. 2004.

Borchert, G. M., W. Lanier, *et al.* RNA polymerase III transcribes human microRNAs. Nat Struct Mol Biol, v.13, n.12, Dec, p.1097-101. 2006.

Bourc'his, D., G. L. Xu, *et al.* Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. Science, v.294, n.5551, Dec 21, p.2536-9. 2001.

Bowie, A. e L. A. O'Neill. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a

reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem Pharmacol, v.59, n.1, Jan 1, p.13-23. 2000.

Boyces, J. e A. Bird. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. Cell, v.64, n.6, Mar 22, p.1123-34. 1991.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brandeis, M., D. Frank, *et al.* Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. Nature, v.371, n.6496, Sep 29, p.435-8. 1994.

Brindeiro, P.A. Caracterização de aspectos bioquímicos e moleculares de linhagem eritroleucêmica Lucena 1-K562 envolvidos com o fenótipo MDR. MSc Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. 1999.

Brueckner, B., C. Stresemann, *et al.* The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. Cancer Res, v.67, n.4, Feb 15, p.1419-23. 2007.

Bueno, M. J., I. Perez De Castro, *et al.* Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. Cancer Cell, v.13, n.6, Jun, p.496-506. 2008.

Bushati, N. e S. M. Cohen. microRNA functions. Annu Rev Cell Dev Biol, v.23, p.175-205. 2007.

Cai, X., C. H. Hagedorn, *et al.* Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. Rna, v.10, n.12, Dec, p.1957-66. 2004.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.24, Nov 26, p.15524-9. 2002.

Calin, G. A., M. Ferracin, *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med, v.353, n.17, Oct 27, p.1793-801. 2005.

Calin, G. A., C. Sevignani, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.9, Mar 2, p.2999-3004. 2004.

Canitrot, Y., R. Falinski, *et al.* p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. Blood, v.102, n.7, Oct 1, p.2632-7. 2003.

Card, D. A., P. B. Hebbar, *et al.* Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. Mol Cell Biol, v.28, n.20, Oct, p.6426-38. 2008.

Cedar, H. e Y. Bergman. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet, v.10, n.5, May, p.295-304. 2009.

Chaillet, J. R., T. F. Vogt, *et al.* Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. Cell, v.66, n.1, Jul 12, p.77-83. 1991.

Chan, T. O., S. E. Rittenhouse, *et al.* AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. Annu Rev Biochem, v.68, p.965-1014. 1999.

Cheloufi, S., C. O. Dos Santos, *et al.* A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature, v.465, n.7298, Jun 3, p.584-9.

Chen, C. Z., L. Li, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science, v.303, n.5654, Jan 2, p.83-6. 2004.

Chen, J. F., E. M. Mandel, *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet, v.38, n.2, Feb, p.228-33. 2006.

Chen, R. Z., S. Akbarian, *et al.* Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. Nat Genet, v.27, n.3, Mar, p.327-31. 2001.

Chen, S. S., M. H. Sherman, *et al.* Epigenetic alterations in a murine model for chronic lymphocytic leukemia. Cell Cycle, v.8, n.22, Nov 15, p.3663-7. 2009.

Chen, T., Y. Ueda, *et al.* Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. Mol Cell Biol, v.23, n.16, Aug, p.5594-605. 2003.

_____. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. J Biol Chem, v.277, n.41, Oct 11, p.38746-54. 2002.

Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature, v.436, n.7051, Aug 4, p.740-4. 2005.

Chi, S. W., J. B. Zang, *et al.* Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. Nature, v.460, n.7254, Jul 23, p.479-86. 2009.

Chim, C. S., K. Y. Wong, *et al.* Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. J Cell Mol Med, Feb 15.

Cihak, A. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. Oncology, v.30, n.5, p.405-22. 1974.

Cimmino, A., G. A. Calin, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting

BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.39, Sep 27, p.13944-9. 2005.

Compton, S. J. e C. G. Jones. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Anal Biochem, v.151, n.2, Dec, p.369-74. 1985.

Costa, F.T.M., G.Z. Justo, et al. The use of violacein in its free and encapsulated form in polymeric systems against malaria. Brazilian Patent PIBr 056399. 2005.

Costello, J. F., M. C. Fruhwald, *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. Nat Genet, v.24, n.2, Feb, p.132-8. 2000.

Costello, J. F. e C. Plass. Methylation matters. J Med Genet, v.38, n.5, May, p.285-303. 2001.

Coy, J. F., Z. Sedlacek, *et al.* A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. Hum Mol Genet, v.8, n.7, Jul, p.1253-62. 1999.

Cui, M., Z. Wen, *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3B and induces apoptosis in human endometrial cancer cell lines with the up-regulation of hMLH1. Med Oncol, v.27, n.2, Jun, p.278-85.

Dean, W., D. Lucifero, *et al.* DNA methylation in mammalian development and disease. Birth Defects Res C Embryo Today, v.75, n.2, Jun, p.98-111. 2005.

Deininger, M. Chronic myelogenous leukemia therapy beyond imatinib. Clin Adv Hematol Oncol, v.8, n.3, Mar, p.178-80.

Demoss, J. A., R. W. Jackson, *et al.* Genetic control of the structure and activity of an enzyme aggregate in the tryptophan pathway of *Neurospora crassa*. Genetics, v.56, n.3, Jul, p.413-24. 1967.

Deng, G., A. Nguyen, *et al.* Regional hypermethylation and global hypomethylation are associated with altered chromatin conformation and histone acetylation in colorectal cancer. Int J Cancer, v.118, n.12, Jun 15, p.2999-3005. 2006.

Deng, J., S. A. Miller, *et al.* beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. Cancer Cell, v.2, n.4, Oct, p.323-34. 2002.

Dews, M., A. Homayouni, *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. Nat Genet, v.38, n.9, Sep, p.1060-5. 2006.

Dhasarathy, A. e P. A. Wade. The MBD protein family-reading an epigenetic mark? Mutat Res, v.647, n.1-2, Dec 1, p.39-43. 2008.

Diaz-Toledano, R., A. Ariza-Mateos, *et al.* In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. Nucleic Acids Res, v.37, n.16, Sep, p.5498-510. 2009.

Diederichs, S. e D. A. Haber. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. Cancer Res, v.66, n.12, Jun 15, p.6097-104. 2006.

_____. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. Cell, v.131, n.6, Dec 14, p.1097-108. 2007.

Doench, J. G., C. P. Petersen, *et al.* siRNAs can function as miRNAs. Genes Dev, v.17, n.4, Feb 15, p.438-42. 2003.

Doench, J. G. e P. A. Sharp. Specificity of microRNA target selection in translational repression. Genes Dev, v.18, n.5, Mar 1, p.504-11. 2004.

Druker, B. J., S. Tamura, *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med, v.2, n.5, May, p.561-6. 1996.

Duran, N., M. Haun. Processo de produção, obtenção, purificação e atividade antitumoral de 3-[1,2-diidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-diidro-2H-indol-2-ona. Patente Bras. PIBr. 9702918. 1997.

Duran, N., G. Z. Justo, *et al.* Violacein: properties and biological activities. Biotechnol Appl Biochem, v.48, n.Pt 3, Nov, p.127-33. 2007.

Duran, N. e C. F. Menck. Chromobacterium violaceum: a review of pharmacological and industrial perspectives. Crit Rev Microbiol, v.27, n.3, p.201-22. 2001.

Duran, M., A.N. Ponezi, *et al.* Potential applications of violacein: a microbial pigment. Medicinal Chemistry Research, v.3, p.245-54. 2011.

Duursma, A. M., M. Kedde, *et al.* miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. Rna, v.14, n.5, May, p.872-7. 2008.

Eddy, S. R. How do RNA folding algorithms work? Nat Biotechnol, v.22, n.11, Nov, p.1457-8. 2004.

Elmaagacli, A. H., D. W. Beelen, *et al.* The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. Ann Hematol, v.79, n.8, Aug, p.424-31. 2000.

Elton, T. S., M. Khan, *et al.* MicroRNAs in cardiovascular disease. F1000 Med Rep, v.3, p.10.

Esquela-Kerscher, A. e F. J. Slack. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer, v.6, n.4, Apr, p.259-69. 2006.

Esteller, M. e G. Almouzni. How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. EMBO Rep, v.6, n.7, Jul, p.624-8. 2005.

Esteller, M., P. G. Corn, *et al.* A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Res, v.61, n.8, Apr 15, p.3225-9. 2001.

Esteller, M. e J. G. Herman. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol, v.196, n.1, Jan, p.1-7. 2002.

Evans, M. J. e M. H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, v.292, n.5819, Jul 9, p.154-6. 1981.

Fabbri, M., R. Garzon, *et al.* MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.40, Oct 2, p.15805-10. 2007.

Feinberg, A. P., R. Ohlsson, *et al.* The epigenetic progenitor origin of human cancer. Nat Rev Genet, v.7, n.1, Jan, p.21-33. 2006.

Feng, Q. e Y. Zhang. The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. Genes Dev, v.15, n.7, Apr 1, p.827-32. 2001.

Feng, S., S. E. Jacobsen, *et al.* Epigenetic reprogramming in plant and animal development. Science, v.330, n.6004, Oct 29, p.622-7.

Ferreira, C. V., C. L. Bos, *et al.* Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. Blood, v.104, n.5, Sep 1, p.1459-64. 2004.

Figuerola, M. E., S. Lugthart, *et al.* DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. Cancer Cell, v.17, n.1, Jan 19, p.13-27.

Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, *et al.* Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet, v.9, n.2, Feb, p.102-14. 2008.

Forstemann, K., Y. Tomari, *et al.* Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. PLoS Biol, v.3, n.7, Jul, p.e236. 2005.

Fraga, A. M., M. Sukoyan, *et al.* Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. Cell Transplant, v.20, n.3, p.431-40.

Friedman, R. C., K. K. Farh, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res, v.19, n.1, Jan, p.92-105. 2009.

Fuks, F., P. J. Hurd, *et al.* The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. Nucleic Acids Res, v.31, n.9, May 1, p.2305-12. 2003.

Gaidatzis, D., E. Van Nimwegen, *et al.* Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. BMC Bioinformatics, v.8, p.69. 2007.

Gaiger, A., T. Henn, *et al.* Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. Blood, v.86, n.6, Sep 15, p.2371-8. 1995.

Gangaraju, V. K. e H. Lin. MicroRNAs: key regulators of stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol, v.10, n.2, Feb, p.116-25. 2009.

Ganguly, S. S., L. S. Fiore, *et al.* c-Abl and Arg are activated in human primary melanomas, promote melanoma cell invasion via distinct pathways, and drive metastatic progression. Oncogene, Sep 5.

Garzon, R., S. Liu, *et al.* MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. Blood, v.113, n.25, Jun 18, p.6411-8. 2009.

Gaudet, F., J. G. Hodgson, *et al.* Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science, v.300, n.5618, Apr 18, p.489-92. 2003.

Georgantas, R. W., 3rd, R. Hildreth, *et al.* CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.8, Feb 20, p.2750-5. 2007.

Ghosh, Z., J. Chakrabarti, *et al.* miRNomics-The bioinformatics of microRNA genes. Biochem Biophys Res Commun, v.363, n.1, Nov 9, p.6-11. 2007.

Ghoshal, K., J. Datta, *et al.* 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. Mol Cell Biol, v.25, n.11, Jun, p.4727-41. 2005.

Gidekel, S. e Y. Bergman. A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. J Biol Chem, v.277, n.37, Sep 13, p.34521-30. 2002.

Girault, I., S. Tozlu, *et al.* Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. Clin Cancer Res, v.9, n.12, Oct 1, p.4415-22. 2003.

Goll, M. G., F. Kirpekar, *et al.* Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. Science, v.311, n.5759, Jan 20, p.395-8. 2006.

Gore, A., Z. Li, *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature, v.471, n.7336, Mar 3, p.63-7.

Gowher, H. e A. Jeltsch. Molecular enzymology of the catalytic domains of the

Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. J Biol Chem, v.277, n.23, Jun 7, p.20409-14. 2002.

Grady, W. M., R. K. Parkin, *et al.* Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. Oncogene, v.27, n.27, Jun 19, p.3880-8. 2008.

Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, *et al.* Melanoma biology and new targeted therapy. Nature, v.445, n.7130, Feb 22, p.851-7. 2007.

Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res, v.36, n.Database issue, Jan, p.D154-8. 2008.

Grimson, A., K. K. Farh, *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol Cell, v.27, n.1, Jul 6, p.91-105. 2007.

Groffen, J. e N. C. Heisterkamp. Philadelphia chromosome translocation. Crit Rev Oncog, v.1, n.1, p.53-64. 1989.

Gros, P., J. Croop, *et al.* Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.2, Jan, p.337-41. 1986.

Guo, J. Q., J. Y. Wang, *et al.* Detection of BCR-ABL proteins in blood cells of benign phase chronic myelogenous leukemia patients. Cancer Res, v.51, n.11, Jun 1, p.3048-51. 1991.

Guy, J., B. Hendrich, *et al.* A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. Nat Genet, v.27, n.3, Mar, p.322-6. 2001.

Han, J., Y. Lee, *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev, v.18, n.24, Dec 15, p.3016-27. 2004.

Hata, K., M. Okano, *et al.* Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. Development, v.129, n.8, Apr, p.1983-93. 2002.

Hayashita, Y., H. Osada, *et al.* A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res, v.65, n.21, Nov 1, p.9628-32. 2005.

He, L., J. M. Thomson, *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature, v.435, n.7043, Jun 9, p.828-33. 2005.

Heard, E., C. Rougeulle, *et al.* Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. Cell, v.107, n.6, Dec 14, p.727-38. 2001.

Hendrich, B. e A. Bird. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol Cell Biol, v.18, n.11, Nov, p.6538-47. 1998.

Herman, J. G., C. I. Civin, *et al.* Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. Cancer Res, v.57, n.5, Mar 1, p.837-41. 1997.

Hermann, A., H. Gowher, *et al.* Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. Cell Mol Life Sci, v.61, n.19-20, Oct, p.2571-87. 2004.

Hodgson, S., W. Foulkes, *et al.* A Practical Guide to Human Genetics. 3rd edition. Cambridge University Press. 1993.

Hossain, A., M. T. Kuo, *et al.* Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. Mol Cell Biol, v.26, n.21, Nov, p.8191-201. 2006.

Houbaviy, H. B., M. F. Murray, *et al.* Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. Dev Cell, v.5, n.2, Aug, p.351-8. 2003.

Howlader, N., L. A. Ries, *et al.* Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. J Natl Cancer Inst, v.102, n.20, Oct 20, p.1584-98.

Huangfu, D., R. Maehr, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nat Biotechnol, v.26, n.7, Jul, p.795-7. 2008.

Hussein, S. M., N. N. Batada, *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. Nature, v.471, n.7336, Mar 3, p.58-62.

_____. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. Nature, v.471, n.7336, Mar 3, p.58-62.

Issa, J. P., B. A. Zehnbaauer, *et al.* The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. Cancer Res, v.56, n.5, Mar 1, p.973-77. 1996.

_____. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. Cancer Res, v.57, n.9, May 1, p.1678-81. 1997.

Jacob, F. e J. Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J Mol Biol, v.3, Jun, p.318-56. 1961.

Jain, N., A. Rossi, *et al.* Epigenetic therapy of leukemia: An update. Int J Biochem Cell Biol, v.41, n.1, Jan, p.72-80. 2009.

Jeanpierre, M., C. Turleau, *et al.* An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. Hum Mol Genet, v.2, n.6, Jun, p.731-5. 1993.

Jin, H., W. Tuo, *et al.* Strategies to identify microRNA targets: new advances. N Biotechnol, v.27, n.6, Dec 31, p.734-8.

Johnson, S. M., H. Grosshans, *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell, v.120, n.5, Mar 11, p.635-47. 2005.

Jones, P. A. e S. B. Baylin. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet, v.3, n.6, Jun, p.415-28. 2002.

_____. The epigenomics of cancer. Cell, v.128, n.4, Feb 23, p.683-92. 2007.

Jones, P. A. e G. Liang. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. Nat Rev Genet, v.10, n.11, Nov, p.805-11. 2009.

Jones, P. A. e D. Takai. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science, v.293, n.5532, Aug 10, p.1068-70. 2001.

Jones, P. L., G. J. Veenstra, *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nat Genet, v.19, n.2, Jun, p.187-91. 1998.

Judson, R. L., J. E. Babiarz, *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. Nat Biotechnol, v.27, n.5, May, p.459-61. 2009.

Jun, H. J., S. Woolfenden, *et al.* Epigenetic regulation of c-ROS receptor tyrosine kinase expression in malignant gliomas. Cancer Res, v.69, n.6, Mar 15, p.2180-4. 2009.

Kafri, T., M. Ariel, *et al.* Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. Genes Dev, v.6, n.5, May, p.705-14. 1992.

Kanellopoulou, C., S. A. Muljo, *et al.* Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes Dev, v.19, n.4, Feb 15, p.489-501. 2005.

Kantor, B., K. Makedonski, *et al.* Expression and localization of components of the histone deacetylases multiprotein repressory complexes in the mouse preimplantation embryo. Gene Expr Patterns, v.3, n.6, Dec, p.697-702. 2003.

Kertesz, M., N. Iovino, *et al.* The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat Genet, v.39, n.10, Oct, p.1278-84. 2007.

Khvorova, A., A. Reynolds, *et al.* Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell, v.115, n.2, Oct 17, p.209-16. 2003.

Kim, D., C. H. Kim, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell, v.4, n.6, Jun 5, p.472-6. 2009.

Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.5, May, p.376-85. 2005.

Kim, Y. K. e V. N. Kim. Processing of intronic microRNAs. Embo J, v.26, n.3, Feb 7, p.775-83. 2007.

Kimmins, S. e P. Sassone-Corsi. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. Nature, v.434, n.7033, Mar 31, p.583-9. 2005.

Kimura, H. e K. Shiota. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. J Biol Chem, v.278, n.7, Feb 14, p.4806-12. 2003.

Klose, R. J. e A. P. Bird. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci, v.31, n.2, Feb, p.89-97. 2006.

Kn, H., S. Bassal, *et al.* Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). Cancer Biol Ther, v.3, n.10, Oct, p.989-94. 2004.

Kodach, L. L., C. L. Bos, *et al.* Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. Carcinogenesis, v.27, n.3, Mar, p.508-16. 2006.

Kong, L. J., A. R. Meloni, *et al.* The Rb-related p130 protein controls telomere lengthening through an interaction with a Rad50-interacting protein, RINT-1. Mol Cell, v.22, n.1, Apr 7, p.63-71. 2006.

Konzen, M., D. De Marco, *et al.* Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. Bioorg Med Chem, v.14, n.24, Dec 15, p.8307-13. 2006.

Koralov, S. B., S. A. Muljo, *et al.* Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. Cell, v.132, n.5, Mar 7, p.860-74. 2008.

Kourmouli, N., P. Jeppesen, *et al.* Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. J Cell Sci, v.117, n.Pt 12, May 15, p.2491-501. 2004.

Kozaki, K., I. Imoto, *et al.* Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Cancer Res, v.68, n.7, Apr 1, p.2094-105. 2008.

Kremenskoy, M., Y. Kremenska, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation status of CpG islands in embryoid bodies, teratomas, and fetuses. Biochem Biophys Res Commun, v.311, n.4, Nov 28, p.884-90. 2003.

Kriaucionis, S. e A. Bird. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. Nucleic Acids Res, v.32, n.5, p.1818-23. 2004.

Kuo, H. K., J. D. Griffith, *et al.* 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication in vivo. Cancer Res, v.67, n.17, Sep 1, p.8248-54. 2007.

Kurzrock, R., J. U. Gutterman, *et al.* The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med, v.319, n.15, Oct 13, p.990-8. 1988.

Kurzrock, R., M. Shtalrid, *et al.* Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia. Blood, v.70, n.5, Nov, p.1584-8. 1987.

La Salle, S. e J. M. Trasler. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. Dev Biol, v.296, n.1, Aug 1, p.71-82. 2006.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.853-8. 2001.

_____. New microRNAs from mouse and human. Rna, v.9, n.2, Feb, p.175-9. 2003.

Lai, E. C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. Nat Genet, v.30, n.4, Apr, p.363-4. 2002.

Lan, J., S. Hua, *et al.* DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), v.42, n.4, Apr, p.243-52.

Lander, E. S., L. M. Linton, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, v.409, n.6822, Feb 15, p.860-921. 2001.

Landthaler, M., A. Yalcin, *et al.* The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. Curr Biol, v.14, n.23, Dec 14, p.2162-7. 2004.

Lanotte, M., J. B. Riviere, *et al.* Programmed cell death (apoptosis) is induced rapidly and with positive cooperativity by activation of cyclic adenosine monophosphate-kinase I in a myeloid leukemia cell line. J Cell Physiol, v.146, n.1, Jan, p.73-80. 1991.

Lau, N. C., L. P. Lim, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.858-62. 2001.

Le Beau, M. M., R. Espinosa, 3rd, *et al.* Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases. Blood, v.88, n.6, Sep 15, p.1930-5. 1996.

Lee, R. C. e V. Ambros. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science, v.294, n.5543, Oct 26, p.862-4. 2001.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, *et al.* The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, v.75, n.5, Dec 3, p.843-54. 1993.

Lee, Y., C. Ahn, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature, v.425, n.6956, Sep 25, p.415-9. 2003.

Lee, Y., M. Kim, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. Embo J, v.23, n.20, Oct 13, p.4051-60. 2004.

Lee, Y. S. e A. Dutta. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol, v.4, p.199-227. 2009.

Leeb, C., M. Jurga, *et al.* New perspectives in stem cell research: beyond embryonic stem cells. Cell Prolif, v.44 Suppl 1, Apr, p.9-14.

_____. Promising new sources for pluripotent stem cells. Stem Cell Rev, v.6, n.1, Mar, p.15-26.

Lehmann, U., B. Hasemeier, *et al.* Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. J Pathol, v.214, n.1, Jan, p.17-24. 2008.

Lehnertz, B., Y. Ueda, *et al.* Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. Curr Biol, v.13, n.14, Jul 15, p.1192-200. 2003.

Lena, A. M., R. Shalom-Feuerstein, *et al.* miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. Cell Death Differ, v.15, n.7, Jul, p.1187-95. 2008.

Leon, L. L., C. C. Miranda, *et al.* Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. J Antimicrob Chemother, v.48, n.3, Sep, p.449-50. 2001.

Leone, G., J. Degregori, *et al.* Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. Nature, v.387, n.6631, May 22, p.422-6. 1997.

Lepikhov, K. e J. Walter. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. BMC Dev Biol, v.4, Sep 21, p.12. 2004.

Lewis, B. P., C. B. Burge, *et al.* Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell, v.120, n.1, Jan 14, p.15-20. 2005.

Lewis, B. P., I. H. Shih, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. Cell, v.115, n.7, Dec 26, p.787-98. 2003.

Ley, T. J., L. Ding, *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med, v.363, n.25, Dec 16, p.2424-33.

Li, E., C. Beard, *et al.* Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature, v.366, n.6453, Nov 25, p.362-5. 1993.

Li, E., T. H. Bestor, *et al.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell, v.69, n.6, Jun 12, p.915-26. 1992.

Lichstein, H. C. e V. A. N. D. S. Vf. The antibiotic activity of violacein, prodigiosin, and phthiocoumarin. J Bacteriol, v.52, Jul, p.145. 1946.

Lim, L. P., N. C. Lau, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature, v.433, n.7027, Feb 17, p.769-73. 2005.

Lin, F., F. Van Rhee, *et al.* Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. Blood, v.87, n.10, May 15, p.4473-8. 1996.

Lin, K., M. A. Glenn, *et al.* c-Abl expression in chronic lymphocytic leukemia cells: clinical and therapeutic implications. Cancer Res, v.66, n.15, Aug 1, p.7801-9. 2006.

Lister, R., M. Pelizzola, *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature, v.471, n.7336, Mar 3, p.68-73.

Liu, J., M. A. Carmell, *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science, v.305, n.5689, Sep 3, p.1437-41. 2004.

Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, *et al.* MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. Nat Cell Biol, v.7, n.7, Jul, p.719-23. 2005.

Liu, J., Y. Wu, *et al.* Sequences within the first exon of BCR inhibit the activated tyrosine kinases of c-Abl and the Bcr-Abl oncoprotein. Cancer Res, v.56, n.22, Nov 15, p.5120-4. 1996.

Llave, C., Z. Xie, *et al.* Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. Science, v.297, n.5589, Sep 20, p.2053-6. 2002.

Long, D., R. Lee, *et al.* Potent effect of target structure on microRNA function. Nat Struct Mol Biol, v.14, n.4, Apr, p.287-94. 2007.

Lopes, S. C., Y. C. Blanco, *et al.* Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits *Plasmodium* growth in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother, v.53, n.5, May, p.2149-52. 2009.

Lozzio, B. B. e C. B. Lozzio. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. Int J Cancer, v.19, n.1, Jan, p.136. 1977.

Lu, J., G. Getz, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature, v.435, n.7043, Jun 9, p.834-8. 2005.

Lu, J., M. L. He, *et al.* MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. Cancer Res, v.71, n.1, Jan 1, p.225-33.

Lu, Y., J. M. Thomson, *et al.* Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. Dev Biol, v.310, n.2, Oct 15, p.442-53. 2007.

_____. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. Dev Biol, v.310, n.2, Oct 15, p.442-53. 2007.

Lujambio, A., S. Ropero, *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. Cancer Res, v.67, n.4, Feb 15, p.1424-9. 2007.

Lund, E., S. Guttinger, *et al.* Nuclear export of microRNA precursors. Science, v.303, n.5654, Jan 2, p.95-8. 2004.

Luszczek, W., V. Cheriya, *et al.* Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. Mol Cancer Ther, v.9, n.8, Aug, p.2309-21.

Luzi, E., F. Marini, *et al.* Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. J Bone Miner Res, v.23, n.2, Feb, p.287-95. 2008.

Macleod, D., J. Charlton, *et al.* Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. Genes Dev, v.8, n.19, Oct 1, p.2282-92. 1994.

Maia, R. C., E. A. Silva, *et al.* Sensitivity of vincristine-sensitive K562 and vincristine-resistant K562-Lucena 1 cells to anthracyclines and reversal of multidrug resistance. Braz J Med Biol Res, v.29, n.4, Apr, p.467-72. 1996.

Margot, J. B., A. E. Ehrenhofer-Murray, *et al.* Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. BMC Mol Biol, v.4, May 30, p.7. 2003.

Martin Caballero, I., J. Hansen, *et al.* The methyl-CpG binding proteins Mecp2, Mbd2 and Kaiso are dispensable for mouse embryogenesis, but play a redundant function in neural differentiation. PLoS One, v.4, n.1, p.e4315. 2009.

Maselli, V., D. Di Bernardo, *et al.* CoGemiR: a comparative genomics microRNA database. BMC Genomics, v.9, p.457. 2008.

Matarazzo, M. R., M. L. De Bonis, *et al.* Lessons from two human chromatin diseases, ICF syndrome and Rett syndrome. Int J Biochem Cell Biol, v.41, n.1, Jan, p.117-26. 2009.

Matsumura, I., H. Tanaka, *et al.* E2F1 and c-Myc in cell growth and death. Cell Cycle, v.2, n.4, Jul-Aug, p.333-8. 2003.

May, G., B. Brummer, *et al.* Purification of the antiviral compound violacein from cultures of *Chromobacterium*. Ger Offen DE 3935066. 1991.

Mayer, W., A. Niveleau, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. Nature, v.403, n.6769, Feb 3, p.501-2. 2000.

Mayr, C., M. T. Hemann, *et al.* Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. Science, v.315, n.5818, Mar 16, p.1576-9. 2007.

Mayshar, Y., U. Ben-David, *et al.* Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell, v.7, n.4, Oct 8, p.521-31.

Meister, G., M. Landthaler, *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. Mol Cell, v.15, n.2, Jul 23, p.185-97. 2004.

Melki, J. R., P. C. Vincent, *et al.* Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. Blood, v.95, n.10, May 15, p.3208-13. 2000.

Melo, P. S., G. Z. Justo, *et al.* Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. Toxicology, v.186, n.3, Apr 22, p.217-25. 2003.

Meng, F., H. Wehbe-Janek, *et al.* Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. Oncogene, v.27, n.3, Jan 10, p.378-86. 2008.

Mi, S., J. Lu, *et al.* MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.50, Dec 11, p.19971-6. 2007.

Mikkelsen, T. S., J. Hanna, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature, v.454, n.7200, Jul 3, p.49-55. 2008.

Miyoshi, N., H. Ishii, *et al.* Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. Cell Stem Cell, v.8, n.6, Jun 3, p.633-8.

Mizuno, S., T. Chijiwa, *et al.* Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood, v.97, n.5, Mar 1, p.1172-9. 2001.

Molognoni, F., A. T. Cruz, *et al.* Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. Epigenetics, v.6, n.4, Apr, p.450-64.

Momparler, R. L., L. F. Momparler, *et al.* Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. Leuk Res, v.8, n.6, p.1043-9. 1984.

Monk, M., M. Boubelik, *et al.* Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. Development, v.99, n.3, Mar, p.371-82. 1987.

Morlando, M., M. Ballarino, *et al.* Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. Nat Struct Mol Biol, v.15, n.9, Sep, p.902-9. 2008.

Moss, E. G., R. C. Lee, *et al.* The cold shock domain protein LIN-28 controls

developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. Cell, v.88, n.5, Mar 7, p.637-46. 1997.

Mott, J. L., S. Kobayashi, *et al.* *mir-29* regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene, v.26, n.42, Sep 13, p.6133-40. 2007.

_____. *mir-29* regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene, v.26, n.42, Sep 13, p.6133-40. 2007.

Nagar, B., O. Hantschel, *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. Cell, v.112, n.6, Mar 21, p.859-71. 2003.

Nakagawa, M., M. Koyanagi, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol, v.26, n.1, Jan, p.101-6. 2008.

Nakamura, Y., C. Asada, *et al.* Production of Antibacterial Violet Pigment by Psychrotropic Bacterium RT102 Strain. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v.8, p.37-40. 2003.

Nan, X., H. H. Ng, *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature, v.393, n.6683, May 28, p.386-9. 1998.

Ng, H. H. e A. Bird. Histone deacetylases: silencers for hire. Trends Biochem Sci, v.25, n.3, Mar, p.121-6. 2000.

Nichols, J., B. Zevnik, *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell, v.95, n.3, Oct 30, p.379-91. 1998.

Nicolas, F. E. Experimental validation of microRNA targets using a luciferase reporter system. Methods Mol Biol, v.732, p.139-52.

Niwa, H., J. Miyazaki, *et al.* Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet, v.24, n.4, Apr, p.372-6. 2000.

Nuber, U. A., S. Kriaucionis, *et al.* Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. Hum Mol Genet, v.14, n.15, Aug 1, p.2247-56. 2005.

Oba-Shinjo, S. M., M. Correa, *et al.* Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. Neoplasia, v.8, n.3, Mar, p.231-41. 2006.

O'donnell, K. A., E. A. Wentzel, *et al.* c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature, v.435, n.7043, Jun 9, p.839-43. 2005.

Okamura, K., J. W. Hagen, *et al.* The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. Cell, v.130, n.1, Jul 13, p.89-100. 2007.

Okamura, K., A. Ishizuka, *et al.* Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. Genes Dev, v.18, n.14, Jul 15, p.1655-66. 2004.

Okano, M., D. W. Bell, *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell, v.99, n.3, Oct 29, p.247-57. 1999.

Okano, M., S. Xie, *et al.* Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet, v.19, n.3, Jul, p.219-20. 1998.

Okita, K., M. Nakagawa, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science, v.322, n.5903, Nov 7, p.949-53. 2008.

Olena, A. F. e J. G. Patton. Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol, v.222, n.3, Mar, p.540-5.

Ooi, S. K., C. Qiu, *et al.* DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. Nature, v.448, n.7154, Aug 9, p.714-7. 2007.

Orom, U. A. e A. H. Lund. Experimental identification of microRNA targets. Gene, v.451, n.1-2, Feb 1, p.1-5.

Orom, U. A., F. C. Nielsen, *et al.* MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. Mol Cell, v.30, n.4, May 23, p.460-71. 2008.

Oswald, J., S. Engemann, *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. Curr Biol, v.10, n.8, Apr 20, p.475-8. 2000.

Ota, A., H. Tagawa, *et al.* Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. Cancer Res, v.64, n.9, May 1, p.3087-95. 2004.

Pane, F., F. Frigeri, *et al.* Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). Blood, v.88, n.7, Oct 1, p.2410-4. 1996.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature, v.408, n.6808, Nov 2, p.86-9. 2000.

Patra, S. K., A. Patra, *et al.* DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. Mol Carcinog, v.33, n.3, Mar, p.163-71. 2002.

Pavlidis, N. e K. Fizazi. Cancer of unknown primary (CUP). Crit Rev Oncol Hematol, v.54, n.3, Jun, p.243-50. 2005.

Pekarsky, Y., U. Santanam, *et al.* Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. Cancer Res, v.66, n.24, Dec 15, p.11590-3. 2006.

Peters, A. H., J. E. Mermoud, *et al.* Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. Nat Genet, v.30, n.1, Jan, p.77-80. 2002.

Peters, L. e G. Meister. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. Mol Cell, v.26, n.5, Jun 8, p.611-23. 2007.

Pfeifer, G. P., S. Steigerwald, *et al.* DNA methylation levels in acute human leukemia. Cancer Lett, v.39, n.2, Mar, p.185-92. 1988.

Pruss, D., J. J. Hayes, *et al.* Nucleosomal anatomy--where are the histones? Bioessays, v.17, n.2, Feb, p.161-70. 1995.

Pui, C. H., J. R. Kane, *et al.* Biology and treatment of infant leukemias. Leukemia, v.9, n.5, May, p.762-9. 1995.

Rajewsky, N. microRNA target predictions in animals. Nat Genet, v.38 Suppl, Jun, p.S8-13. 2006.

Raza, A., M. Mehdi, *et al.* Combination of 5-azacytidine and thalidomide for the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. Cancer, v.113, n.7, Oct 1, p.1596-604. 2008.

Reichwald, K., J. Thiesen, *et al.* Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. Mamm Genome, v.11, n.3, Mar, p.182-90. 2000.

Reinhart, B. J., F. J. Slack, *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v.403, n.6772, Feb 24, p.901-6. 2000.

Ren, J., B. N. Singh, *et al.* DNA hypermethylation as a chemotherapy target. Cell Signal, v.23, n.7, Jul, p.1082-93.

Rhoades, M. W., B. J. Reinhart, *et al.* Prediction of plant microRNA targets. Cell, v.110, n.4, Aug 23, p.513-20. 2002.

Robertson, K. D. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. Oncogene, v.21, n.35, Aug 12, p.5361-79. 2002.

Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, *et al.* Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res, v.14, n.10A, Oct, p.1902-10. 2004.

Rowley, J. D. Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. N Engl J Med, v.289, n.4, Jul 26, p.220-1. 1973.

Ruby, J. G., C. Jan, *et al.* Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. Cell, v.127, n.6, Dec 15, p.1193-207. 2006.

Ruby, J. G., C. H. Jan, *et al.* Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature, v.448, n.7149, Jul 5, p.83-6. 2007.

Rumjanek, V. M., G. S. Trindade, *et al.* Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc, v.73, n.1, Mar, p.57-69. 2001.

Saito, K., A. Ishizuka, *et al.* Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. PLoS Biol, v.3, n.7, Jul, p.e235. 2005.

Saito, T. e P. Saetrom. MicroRNAs--targeting and target prediction. N Biotechnol, v.27, n.3, Jul 31, p.243-9.

Saito, Y., G. Liang, *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell, v.9, n.6, Jun, p.435-43. 2006.

Sakai, Y., I. Suetake, *et al.* Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. Gene Expr Patterns, v.5, n.2, Dec, p.231-7. 2004.

Santi, D. V., A. Norment, *et al.* Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.22, Nov, p.6993-7. 1984.

Santos, F., A. H. Peters, *et al.* Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. Dev Biol, v.280, n.1, Apr 1, p.225-36. 2005.

Sato, F., S. Tsuchiya, *et al.* MicroRNAs and epigenetics. Febs J, v.278, n.10, May, p.1598-609.

Sato, M., Y. Horio, *et al.* The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. Oncogene, v.21, n.31, Jul 18, p.4822-9. 2002.

Sawyers, C. L. Chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, v.340, n.17, Apr 29, p.1330-40. 1999.

Sawyers, C. L., J. McLaughlin, *et al.* The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. Cell, v.77, n.1, Apr 8, p.121-31. 1994.

Schatton, T. e M. H. Frank. Cancer stem cells and human malignant melanoma. Pigment Cell Melanoma Res, v.21, n.1, Feb, p.39-55. 2008.

Schindler, T., W. Bornmann, *et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of

- abelson tyrosine kinase. Science, v.289, n.5486, Sep 15, p.1938-42. 2000.
- Scholer, H. R., G. R. Dressler, *et al.* Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. Embo J, v.9, n.7, Jul, p.2185-95. 1990.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell, v.115, n.2, Oct 17, p.199-208. 2003.
- Scott, G. K., M. D. Mattie, *et al.* Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. Cancer Res, v.66, n.3, Feb 1, p.1277-81. 2006.
- Seedhouse, C. H., E. P. Das-Gupta, *et al.* Methylation of the hMLH1 promoter and its association with microsatellite instability in acute myeloid leukemia. Leukemia, v.17, n.1, Jan, p.83-8. 2003.
- Sethupathy, P., M. Megraw, *et al.* A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. Nat Methods, v.3, n.11, Nov, p.881-6. 2006.
- Shahbazian, M. D., B. Antalffy, *et al.* Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. Hum Mol Genet, v.11, n.2, Jan 15, p.115-24. 2002.
- Shi, L. e J. Wu. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. Reprod Biol Endocrinol, v.7, p.59. 2009.
- Shi, Y., C. Desponts, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. Cell Stem Cell, v.3, n.5, Nov 6, p.568-74. 2008.
- Shirata, A., T. Tsukamoto, *et al.* Production of bluish-purple pigments by *Janthinobacterium lividum* isolated from the raw silk and dyeing with them. J. Sericult. Sci, v.66, p.377-85. 1997.
- Shtalrid, M., M. Talpaz, *et al.* Philadelphia-negative chronic myelogenous leukemia with breakpoint cluster region rearrangement: molecular analysis, clinical characteristics, and response to therapy. J Clin Oncol, v.6, n.10, Oct, p.1569-75. 1988.
- Shu, X. O., J. A. Ross, *et al.* Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Childrens Cancer Group study. J Natl Cancer Inst, v.88, n.1, Jan 3, p.24-31. 1996.
- Silverman, L. R., E. P. Demakos, *et al.* Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. J Clin Oncol, v.20, n.10, May 15, p.2429-40. 2002.
- Silverman, L. R., D. R. McKenzie, *et al.* Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. J Clin Oncol, v.24, n.24, Aug 20, p.3895-903. 2006.

Sinkkonen, L., T. Hugenschmidt, *et al.* MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. Nat Struct Mol Biol, v.15, n.3, Mar, p.259-67. 2008.

Sjoblom, T., S. Jones, *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science, v.314, n.5797, Oct 13, p.268-74. 2006.

Sokol, N. S., P. Xu, *et al.* Drosophila let-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. Genes Dev, v.22, n.12, Jun 15, p.1591-6. 2008.

Speck, B., M. M. Bortin, *et al.* Allogeneic bone-marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. Lancet, v.1, n.8378, Mar 24, p.665-8. 1984.

Stadtfield, M., M. Nagaya, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science, v.322, n.5903, Nov 7, p.945-9. 2008.

Stam, R. W., M. L. Den Boer, *et al.* Towards targeted therapy for infant acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol, v.132, n.5, Mar, p.539-51. 2006.

Stankov, K., G. Bogdanovic, *et al.* Expression analysis of genes involved in epigenetic regulation and apoptosis in human malignant haematopoietic cell lines treated with 5-azacytidine. J Buon, v.16, n.1, Jan-Mar, p.116-22.

Stark, A., J. Brennecke, *et al.* Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. Cell, v.123, n.6, Dec 16, p.1133-46. 2005.

Straussman, R., D. Nejman, *et al.* Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. Nat Struct Mol Biol, v.16, n.5, May, p.564-71. 2009.

Stresemann, C., B. Brueckner, *et al.* Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. Cancer Res, v.66, n.5, Mar 1, p.2794-800. 2006.

Stresemann, C. e F. Lyko. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer, v.123, n.1, Jul 1, p.8-13. 2008.

Sudan, N., J. M. Rossetti, *et al.* Treatment of acute myelogenous leukemia with outpatient azacitidine. Cancer, v.107, n.8, Oct 15, p.1839-43. 2006.

Suh, M. R., Y. Lee, *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Dev Biol, v.270, n.2, Jun 15, p.488-98. 2004.

Sumi, T., N. Tsuneyoshi, *et al.* Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. Oncogene, v.26, n.38, Aug 16, p.5564-76. 2007.

Takada, S., E. Berezikov, *et al.* Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a

and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. Rna, v.15, n.8, Aug, p.1507-14. 2009.

Takahashi, K., K. Tanabe, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, v.131, n.5, Nov 30, p.861-72. 2007.

Takahashi, K. e S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, v.126, n.4, Aug 25, p.663-76. 2006.

Takamizawa, J., H. Konishi, *et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res, v.64, n.11, Jun 1, p.3753-6. 2004.

Thomas, M., J. Lieberman, *et al.* Desperately seeking microRNA targets. Nat Struct Mol Biol, v.17, n.10, Oct, p.1169-74.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, v.282, n.5391, Nov 6, p.1145-7. 1998.

Trindade, G. S., M. A. Capella, *et al.* Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. Photochem Photobiol, v.69, n.6, Jun, p.694-9. 1999.

Tudor, M., S. Akbarian, *et al.* Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.24, Nov 26, p.15536-41. 2002.

Van Etten, R. A. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. Trends Cell Biol, v.9, n.5, May, p.179-86. 1999.

Van Rooij, E. The art of microRNA research. Circ Res, v.108, n.2, Jan 21, p.219-34.

Vasques, L.R., C.R.G. Schoof, *et al.* MicroRNAs: a new paradigm for gene regulation, in: Gupta, V.K., Sharma, P., Gaur, R.K., Gafni, Y. (Eds.), RNAi Technology. Science Publishers, Enfield. pp. 133-152. 2011.

Vasudevan, S., Y. Tong, *et al.* Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science, v.318, n.5858, Dec 21, p.1931-4. 2007.

Vaz, C., H. M. Ahmad, *et al.* Analysis of microRNA transcriptome by deep sequencing of small RNA libraries of peripheral blood. BMC Genomics, v.11, p.288.

Venter, J. C., M. D. Adams, *et al.* The sequence of the human genome. Science, v.291, n.5507, Feb 16, p.1304-51. 2001.

Ventura, A., A. G. Young, *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. Cell, v.132, n.5, Mar 7, p.875-86. 2008.

_____. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. Cell, v.132, n.5, Mar 7, p.875-86. 2008.

Venturini, L., K. Battmer, *et al.* Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. Blood, v.109, n.10, May 15, p.4399-405. 2007.

Vesely, J. e A. Cihak. Incorporation of a potent antileukemic agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, into DNA of cells from leukemic mice. Cancer Res, v.37, n.10, Oct, p.3684-9. 1977.

Viticchie, G., A. M. Lena, *et al.* MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. Cell Cycle, v.10, n.7, Apr 1, p.1121-31.

Voso, M. T., A. Scardocci, *et al.* Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. Blood, v.103, n.2, Jan 15, p.698-700. 2004.

Walsh, C. P., J. R. Chaillet, *et al.* Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. Nat Genet, v.20, n.2, Oct, p.116-7. 1998.

Wang, H., R. Garzon, *et al.* NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. Cancer Cell, v.14, n.5, Nov 4, p.369-81. 2008.

Wang, J. Y. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. Oncogene, v.19, n.49, Nov 20, p.5643-50. 2000.

Wang, Y., S. Baskerville, *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. Nat Genet, v.40, n.12, Dec, p.1478-83. 2008.

Warrell, R. P., Jr. Arsenicals and inhibitors of histone deacetylase as anticancer therapy. Haematologica, v.84 Suppl EHA-4, Jun, p.75-7. 1999.

Warrell, R. P., Jr., L. Z. He, *et al.* Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. J Natl Cancer Inst, v.90, n.21, Nov 4, p.1621-5. 1998.

Watanabe, D., I. Suetake, *et al.* Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. Mech Dev, v.118, n.1-2, Oct, p.187-90. 2002.

Watt, F. e P. L. Molloy. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. Genes Dev, v.2, n.9, Sep, p.1136-43. 1988.

Weber, B., C. Stresemann, *et al.* Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. Cell Cycle, v.6, n.9, May 2, p.1001-5. 2007.

Weber, M., J. J. Davies, *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nat Genet, v.37, n.8, Aug, p.853-62. 2005.

Weisenberger, D. J., M. Velicescu, *et al.* Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. Mol Cancer Res, v.2, n.1, Jan, p.62-72. 2004.

Wernig, M., A. Meissner, *et al.* c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell, v.2, n.1, Jan 10, p.10-2. 2008.

Widschwendter, M., G. Jiang, *et al.* DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. Cancer Res, v.64, n.13, Jul 1, p.4472-80. 2004.

Wightman, B., I. Ha, *et al.* Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell, v.75, n.5, Dec 3, p.855-62. 1993.

Williams, A. E., S. A. Moschos, *et al.* Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. Dev Dyn, v.236, n.2, Feb, p.572-80. 2007.

Winbanks, C. E., B. Wang, *et al.* TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. J Biol Chem, v.286, n.16, Apr 22, p.13805-14.

Wolffe, A. P. Histone deacetylase: a regulator of transcription. Science, v.272, n.5260, Apr 19, p.371-2. 1996.

Woltjen, K., I. P. Michael, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature, v.458, n.7239, Apr 9, p.766-70. 2009.

Wong, C. F. e R. L. Tellam. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. J Biol Chem, v.283, n.15, Apr 11, p.9836-43. 2008.

Woodring, P. J., T. Hunter, *et al.* Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. J Cell Sci, v.116, n.Pt 13, Jul 1, p.2613-26. 2003.

Wulczyn, F. G., L. Smirnova, *et al.* Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. Faseb J, v.21, n.2, Feb, p.415-26. 2007.

Xiao, C., L. Srinivasan, *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. Nat Immunol, v.9, n.4, Apr, p.405-14. 2008.

Xie, S., Z. Wang, *et al.* Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. Gene, v.236, n.1, Aug 5, p.87-95. 1999.

Xiong, Y., S. C. Dowdy, *et al.* Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA

methyltransferase activity in human endometrial cells. Cancer Res, v.65, n.7, Apr 1, p.2684-9. 2005.

Xu, F., X. Li, *et al.* Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring. Ann Hematol, v.90, n.6, Jun, p.643-53.

Xu, G. L., T. H. Bestor, *et al.* Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. Nature, v.402, n.6758, Nov 11, p.187-91. 1999.

Yi, R., Y. Qin, *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev, v.17, n.24, Dec 15, p.3011-6. 2003.

Yoder, J. A. e T. H. Bestor. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. Hum Mol Genet, v.7, n.2, Feb, p.279-84. 1998.

Yoder, J. A., C. P. Walsh, *et al.* Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet, v.13, n.8, Aug, p.335-40. 1997.

Yoon, H. G., D. W. Chan, *et al.* N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. Mol Cell, v.12, n.3, Sep, p.723-34. 2003.

Yoshida, K. Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. Trends Mol Med, v.14, n.7, Jul, p.305-13. 2008.

Yoshida, Y. e S. Yamanaka. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. Circulation, v.122, n.1, Jul 6, p.80-7.

Yu, F., H. Yao, *et al.* let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell, v.131, n.6, Dec 14, p.1109-23. 2007.

Yuan, X., C. Liu, *et al.* Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. BMC Syst Biol, v.3, p.65. 2009.

Yuan, Z. M., Y. Huang, *et al.* Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.4, Feb 18, p.1437-40. 1997.

Zhang, H., F. A. Kolb, *et al.* Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. Embo J, v.21, n.21, Nov 1, p.5875-85. 2002.

Zhang, X., S. Liu, *et al.* Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. Hepatology, v.50, n.2, Aug, p.490-9. 2009.

Zhao, Y. e D. Srivastava. A developmental view of microRNA function. Trends Biochem Sci, v.32, n.4, Apr, p.189-97. 2007.

Zhou, H., S. Wu, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell, v.4, n.5, May 8, p.381-4. 2009.

Zisoulis, D. G., M. T. Lovci, *et al.* Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in *Caenorhabditis elegans*. Nat Struct Mol Biol, v.17, n.2, Feb, p.173-9.

Capítulo de livro publicado:

Vasques, L.R., C.R.G. Schoof, et al. MicroRNAs: a new paradigm for gene regulation, in: Gupta, V.K., Sharma, P., Gaur, R.K., Gafni, Y. (Eds.), RNAi Technology. Science Publishers, Enfield. pp. 133-152. 2011.

RNAi Technology

Editors

R.K. Gaur

Mody Institute of Technology and Science
Lakshmangarh, Sikar, India

Yedidya Gafni

Department of Genetics and Vegetable Research
Volcani Center, Bet Dagan, Israel

P. Sharma

Directorate of Wheat Research, Karnal, India

V.K. Gupta

National University of Ireland, Galway, Ireland

CRC Press
Taylor & Francis Group
an informa business
www.crcpress.com

6000 Broken Sound Parkway, NW
Suite 300, Boca Raton, FL 33487
270 Madison Avenue
New York, NY 10016
2 Park Square, Milton Park
Abingdon, Oxon OX14 4RN, UK

Science Publishers
Enfield, New Hampshire

MicroRNAs: A New Paradigm for Gene Regulation

Luciana dos Reis Vasques,* Cláudia Gasque Schoof
and Eder Leite da Silva Botelho

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that act in the regulation of gene expression, targeting messenger RNAs and causing their degradation or translation repression. These small RNAs are involved in important biological processes and alteration in their expression patterns has been associated to several diseases. This chapter will focus on mammalian miRNAs pathway and review its processing mechanisms and genomic organization. In addition, the chapter will provide a brief overview of normal development function and maintenance of differentiated state, possible causes and consequences of miRNAs misregulation in cancer and other diseases, as well as advances on miRNAs-based therapy.

Keywords: miRNA, biogenesis, RISC, hESC, mESC, microRNA-based therapy, microRNA misregulation.

INTRODUCTION

The first findings on gene expression regulation date from 1960s, when two researchers, François Jacob and Jacques Monod, uncovered the Lac operon system in *Escherichia coli*, providing a new perspective for the mechanism of gene regulation (Jacob et al. 1961). Since then, different mechanisms of gene expression modulation have been discovered, such as specific transcription factors, epigenetic modifications, DNA regulatory elements, among others. The latest paradigmatic breakthrough in this field was the identification of a new class of RNAs: microRNAs (miRNAs). These are small non-coding RNAs, with approximately 22nt, which

* Corresponding author e-mail: lrvasques@gmail.com

are involved in gene expression regulation related to a variety of biological processes, such as cell proliferation and apoptosis. However, its main function is to establish and maintain the differentiated state of several cellular types of an organism (reviewed in Bartel, 2004, Bushati and Cohen, 2007). MiRNAs are well conserved and are of fundamental importance for the development of a wide range of eukaryotic organisms such as plants, nematodes, insects and mammals (Pasquinelli et al. 2000, Lagos-Quintana et al. 2001, Reinhart et al. 2002).

These small RNAs were observed for the first time in *C. elegans*, in 1993, by two independent groups (Lee et al. 1993, Wightman et al. 1993). They found that the control of early larval development is related to the suppression of translation of a gene, *lin-14*. The major discovery lies in the fact that this translation inhibition is accomplished by the complementary binding of endogenous small RNA, *lin-4*, to 3'-end UTR of the mRNA of *lin-14*. Although another target of *lin-4*, the mRNA of *lin-28*, was identified four years later (Moss et al. 1997), this specific type of translation blockage seemed to be an isolated case, until the year 2000, when another small RNA, *let-7*, which inhibits translation of *lin-41* was identified (Reinhart et al. 2000, Pasquinelli et al. 2000). Since then, many others were subsequently identified, not only in *C. elegans*, but also in several other organisms and then, the term "microRNAs" was coined to classified them (Lau et al. 2001, Lagos-Quintana et al. 2001, Lee et al. 2001). Currently, more than 1000 miRNAs have already been identified in humans, (miRBase-<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>), representing 1 to 3% of genes present in our genome (Zhao et al. 2007). A recent study indicates that miRNAs may be responsible for regulating at least 60% of human protein-coding genes (Friedman et al. 2009). As new miRNAs are identified, their expression profile in several tissues, in normal and altered states, as well as the identification of their targets, provide the first data about their biological functions in different pathways. This chapter will review the biogenesis and the mechanism of action of miRNAs, as well as provide an overview of recent publication in the field.

BIOGENESIS AND MECHANISM OF ACTION OF miRNAs

The miRNAs pathway occurs in 3 main steps (Figure 1): The first consists in transcription of primary miRNA (pri-miRNA), which has one or several loops of 60 to 80 nucleotides (nt), showing imperfect pairings (reviewed in Bartel, 2004). In the second step, each loop is recognized by Drosha, an RNase III endoribonuclease and its partner, Pasha/ DGCR-8 (*Drosophila* and *C. elegans*/ mammals orthologs respectively), that has affinity for double-stranded RNA (Landthaler et al. 2004, Han et al. 2004). Drosha

Figure 1: Schematic illustration of microRNAs biogenesis. For further explanation, see text.

(Color image of this figure appears in the color plate section at the end of the book.)

cleaves the pri-miRNAs in miRNAs precursors, pre-miRNAs, which have approximately 70 nt with 2-nt 3' overhang (Lee et al. 2003, Basyuk et al. 2003). Once processed, the pre-miRNAs are exported by Exportin 5 core and its co-factor Ran-GTP (Yi et al. 2003, Lund et al. 2004, Bohnsack et al. 2004). The hairpin structure of pre-miRNA and 2 nt at 3'-end left by Drosha processing are recognized by Exportin 5 in sequence-independent manner, facilitating its transport to the cytoplasm (Zeng et al. 2004). In the third step, the pre-miRNAs are processed in miRNAs duplexes of 21–25 nt by Dicer, another RNase III endoribonuclease and its partner TRBP (Trans Activator RNA Binding Protein) in humans (Loquacious in *Drosophila*) (Bernstein et al. 2001, Zhang et al. 2002, Chendrimada et al. 2005, Förstemann et al. 2005, Saito et al. 2005).

As will be seen below, most miRNAs are hosted in intronic regions of other genes. In these cases, the beginning of processing occurs simultaneously to the transcript, prior to splicing (Kim et al. 2007, Morlando et al., 2008). Alternatively, they can also be generated

directly as a product of splicing, known as Mirtrons (intronic miRNAs), avoiding processing by the complex Drosha/DGCR8(Pasha) (Figure 1) (Ruby et al. 2007, Berezikov et al., 2007, Okamura et al. 2007). Once mature, miRNAs duplexes are loaded through Dicer into RISC complex (RNA-Induced Silencing Complex), which also recognizes the 2 nt 3' overhang and then trigger the post-transcriptional silencing. Usually the duplex strand with less stability at 5'-end is selected to be part of miRNA/RISC complex (miRISC), while the other strand, called passenger, is degraded (Schwarz et al. 2003, Khvorova et al. 2003). The protagonist of RISC protein complex belongs to the Argonaut family (AGO), which in humans is composed of eight members, four of them (AGO 1 to 4) are associated with miRNAs as well as RISC activity. Among them, only AGO2 has a catalytic activity (Liu et al. 2003, Meister et al. 2004 and reviewed in Peters and Meister, 2007).

Endogenous genes may be regulated by miRNAs in two different manners determined by the degree of miRNAs complementarity with their targets. In one, miRNAs have full or nearly full complementarity and the targeted RNA are sliced by RISC containing Ago1 (in plants) or Ago2 (in *Drosophila* and mammals) and, subsequently, degraded by RNases (Llave et al. 2002, Meister et al. 2004, Okamura et al. 2004). This mechanism is commonly found in plants and the target region is usually in the ORF (Rhoades et al. 2002). In another, miRNAs present partial complementarity, repressing target RNA translation without their degradation (Doench et al. 2003, Doench et al. 2004). In this case, besides partial complementarity with their RNA targets, each miRNA has a region, located between the nucleotides 2 to 8, with total complementarity. This sequence is known as seed region and is responsible for the miRNA specificity (Lewis et al. 2003, Doench et al. 2004, Lewis et al. 2005). The repression, without further target RNA degradation, is generally found in animals, in which the seed region is located most frequently in the 3' UTR of the target RNA (Lai. 2002). Rare cases of pairing regions other than 3' UTR are also found; examples are: the miR-148, which represses the translation binding to the coding region of DNMT3B transcript (Duursma et al. 2008) and the miR-122, which binds to 5' UTR of *Hepatitis C virus* (HCV) RNA (Díaz-Toledano et al. 2009).

However, even in circumstances where the complementarity is partial, the target RNA degradation may occur. This phenomenon has been observed in some cytoplasmatic foci, called P-bodies (processing bodies), that, alternatively, can group targetRNAs/miRISC complexes to an enzyme, Dcp1. This enzyme cleaves 5' Cap of the target RNA, which is subjected to degradation by RNases (Liu et al. 2005).

In addition to the canonical pathways, recent studies have reported some new functions for protein Ago2. In 2007, Diederichs and Haber showed that

Ago2 can, in some cases, cleave the pre-miRNA hairpin 12 nucleotides from its 3' end, prior to Dicer processing. Such event generates an intermediate product, named ac-pre-miRNA (Ago2-cleaved pre-miRNA), which is then processed by Dicer and loaded into RISC complex. Through this process, the nicked passenger strand cleaved by Ago2 may facilitate removal from RISC, after maturation. Another study has identified a murine miRNA (miR-451) that is not processed by Dicer. In this case, the pre-miRNA is directly loaded into and cleaved by Ago2 at the 3'-end (Cheloufi et al. 2010).

The cellular mechanisms described above are multifaceted genetic regulatory processes and a fine orchestration of expression/repression of several genes occur through differential expression of miRNAs. It seems that more than one miRNA must bind to the same target RNA to achieve an efficient gene silencing (Doench et al. 2004). Another aspect is that the same miRNA may target different RNAs (Yuan et al. 2009). Other forms of miRNAs action continue to be described. One is that miRNAs, as molecules of si- and pi-RNA (small interfering- and Piwi-interacting-RNAs), can guide chromatin remodeling. Recently, Gonzales et al. (2008) demonstrate this possibility, studying miR17-5p and miR20a from an oncomiR cluster, miR17-92. Promoters that undergo overlapping transcription and are complementary to miR17-5p and miR20a seed regions can induce heterochromatinization by a mechanism still to be fully elucidated. Another surprising discovery in the last few years, is that some miRNAs were found to stimulate translation, instead of suppress, by different mechanisms. Examples are: miR-369-3 in humans, upon cell cycle arrest, can induce translation through association of miRISC complex to ARE (AU-rich element), present in 3' UTR of the TNF α mRNA (Vasudevan et al. 2007); and miR-10b that binds to 5' UTR of mRNAs that encode ribosomal proteins, facilitating their translation (Ørom et al. 2008).

ORGANIZATION OF miRNA GENES

In general, miRNAs are subjected to RNA polymerase II transcriptional control (Lee et al. 2004), although some miRNAs are transcribed by RNA polymerase III, (Borchert et al. 2006) and possess poli-A tail and 5'-Cap (Cai et al. 2004). In humans, about 30% of miRNAs are located in intergenic regions and 70% inserted into other genes. In the latter case, the miRNA and the host gene usually are in the same orientation and are synergistically expressed, both of which subjected to the same promoter region (Rodriguez et al. 2004). Intragenic miRNA have been found in introns of coding and non-coding RNAs (ncRNAs) and even in exons of mRNAs that undergo alternative splicing (Lagos-Quintana et al. 2001, Lau et al. 2001, Lagos-Quintana et al. 2003, Rodriguez et al. 2004, Maselli et al.

2008). In addition, approximately 40% of miRNAs can be found in clusters, forming polycistronic transcripts that have coordinated expression (Lee et al. 2004, Rodriguez et al. 2004, Griffiths-Jones et al. 2008). Interestingly, it has been proposed that a miRNA cluster may regulate a group of mRNAs that encode proteins related to the same pathway (Yuan et al. 2009), which highlights the complexity of these regulatory molecules. Few miRNAs can still be found within 3'-UTR region of coding transcripts, as miR-198 (Cullen. 2004). However, in vertebrates, intronic miRNAs are the most abundant, constituting 40 to 70% of all miRNAs (Baskerville et al. 2005, Griffiths-Jones et al. 2008, reviewed by Olena and Patton, 2009).

miRNA FUNCTION

The characteristics described above show how difficult miRNAs are to be studied. The newest works in mammals are focused on the identification and validation of new miRNAs and their RNA targets, location in the genome and organization. Thus, miRNA expression panels from different tissues and organisms (Baskerville et al. 2005, He et al. 2005), from human and mouse embryonic stem cells (hESC and mESC) (Houbaviy et al. 2003, Suh et al. 2004), as well as tumor tissues (Lu et al. 2005), are being obtained by Northern Blot or Microarray. In addition, prediction programs identifying possible target regions, using miRNAs known sequences against different RNA database from several organisms, are being developed and are available on the Internet (MiRanda/PicTar/Targetscan/RNAHybrid/Diana-microT/among others). Therefore, the identification of each miRNA function is the most difficult task and it is being done slowly. Here, we will describe some of the recent advances in this field in different cellular pathways.

As previously mentioned, the first miRNAs findings were related to early stages of development. Thus, an increasing number of studies in development of different species has been performed. In 2003, the Sharp Group was the first to publish a work in which the expression profile of miRNAs in undifferentiated and differentiated mESC was obtained. They have found a cluster miR-290-295, which encodes for eight mature miRNAs and is highly expressed in undifferentiated cells. Interestingly, its expression decreases upon differentiation (Houbaviy et al. 2003). Thus, this cluster was credited to be involved in maintenance of mESC undifferentiated state. However, later studies observed that this cluster acts by an indirect manner, controlling epigenetic modifications, since its miRNAs regulate the expression of DNA methyltransferases through inhibition of its repressor, Rbl2 (Retinoblastoma-like 2 protein), (Benetti et al. 2008, Sinkkonen et al. 2008). In a similar study conducted on hESC, the exclusive group of miRNAs expressed in non-differentiated cells was different

from mESC counterparts, except for one homologous cluster (Suh et al. 2004). Additionally, it was observed by Kanellopoulou et al. (2005) that Dicer-deficient mESCs are viable, but lack the ability to differentiate, providing further evidence of the importance of miRNAs in the early stages of development. In agreement with these findings, at the beginning of organogenesis, several studies have reported the key role of miRNAs in determining the cell destination and differentiation of hematopoietic stem cells (Chen et al. 2004, Felli et al. 2005, Georgantas et al. 2007, Zhou et al. 2007, Wang et al. 2008); in myogenesis (Kim et al. 2006, Wong et al. 2008), in differentiation of neural stem cells (Smirnova et al. 2005), in osteogenesis (Mizuno et al. 2008); in differentiation of epithelial stem cells (Yi et al. 2008, Lena et al. 2008); in differentiation of mature adipocytes with ubiquitous localization (Esau et al. 2004); among others.

Despite the importance of miRNAs in the normal development of many organisms, as seen above, deregulation of their expression has been increasingly related to several pathologies, being cancer the most studied one. The first deregulated miRNAs described in cancer cells were miR-15a and miR-16-1, which are located in a chromosomal region deleted in more than half of B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) cases (Calin et al. 2002). In later works, these miRNAs were found to control the expression of BCL2, an antiapoptotic proto-oncogene (Cimmino et al. 2005). Over the years, this field has experienced a great expansion and currently, several miRNAs aberrantly expressed in cancer have been described. MiRNAs that suppress expression of proto-oncogenes preventing tumorigenesis and tumor progression, named "tumor suppressor miRNAs", are downregulated in tumor cells. Among these, one of the most thoroughly studied examples is the let-7 family, which members are located in fragile chromosomal sites and are often deleted in lung cancer (Takamizawa et al. 2004, Calin et al. 2004, Johnson et al. 2005). On the other hand, miRNAs that regulate the expression of tumor suppressor genes, contributing to tumor development, are known as "OncomiRs" and are overexpressed in tumor cells. One of the best-known examples is the cluster miR-17-92, which is located in a chromosomal region often amplified in several tumor types and, consequently, is highly expressed (Ota et al. 2004, Hayashita et al. 2005, Matsubara et al. 2007). In addition, an increasing number of studies has associated aberrant expression profile of miRNAs with different stages of tumor progression, degree of malignancy, subtypes, association with prognosis and resistance to chemotherapy agents (reviewed in Grady and Tewari, 2010, Fabbri. 2010, Nana-Sinkam et al. 2010).

As shown above, there are a number of causes for deregulation of miRNAs. More than half of miRNAs is located at fragile sites of the genome, subject to amplifications, deletions, breaks and

rearrangements (Calin et al. 2004, Sevignani et al. 2007). Thus, changes in copy number of miRNA genes play an important role in tumor formation (Keating et al. 2002, Bottoni et al. 2005, He et al. 2005, Zhang et al. 2006). Moreover, alterations in miRNAs expression can be caused by transcriptional deregulation (O'Donnell et al. 2005, Bommer et al. 2007, Chang et al. 2008), epigenetic modifications (Saito et al. 2006, Zhang et al. 2008, Yang et al. 2008), defect or disruption in the expression of proteins that participate in its biogenesis (Karube et al. 2005, Chiosea et al. 2006, Thomson et al. 2006, Muralidhar et al. 2007, Chiosea et al. 2007, Kumar et al. 2007) and mutations or polymorphisms (Calin et al. 2005, Diederichs et al. 2006, Raveche et al. 2007, Wu et al. 2008). The latter can create new illegitimate interactions, since the mutation or polymorphism at miRNAs or miRNA target sites, may affect the complementarity, preventing binding or creating a new target site (Saunders et al. 2007, reviewed by Fabbri et al. 2009, Ryan et al. 2010). As an example, a polymorphism next to the miR-24 binding site at 3' UTR of Human Dihydrofolate Reductase gene (DHFR), prevents its inhibition and, as a result, DHFR gene is found overexpressed, conferring resistance to the chemotherapeutic agent Methotrexate (Mishra et al. 2007). Finally, miRNAs can also target an exon of a RNA that undergoes alternative splicing by exon skipping. Thus, different products from the same gene may be sensitive or not to a particular miRNA, depending on the presence or absence of a target site in its mature RNA (Laneve et al. 2007, Duursma et al. 2008).

Besides cancer, other pathologies are also being increasingly associated with miRNAs deregulation; among them, several neuro-degenerative diseases (Wu. 2006, Kim et al. 2007, Lukiw. 2007, Hébert et al. 2008, Cogswell et al. 2008, Johnson et al. 2008, Stark et al. 2008, Otaegui et al. 2009), cardiovascular (Thum et al. 2007, Ikeda et al. 2007, Sucharov et al. 2008, Naga et al. 2009) autoimmune (Dai et al. 2007, Pauley et al. 2008, Nakamachi et al. 2009, Stanczyk et al. 2009, Padgett et al. 2009, Fulci et al. 2010), Schizophrenia (Hansen et al. 2007, Perkins et al. 2007, Beveridge et al. 2008), Tourette Syndrome (Abelson et al. 2005) and others.

Even viral genomes encode miRNAs (Pfeffer et al. 2004, Pfeffer et al. 2005). They can inactivate the innate defense mechanisms of the host cell, as well as its own endogenous-viral RNAs (reviewed in He et al. 2008). The opposite was also reported, where miRNAs from host cells may control viral infection by suppressing viral replication (Zhang et al. 2010).

The understanding of the proper miRNAs processing and functioning is essential for identifying alterations in different pathways and their related pathologies. Thus, in recent years a growing number of studies of miRNA-based therapy have been performed. The introduction of exogenous

miRNAs, recovering therefore the correct miRNAs expression in a cell, would indirectly downregulate the expression of its targets. The opposite can also be done, by inhibiting the expression of specific miRNA aberrantly upregulated through an anti-miRNA oligonucleotides (AMOs) and which would retrieve the expression of their RNA targets (reviewed in Wahid et al. 2010, Garofalo et al. 2010, Croce. 2010). The miRNA-based therapy is goal to pharmaceutical companies. In 2008, the company Santaris first announced the beginning of a clinical trial with an anti-miR-122 molecule to treat Hepatitis C, since miR-122 is specifically overexpressed in patients with this pathology. Currently, several other clinical trials based on miRNA therapy for a number of diseases such as sepsis, asthma, leukemia and other cancers are in progress (source: <http://www.clinicaltrials.gov>).

CONCLUSION

When the term “RNA World” was coined in the 1980s, scientists were beginning to understand that, in fact, the RNAs have a myriad of functions than what was initially proposed by the Biology Central Dogma. The identification of a class of small RNA molecules provoked a colossal and paradigmatical shift in gene regulation knowledge. Moreover, these molecules are well conserved and present in most multicellular organisms and are involved in regulating many cellular biochemical pathways. In humans they may control the expression of two thirds of the coding genes. The regulation of most genes already studied, might have to be revisited through another angle. Thus, the identification of new miRNAs, their targets, organization in genomes, as well as their role is essential for moving toward the understanding of the complexity of eukaryotic cells.

REFERENCES

- Abelson, J.F., K.Y. Kwan, B.J. O’Roak, D.Y. Baek, A.A. Stillman, T.M. Morgan, C.A. Mathews, D.L. Pauls, M.R. Rasin and M. Gunel. 2005. Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette’s syndrome. *Science*. **310**:317–320.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*. **116**:281–297.
- Baskerville S. and D.P. Bartel 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. **11**(3):241–7.
- Basyuk, E., F. Suavet, A. Doglio, R. Bordonné and E. Bertrand. 2003. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res.* **31**:6593–6597.

- Benetti, R., S. Gonzalo, I. Jaco, P. Muñoz, S. Gonzalez, S. Schoeftner, E. Murchison, T. Andl, T. Chen, P. Klatt, E. Li, M. Serrano, S. Millar, G. Hannon and M.A. Blasco. 2008. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature. Struct. Biol.* **15**:268–279.
- Berezikov, E., W.J. Chung, J. Willis, E. Cuppen and E.C. Lai. 2007. Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell.* **28**:328–336.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond and G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* **409**:363–366.
- Beveridge, N.J., P.A. Tooney, A.P. Carroll, E. Gardiner, N. Bowden, R.J. Scott, N. Tran, I. Dedova and M.J. Cairns. 2008. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* **17**(8):1156–68.
- Bohnsack, M.T., K. Czaplinski and D. Gorlich. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* **10**:185–191.
- Bommer, G.T., I. Gerin, Y. Feng, A.J. Kaczorowski, A.J. Kuick, R.E. Love, Y. Zhai, T.J. Giordano, Z.S. Qin, B.B. Moore, O.A. Macdougald, K.R. Cho and E.R. Fearon. 2007. p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Curr. Biol.* **17**(15):1298–307.
- Borchert, G.M., W. Lanier and B.L. Davidson. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**:1097–1101.
- Bottoni, A., D. Piccin, F. Tagliati, A. Luchin, M.C. Zatelli and E.C. degli Uberti. 2005. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J. Cell. Physiol.* **204**(1):280–5.
- Bushati, N. and S.M. Cohen. 2007. microRNA Functions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **23**:175–205.
- Cai, X., C.H. Hagedorn and B.R. Cullen. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* **10**(12):1957–66.
- Calin, G.A., C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C.M. Croce. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:15524–15529.
- Calin, G.A., C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini and C.M. Croce. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**:2999–3004.
- Calin, G.A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S.E. Wojcik, M.V. Iorio, R. Visone, N.I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini and C.M. Croce. 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**:1793–801.

- Chang, T.C., D. Yu, Y.S. Lee, E.A. Wentzel, D.E. Arking, K.M. West, C.V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko and J.T. Mendell. 2008. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* **40**:43–50.
- Cheloufi, S., C.O. Dos Santos, M.M. Chong and G.J. Hannon. 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. **465**(7298):584–9.
- Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish and D.P. Bartel. 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. **303**:83–86.
- Chendrimada, T.P., R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. **436**: 740–744.
- Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, M. Acquafondata, T. McHale, R.W. Sobol and R. Dhir. 2006. Up-Regulation of DICER, a Component of MicroRNA machinery, in Prostate Adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **169**:1812–1820.
- Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, J. Luo, G. Mantha, R.W. Sobol and S. Dacic. 2007. Overexpression of DICER in Precursor lesions of Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res.* **67**:2345–2350.
- Cimmino, A., G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik, R.I., C.M. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini and Croce. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**:13944–13949.
- Cogswell, J.P., J. Ward, I.A. Taylor, M. Waters, Y. Shi, B. Cannon, K. Kelnar, J. Kemppainen, D. Brown, C. Chen, R.K. Prinjha, J.C. Richardson, A.M. Saunders, A.D. Roses and C.A. Richards. 2008. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis.* **14**:27–41.
- Cullen, B.R. 2004. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell.* **16**: 861-865.
- Dai, Y., Y.S. Huang, M. Tang, T.Y. Lv, C.X. Hu, Y.H. Tan, Z.M. Xu and Y.B. Yin. 2007. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients, *Lupus*. **16**:939–946.
- Díaz-Toledano, R., A. Ariza-Mateos, A. Birk, B. Martínez-García and J. Gómez. 2009. *In vitro* characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA. *Nucleic Acids Res.* **37**(16):5498–510.
- Diederichs, S. and D.A. Haber. 2006. Sequence variations of microRNAs in human cancer: alterations in predicted secondary structure do not affect processing. *Cancer Res.* **66**(12):6097–6104.
- Diederichs, S. and D.A. Haber. 2007. Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. **131**:1097–1108.
- Doench, J.G., C.P. Petersen and P.A. Sharp. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* **17**(4):438–42.
- Doench, J.G. and P.A. Sharp. 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**:504–511.

- Duursma, A.M., M. Kedde, M. Schrier, C. le Sage and R. Agami. 2008. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. **14**(5):872–7.
- Esau, C., X. Kang, E. Peralta, E. Hanson, E.G. Marcusson, L.V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, R.J. Perera, R. Jain, N.M. Dean, S.M. Freier, C.F. Bennett, B. Lollo and R. Griffey. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**(50):52361–5.
- Fabbri, M., N. Valeri and G.A. Calin. 2009. MicroRNAs and genomic variations: from Proteus tricks to Prometheus gift. *Carcinogenesis*. **30**(6):912–7.
- Fabbri, M. 2010. miRNAs as molecular biomarkers of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **10**(4):435–44.
- Felli, N., L. Fontana, E. Pelosi, R. Botta, D. Bonci, F. Facchiano, F. Liuzzi, V. Lulli, O. Morsilli, S. Santoro, M. Valtieri, G.A. Calin, C.G. Liu, A. Sorrentino, C.M. Croce and C.M. Peschle. 2005. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**:18081–18086.
- Förstemann, K., Y. Tomari, T. Du, V.V. Vagin, A.M. Denli, D.P. Bratu, C. Klattenhoff, W.E. Theurkauf and P.D. Zamore. 2005. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol.* **3**(7):e236.
- Friedman, R.C., K.K. Farh, C.B. Burge and D.P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**(1):92–105.
- Fulci, V., G. Scappucci, G.D. Sebastiani, C. Giannitti, D. Franceschini, F. Meloni, T. Colombo, F. Citarella, V. Barnaba, G. Minisola, M. Galeazzi and G. Macino. 2010. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* **71**(2):206–211.
- Garofalo, M., C.M. Croce. 2010. microRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**:25–43.
- Georgantas, R.W., R. Hildreth, S. Morisot, J. Alder, C.G. Liu, S. Heimfeld, G.A. Calin, C.M. Croce and C.I. Civin. 2007. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**:2750–2755.
- Gonzalez, S., D.G. Pisano and M. Serrano. 2008. Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle*. **7**(16):2601–8.
- Grady, W.M. and M. Tewari. 2010. The next thing in prognostic molecular markers: microRNA signatures of cancer. *Gut*. **59**(6):706–8.
- Griffiths-Jones, S., H.K. Saini, S. van Dongen and A.J. Enright. 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* **36**:D154–8.
- Han, J., Y. Lee, K.H. Yeom, Y.K. Kim, H. Jin and V.N. Kim. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**:3016–3027.
- Hansen, T., L. Olsen, M. Lindow, K.D. Jakobsen, H. Ullum, E. Jonsson, O.A. Andreassen, S. Djurovic, I. Melle and I. Agartz. 2007. Expressed microRNAs Implicated in Schizophrenia Etiology. *PLoS ONE*. **2**:e873.
- Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido and T. Takahashi. 2005. A polycistronic

- microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* **65**:9628–9632.
- He, L., J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, G.J. Hannon and S.M. Hammond. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. **435**:828–833.
- He, S., Y., Zang, G. Skogerbo, F. Ren, H. Cui, H. Zhao, R. Chen and Y. Zhao. 2008. The properties and functions of virus encoded microRNA, siRNA and other small noncoding RNAs. *Crit. Rev. Microbiol.* **34**(3-4):175–88.
- Hébert, S.S., K. Horré, L. Nicolai, A.S. Papadopoulou, W. Mandemakers, A.N. Silahdaroglu, S. Kauppinen, A. Delacourte and B. De Strooper. 2008. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**(17):6415–20.
- Houbaviy, H.B., M.F. Murray and P.A. Sharp. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev. Cell.* **5**(2):351–8.
- Ikeda, S. and S.W. Kong, J. Lu, E. Bisping, H. Zhang, P.D. Allen, R.D. Golub, B. Pieske, W.T. Pu. 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol. Genomics*. **31**:367–373.
- Jacob, F. and J. Monod. 1961 Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**:318–56.
- Johnson, S.M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K.L. Reinert, D. Brown and F.J. Slack. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. **120**:635–647.
- Johnson, R., C. Zuccato, N.D. Belyaev, D.J. Guest, E. Cattaneo and N.J. Buckley. 2008. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **29**:438–445.
- Kanellopoulou, C., S.A. Muljo, A.L. Kung, S. Ganesan, R. Drapkin, T. Jenuwein, D.M. Livingston and K. Rajewsky. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* **19**(4):489–501.
- Karube, Y., H. Tanaka, H. Osada, S. Tomida, Y. Tatematsu, K. Yanagisawa, Y. Yatabe, J. Takamizawa, S. Miyoshi, T. Mitsudomi and T. Takahashi. 2005. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* **96**:111–5.
- Keating, M., K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C.M. Croce. 2002. Frequent deletions and downregulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**:15524–9.
- Khvorova, A., A. Reynolds and S.D. Jayasena. 2003. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*. **115**:209–216.
- Kim, H.K., Y.S. Lee, U. Sivaprasad, A. Malhotra and A. Dutta. 2006. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* **174**(5):677–87.
- Kim, J., K. Inoue, J. Ishii, W.B. Vanti, S.V. Voronov, E. Murchison, G. Hannon and A. Abeliovich. 2007. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* **317**:1220–1224.

- Kim, Y.K. and V.N. Kim. 2007. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* **26**:775–783.
- Kumar, M.S., J. Lu, K.L. Mercer, T.R. Golub and T. Jacks. 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* **39**:673–7.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* **294**:853–858.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt and T. Tuschl. 2003. New microRNAs from mouse and human. *RNA.* **9**:175–179.
- Lai, E.C. 2002. MicroRNAs are complementary to 3'UTR motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* **30**:363–364.
- Landthaler, M., A. Yalcin and T. Tuschl. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* **14**:2162–2167.
- Laneve, P., Di L. Marcotullio, U. Gioia, M.E. Fiori, E. Ferretti, A. Gulino, I. Bozzoni and E. Caffarelli. 2007. The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(19):7957–62.
- Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein and D.P. Bartel. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* **294**:858–862.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell.* **75**:843–854.
- Lee, R.C. and V. Ambros. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* **294**(5543):862–4.
- Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim and V.N. Kim. 2002. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**:4663–4670.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim and V.N. Kim. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* **425**:415–419.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek and V.N. Kim. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**:4051–4060.
- Lena, A.M., R. Shalom-Feuerstein, P. Rivetti di Val Cervo, D. Aberdam, R.A. Knight, G. Melino and E. Candi. 2008. miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell. Death Differ.* **15**(7):1187–95.
- Lewis, B.P., I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel and C.B. Burge. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* **115**:787–798.
- Lewis, B.P., C.B. Burge and D.P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* **120**:15–20.
- Liu, J., M.A. Carmell, F.V. Rivas, C.G. Marsden, J.M. Thomson, J.J. Song, S.M. Hammond, L. Joshua-Tor and G.J. Hannon. 2003. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* **305**:1437–1441.

- Liu, J., M.A. Valencia-Sanchez, G.J. Hannon and R. Parker. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell. Biol.* **7**(7):719–23.
- Llave, C., Z. Xie, K.D. Kasschau and J.C. Carrington. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*. **297**(5589):2053–6.
- Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz and T.R. Golub. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. **435**:834–838.
- Lukiw, W.J. 2007. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *NeuroReport*. **18**:297–300.
- Lund, E., S. Güttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg and U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. **303**(5654):95-8.
- Maselli, V., D. Di Bernardo and S. Banfi. 2008. CoGemiR: A comparative genomics microRNA database. *BMC Genomics*. **9**:457.
- Matsubara, H., T. Takeuchi, E. Nishikawa, K. Yanagisawa, Y. Hayashita, H. Ebi, H. Yamada, M. Suzuki, M. Nagino, Y. Nimura, H. Osada and T. Takahashi. 2007. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene*. **26**(41):6099–105.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*. **15**:185–197.
- Mishra, P.J., R. Humeniuk, P.J. Mishra, G.S. Longo-Sorbello, D. Banerjee and J.R. Bertino. 2007. A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(33):13513–8.
- Mizuno, Y., K. Yagi, Y. Tokuzawa, Y. Kanesaki-Yatsuka, T. Suda, T. Katagiri, T. Fukuda, M. Maruyama, A. Okuda, T. Amemiya, Y. Kondoh, H. Tashiro and Y. Okazaki. 2008. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 4. **368**(2):267–72.
- Morlando, M., M. Ballarino, N. Gromak, F. Pagano, I. Bozzoni and N.J. Proudfoot. 2008. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**:902–909.
- Moss, E.G., R.C. Lee and V. Ambros. 1997. The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. elegans* and Is Regulated by the lin-4 RNA. *Cell*. **88**:637–648.
- Muralidhar, B., L.D. Goldstein, G. Ng, D.M. Winder, R.D. Palmer, E.L. Gooding, N.L. Barbosa-Morais, G. Mukherjee, N.P. Thorne, I. Roberts, M.R. Pett and N. Coleman. 2007. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J. Pathol.* **212**:368–77.
- Naga Prasad, S.V., Z.H. Duan, M.K. Gupta, V.S. Surampudi, S. Volinia, G.A. Calin, C.G. Liu, A. Kotwal, C.S. Moravec, R.C. Starling, D.M. Perez, S. Sen, Q. Wu, E.F. Plow, C.M. Croce and S. Karnik. 2009. Unique microRNA profile in end-

- stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J. Biol. Chem.* **284**:27487–27499.
- Nana-Sinkam, P. and C.M. Croce. 2010. MicroRNAs in diagnosis and prognosis in cancer: what does the future hold? *Pharmacogenomics*. **11**(5):667–9.
- Nakamachi, Y., S. Kawano, M. Takenokuchi, K. Nishimura, Y. Sakai, T. Chin, R. Saura, M. Kurosaka and S. Kumagai. 2009. MicroRNA 124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**:1294–1304.
- Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M.C. Siomi. 2004. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* **18**(14):1655–66.
- Okamura, K., J.W. Hagen, H. Duan, D.M. Tyler and E. Lai. 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. **130**:89–100.
- Olena, A.F. and J.G. Patton. 2010. Genomic organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* **222**(3):540–5.
- Ørom, U.A., F.C. Nielsen and A.H. Lund. 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell.* **30**(4):460–71.
- Ota, A., H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, K.A. O'Donnell, E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang and J.T. Mendell. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. **435**:839–43, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.* **64**:3087–3095.
- Otaegui, D., S.E. Baranzini, R. Armañanzas, B. Calvo, M. Muñoz-Culla, P. Khankhanian, I. Inza, J.A. Lozano, T. Castillo-Triviño, A. Asensio, J. Olaskoaga and A. López de Munain. 2009. Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients, *PLoS One*. **4**(7):e6309.
- O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang and J.T. Mendell. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*; **435**:839–43.
- Padgett, K.A., R.Y. Lan, P.C. Leung, A. Lleo, K. Dawson, J. Pfeiff, T.K. Mao, R.L. Coppel, A.A. Ansari and M.E. Gershwin. 2009. Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression, *J. Autoimmun.* **32**:246–253.
- Pasquinelli, A.E., B.J. Reinhart, F. Slack, M.Q. Martindale, M.I. Kuroda, B. Maller, D.C. Hayward, E.E. Ball, B. Degnan, P. Müller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman and J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. **408**:86–89.
- Pauley, K.M., M. Satoh, A.L. Chan, M.R. Bubb, W.H. Reeves and E.K. Chan. 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients, *Arthritis Res. Ther.* **10**(4):R101.
- Perkins, D.O., C.D. Jeffries, L.F. Jarskog, J.M. Thomson, K. Woods, M.A. Newman, J.S. Parker, J. Jin and S.M. Hammond. 2007. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol.* **8**:R27.

- Peters, L. and G. Meister. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell.* **26**:611–623.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, F.A. Grässer, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, B. John, A.J. Enright, D. Marks, C. Sander and T. Tuschl. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. **304**:734–736.
- Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C. Sander, F.A. Grässer, L.F. van Dyk, C.K. Ho, S. Shuman, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, G. Randall, B.D. Lindenbach, C.M. Rice, V. Simon, D.D. Ho, M. Zavolan and T. Tuschl. 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods*. **2**:269–276.
- Raveche, E.S., E. Salerno, B.J. Scaglione, V. Manohar, F. Abbasi, Y.C. Lin, T. Fredrickson, P. Landgraf, S. Ramachandra, K. Huppi, J.R. Toro, V.E. Zenger, R.A. Metcalf and G.E. Marti. 2007. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. **109**:5079–86.
- Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz and G. Ruvkun. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **403**:901–906.
- Reinhart, B.J., E.G. Weinstein, M.W. Rhoades, B. Bartel and D.P. Bartel. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* **16**(13):1616–26.
- Rhoades, M.W., B.J. Reinhart, L.P. Lim, C.B. Burge, B. Bartel and D.P. Bartel. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. **110**(4):513–20.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst and A. Bradley. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14**:1902–1910.
- Ruby, J.G., C.H. Jan and D.P. Bartel. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. **448**:83–86.
- Ryan, B.M., A.I. Robles and C.C. Harris. 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer*. **10**(6):389–402.
- Saito, K., A. Ishizuka, H. Siomi and M.C. Siomi. 2005. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol.* **3**(7):e235.
- Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman and J.C. Chuang, G.A. Coetzee and P.A. Jones. 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. **9**:435–443.
- Saunders, M.A., H. Liang and W.H. Li. 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(9):3300–5.
- Schwarz, D.S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P.D. Zamore. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. **115**:199–208.
- Sevignani, C., G.A. Calin, S.C. Nnadi, M. Shimizu, R.V. Davuluri, T. Hyslop, P. Demant, C.M. Croce and L.D. Siracusa. 2007. MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(19):8017–22.
- Sinkkonen, L., T. Hugen Schmidt, P. Berninger, D. Gaidatzis, F. Mohn, C.G. Artus-Revel, M. Zavolan, P. Svoboda and W. Filipowicz. 2008. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nature Struct. Biol.* **15**:259–267.

- Smirnova, L., A. Gräfe, A. Seiler, S. Schumacher, R. Nitsch and F.G. Wulczyn. 2005. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* **21**(6):1469–77.
- Stanczyk, J., E. Karouzakis, A. Jungel, C. Ospelt, C. Kolling, B. Michel, R. Gay, S. Gay and D. Kyburz. 2009. Mir-203 regulates the expression of IL-6 and matrix metalloproteinase(MMP)-1 in RA synovial fibroblasts. ACR/ARHP Scientific Meeting.
- Stark, K.L., B. Xu, A. Bagchi, W.S. Lai, H. Liu, R. Hsu, X. Wan, P. Pavlidis, A.A. Mills, M. Karayiorgou and J.A. Gogos. 2008. Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat. Genet.* **40**:751–760.
- Sucharov, C., M.R. Bristow and J.D. Port. 2008. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**:185–192.
- Suh, M.R., Y. Lee, J.Y. Kim, S.K. Kim, S.H. Moon, J.Y. Lee, K.Y. Cha, H.M. Chung, H.S. Yoon, S.Y. Moon, V.N. Kim and K.S. Kim. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* **270**(2):488–98.
- Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi, T. Takahashi. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* **64**:3753–3756.
- Thomson, J.M., M. Newman, J.S. Parker, E.M. Morin-Kensicki, T. Wright and S.M. Hammond. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* **20**:2202–7.
- Thum, T., P. Galuppo, C. Wolf, J. Fiedler, S. Kneitz, L.W. vanLaake, P.A. Doevendans, C.L. Mummery, J. Borlak, A. Haverich, C. Gross, S. Engelhardt, G. Ertl and J. Bauersachs. 2007. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* **116**:258–267.
- Vasudevan, S., Y. Tong and J.A. Steitz. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* **318**(5858):1931–4.
- Yang, N., G. Coukos and L. Zhang. 2008. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. *Int. J. Cancer.* **122**:963–8.
- Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara and B.R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**(24):3011–6.
- Yi, R., M.N. Poy, M. Stoffel and E. Fuchs. 2008. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature. Mar 13.* **452**(7184):225–9.
- Yuan, X., C. Liu, P. Yang, S. He, Q. Liao, S. Kang and Y. Zhao. 2009. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst. Biol.* **3**:65.
- Wahid, F., A. Shehzad, T. Khan and Y.Y. Kim. 2010. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta.* **1803**(11):1231–43.
- Wang, Q., Z. Huang, H. Xue, C. Jin, X.L. Ju, J.D. Han and Y.G. Chen. 2008. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood.* **111**:588–595.

- Wightman, B., I. Ha and G. Ruvkun. 1993. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell*. **75**:855–862.
- Wong, C.F. and R.L. Tellam. 2008. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste homolog 2 during myogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**(15):9836–43.
- Wu, J. and X. Xie. 2006. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol.* **7**(9):R85.
- Wu, M., N. Jolicoeur, Z. Li, L. Zhang, Y. Fortin, L.A. Denis, Z. Yu and S.H. Shen. 2008. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*. **29**(9):1710–6.
- Zeng, Y. and B.R. Cullen. 2004. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* **32**:4776–4785.
- Zhang, H., F.A. Kolb, V. Brondani, E. Billy and W. Filipowicz. 2002. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* **21**:5875–5885.
- Zhang, L., Huang, N. Yang, J. Greshock, M.S. Megraw, A. Giannakakis, S. Liang, T.L. Naylor, A. Barchetti, M.R. Ward, G. Yao, A. Medina, A. O'Brien Jenkins, D. Katsaros, A. Hatzigeorgiou, P.A. Gimotty, Weber B.L. and G. Coukos. 2006. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**:9136–9141.
- Zhang, L., S. Volinia, T. Bonome, G.A. Calin, J. Greshock, N. Yang, C.G. Liu, A. Giannakakis, P. Alexiou, K. Hasegawa, C.N. Johnstone, M.S. Megraw, S. Adams, H. Lassus, J. Huang, S. Kaur, S. Liang, P. Sethupathy, A. Leminen, V.A. Simossis, R. Sandaltzopoulos, Y. Naomoto, D. Katsaros, P.A. Gimotty, A. DeMichele, Q. Huang, R. Bützow, A.K. Rustgi, B.L. Weber, M.J. Birrer, A.G. Hatzigeorgiou, C.M. Croce and G. Coukos. 2008. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**:7004–7009.
- Zhang, G.L., Y.X. Li, S.Q. Zheng, M. Liu, X. Li and H. Tang. 2010. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res.* [Epub ahead of print].
- Zhao, Y. and D. Srivastava. 2007. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* **32**(4):189–97.
- Zhou B., S. Wang, C. Mayr, D.P. Bartel, and H.F. Lodish. 2007. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**:7080–7085.