## DAVI CHEN WU

# Estudo da influência de TGF beta na família let7 em células gliais de Müller

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento/Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Wu, Davi Chen Estudo da influência de TGF beta na família let7 em células gliais de Müller / Davi Chen Wu; orientador Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki. -- São Paulo, 2018. 79 p.
Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
1. Micrornas. 2. Retina. 3. Fator de crescimento. 4. Vítreo. 5. Let-7. I. Hamassaki, Profa. Dra. Dânia Emi, orientador. II. Título. **DAVI CHEN WU** 

# Estudo da influência de TGF beta na família let7 em células gliais de Müller

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador(a): Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki

Versão original.

São Paulo 2018

### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Davi Chen Wu
Titulo da Tese:	Estudo da influência de TGF beta na família let7 em células gli- ais de Müller
Orientador:	Profa. Dra. Dânia Emi Hamassaki
A Comissão Julgado	ra dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica
realizada a	/, considerou o(a) candidato(a):
	(  ) Aprovado(a)   (  ) Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universităria "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 11 de março de 2014.

#### PARECER 1163/CEPSH

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 26.02.2014, APROVOU o projeto intitulado: "Estudo da ação de micro-RNA em retinopatias vítreo proliferativas" da pesquisadora DÂNIA EMI HASSAMAKI e aluno DAVI CHEN WU.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: **icb.usp.br**.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 26.02.2015.

Atenciosamente,

Profa. Dra: PAOLO M.A.ZANOTTO Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

A Deus, Criador e Autor da Vida, À minha esposa, amiga e companheira Son, por todo o amor, carinho e apoio. Aos nossos filhos Rafael e Raquel, que são presentes que Deus colocou em nossas vidas. Aos meus pais, que se esforçam para possibilitar a minha formação.

### AGRADECIMENTOS

À Professora Dânia Emi Hamassaki pela oportunidade, orientação, incentivo, confiança depositado em mim e principalmente, pela sua amizade.

À Professora Marinilce Fagundes dos Santos pela ajuda, carinho, preocupação e ensinar sobre migração celular.

À Professora Edna Teruko Kimura pela ajuda, risadas, permitir o uso do laboratório e por compartilhar sobre seu conhecimento sobre microRNAs.

À Professora Cilene Rebouças de Lima pela ajuda com a análise da expressão gênica, com os delta delta CTs, estatísticas e por sempre acreditar que meus resultadpos eram significantes.

À Professora Marinilce Fagundes dos Santos pela ajuda, carinho e preocupação carinho e preocupação.

À Priscilla Sayami Akamine por me ensinar a pipetar com destreza, por ensinar metodologias e pela supervisão durantes os experimentos e por todo o apoio e esforço que dispensou por esses anos.

À Gabriela de Jesus Lustoza Costa pela ajuda, companheirismo e por compartilhar alegrias e angústias.

À Monique Matsuda pela ajuda, discussões, cálculos, estatística, pela mio e supervisão.

À Paula Velloso Siqueira pela ajuda, risadas e empolgação.

Ao Ana, Daniela, Lucas, Vinícius , Rafael e Murilo, amigos do lab de retina e labs vizinhos.

A todos os amigos, funcionários e docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento pelo apoio, suporte técnico, administrativo, científico e respeito.

Aos Professores Licia Mimica, Marcelo Mimica e Suely, da discipina de Microbiologia da FCMSCSP pelo apoio e uso da centrífuga.

Ao amigos da Santa Casa, Teruo Aihara, Roberta Manzano, Ronaldo Sano, fellows, residentes e professores pelo apoio e por caminhar juntos em meio a crise financeira.

À minha querida família: esposa, filhos, pais e irmão que sempre me acompanharam e apoiaram em tudo sempre.

A Deus, por permitir que tudo isso acontecesse, por tomar conta do meu caminho, me cercar de pessoas sensacionais e tudo seja para honra e glória do Seu Nome.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a este projeto, processo número2015/21510-2,

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio financeiro a este projeto.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes". Marthin Luther King

" Pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém." Bíblia Sagrada, Romanos 11:36

### RESUMO

Wu, DC. Estudo da influência de TGF beta sobre miRNAs da família let7 em células gliais de Müller. [Tese (Doutorado em Ciências)]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O vítreo apresenta remodelamento de seus componentes durante a patogênese de doenças como descolamento de retina, buraco de mácula e membrana epirretínica e os fatores que levam a essas alterações ainda não são completamente conhecidos. As células gliais de Müller exercem um papel regulatório importante na retina, principalmente na produção de TGF-beta, e participam na formação de membranas contráteis em doenças da interface vítreo retínica. O TGF-beta está aumentado tanto na retina como no vítreo, em condições de doença, tendo o papel importante de ativar a capacidade contrátil na interface do tecidos estudados. MicroRNAs são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, endógenos, não codificantes e potentes reguladores pós-transcricional da expressão gênica, portanto potenciais alvos terapêuticos eficientes para o tratamento das doenças da interface vítreo-retínica. Em linhagem de células de Müller de rato (rMC-1), o tratamento com TGF-\beta1 em concentração de 5 ng/ml leva a diminuição da expressão gênica de let7-b e let7-c, após 24 horas de tratamento. Já em linhagem humana de Müller (MIO-M1), a expressão gênica de let-7b e let-7c foi alterada com 10 ng/ml de TGF-\beta1 e TGF-\beta2. TGF-\beta2 induziu a uma queda da expressão de let-7b e let-7c, que variou entre 70% e 40 %, após 24 e 48 horas de tratamento. Investigamos os possíveis alvos desses miRNAs, COL1A1, COL1A2 e HAS2, proteínas que possuem relação com as alterações da interface vítreo-retiniana. Entretanto, a análise da expressão de RNAm de COL1A1 e COL1A2 após a estimulação de MIO-M1 com TGF-B1 e TGF-B2 não apresentou alterações. No estudo com gene reporter de luciferase validamos COL1A2 como um novo alvo de let-7b na célula de Müller. Nos estudos funcionais observamos que o let-7c mimético diminui a contração do gel de colágeno, Dessa forma, neste estudo concluímos que o micro-ambiente das células de Müller nas doenças da interface vítreo-retiniana, pode alterar a expressão dos miRNAs da família let7 e, consequentemente, levar à formação de membranas densas e contráteis.

Palavras-chave: MicroRNAs. Retina. Fator de crescimento. TGF-beta. Let-7.

#### ABSTRACT

Wu, DC. TGF beta modulateslet-7miRNAs expression in Muller glial cells. [thesis (PhD in Sciences) ]- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Vitreous remodeling occurs during disease pathogenesis, such as retinal detachment, macular hole and epiretinal membrane, and the factors that lead to these alterations are still not fully determined. Müller glial cells regulate TGF-beta production in the retina and participate in the formation of contractile membranes in vitreoretinal interface.TGF-beta is increased in both vitreous and retina in disease conditions. and are key participants in activating contractible capacity. MicroRNAs are short (19-25 nucleotides), endogenous, non-coding RNA, involved in post-transcriptional gene regulation, that have a potential role as new therapeutic targets for vitreoretinal interface diseases. In rat Müller cell line (rMC-1), treatment with 5ng /ml of TGF-B1 induced a downregulation of let7-b and let7-c expression after 24 hours. In Müller human line (MIO-M1), let-7b and let-7c expression were altered with 10 ng / ml of TGF-B1 and TGF-\u00df2. TGF-\u00df22 induced a downregulation ranging from 70% to 40%, after 24 and 48 hours of treatment. We investigated the possible targets of these miRNAs: COL1A1, COL1A2 and HAS2, proteins that are related to vitreoretinal interface alterations. However, the analysis of COL1A1 and COL1A2 mRNA expression after stimulation of MIO-M1 with TGF-B1 and TGF-B2 did not show any changes. The luciferase gene reporter analysis revealed COL1A2 as a let-7b target in the Müller cell. In the functional studies we observed that the let-7c mimic decreases collagen gel contraction. In summary, we conclude that the microenvironment of Müller cells in vitreoretinal interface diseases may alter the expression of the miRNAs of the let7 family and, consequently, lead to the formation of dense and contractile membranes.

Keywords: MicroRNAs. Retina. Fator de crescimento. TGF-beta. Let-7.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hialócitos respondem a um estímulo inflamatório de forma bimodal22Figura 2– Tratamento de rMC-1 com TGF-beta1 e análise da expressão de
let-7b, let-7c e let-7e
Figura 3 - Tratamento de MIO-1 com TGF-beta1 e TGF-beta2 expressão de
let-7b e let-7c;COL1A1, COL1A2 e HAS2 e ARBP34
Figura 4 - Identificação do colágeno tipo1 cadeia A1 (COL1A1) como alvo de let-7no programa TargetScan
Figura 5 - Identificação do colágeno tipo1 cadeia A2 (COL1A2) como alvo de let-7no programa TargetScan40
Figura 6 - Identificação do hialuronan sintase tipo 2 (HAS2) como alvo de let-7 noprograma TargetScan
Figura 7- Construção de plasmideo repórter para validação da interação let7-com COL1A1
Figura 8 - Análise da expressão de let-7b, let-7c e let-7e em células de Müller con- trole da linhagem rMC-146
<b>Figura 9</b> - Análise da expressão de let7-b, let-7c e let-7e em células de Müller da linhagem rMC-1 após 6 h de tratamento com TGF-β1 nas concentrações de 1, 5 e 10 ng/ml
Figura 10 - Análise da expressão de let7-b, let-7c e let-7e em células de Müller dalinhagem rMC-1 após 24 h de tratamento com TGF-β1 nas concentrações de 1, 5 e10 ng/ml
<b>Figura 11</b> - Análise da expressão de let7-b, let-7c e let-7e em células de Müller da linhagem rMC-1 após 48 h de tratamento com TGF-β1 nas concentrações de 1, 5 e 10 ng/ml
<b>Figura 12</b> - Análise da expressão de let-7b em células de Müller da linhagem huma- na MIO-M1 após 24 e 48 h de tratamento com TGF-β1 e TGF-β2 (10 ng/ml)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos primers usado	para PCR de mRNA37
----------------------------------------	--------------------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

## COLOCAR EM ORDEM ALFABETICA

A <sub>260</sub>	Absorbância no comprimento de onda 260nm
alfa-SMA	Alpha-smooth muscle actin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	DNA complementar
COL1A1	Colágeno tipo1 cadeia A1
COL1A2	Colágeno tipo1 cadeia A2
CRALBP	Cellular retinaldehyde-binding protein
СТ	Cycle threshold
EGF-R	Epidermal growth factor receptor
IB	Instituto de biologia
IVTS	Internacional vitreomacular traction study
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HAS2	Hialuronan sintase tipo 2
IGF-1	Insulin growth factor 1
MIO-M1	Linhagem celular de células de Müller humana
miRNAs	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro
ОСТ	Optical coherence tomography
PCR	Polimerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
rMC-1	Linhagem celular de Müller de rato
RNU6B	Small nuclear RNA 6B
014000	

SMADS Transcription factor proteins – Mother against decapentaplegic homolog

- Smurfs SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase
- Sno RNA nucleolar snoRNA
- VS40 Vírus simian 40
- TGF Transforming growth factor
- TGFR1 Receptor 1 de TGF-β
- TGFR2 Receptor 2 de TGF-β
- VEGF Vascular endothelial growth factor
- USP Universidade de São Paulo

## MODELO LISTA DE SÍMBOLOS

β-	Beta
С	Celsius
Δ	Delta
ml	mililitro
ng	Nanograma
$\mu$ l	Microlitro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1. Estrutura da retina	19
2. Estrutura do vítreo	21
3. Doenças da interface vítreo-retínicas	23
1.4 Tipos Célulares envolvidos na formação da membrana contrátil	27
1.5 TGF-beta	28
1.6 MicroRNAS	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Linhagens celulares	32
3.1.1 Linhagem de rato (rMC-1)	32
3.1.2 Linhagem humana (MIO-M1)	32
3.2 Tratamentos	32
3.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	35
<u>3.3.1 Extração de RNA</u>	35
3.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR quantitativo em tempo real p	<u>para análise</u>
de microRNAs	35
<u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o</u>	<u>de genes de</u>
<u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse</u>	<u>de genes de</u> 36
<ul> <li><u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse</u></li> <li><b>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</b></li> </ul>	<u>de genes de</u> 36 37
<ul> <li><u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse</u>.</li> <li><b>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</b></li></ul>	<u>de genes de</u> 36 37 
<ul> <li>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse.</li> <li>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</li></ul>	<u>de genes de</u> 36 37 
<ul> <li>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse.</li> <li>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</li></ul>	<u>de genes de</u> 36 37 38 
<ul> <li><u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse</u>.</li> <li><b>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</b></li></ul>	<u>de genes de</u> 
<ul> <li>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse.</li> <li>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</li></ul>	<u>de genes de</u> 
<ul> <li>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse.</li> <li>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</li></ul>	<u>de genes de</u> 
<ul> <li><u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse</u>.</li> <li><b>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</b>.</li> <li><b>3.5 Busca on-line por alvos preditos do microRNA let-7</b>.</li> <li><b>3.6 Ensaio de luciferase para validação de alvos de let-7</b>.</li> <li><u>3.6.1 Construção do vetor pmirGLO contendo 3'-UTR COL1A1</u>.</li> <li><u>COL1A2</u>.</li> <li><u>3.6.2 Ensaio de gene repórter Luciferase</u>.</li> <li><b>3.7 Ensaio funcional</b>.</li> <li><u>3.7.1 Ensaio de contração em gel de colágeno</u>.</li> </ul>	<u>de genes de</u> 
<ul> <li>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise o interesse.</li> <li>3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial</li></ul>	<u>de genes de</u> 

4 RESULTADOS
4.1 Expressão de let-7b, let-7c e let-7e em linhagem de células de Müller de ratos
(rMC-1) tratadas com TGF-β146
4.2 Avaliar a expressão de let-7b e let-7c em linhagem humana de células de Müller
(MIO-M1) tratadas ou não com TGF-β1 e TGF β250
4.3 Influência de TGF-β1 sobre a expressão de possíveis alvos de let-7 (Colágeno 1A1,
Colágeno 1A2 e Hialuronan Sintase 2)51
4.4 Ensaio de gene repórter Luciferase para validação de COL1A1 e COL1A2 como
alvos de let-7
4.5 Ensaio funcional de contração do gel de colágeno para avaliar a influência de let-7 
4.6 identificação de miRNAS da família let-7 em amostras de vítreo humano coletadas
durante a cirurgia de vitrectomia posterior via pars plana em olhos com diagnósticos
de buraco macular, membrana epirretiniana e descolamento de
retina
5 DISCUSSÃO
6 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS

#### 1 INTRODUÇÃO

Uma breve introdução sobre a estrutura, fisiologia e anatomia da retina e do vítreo será apresentada para contextualização deste estudo.

#### 1.1 Estrutura da retina

A retina, que no latim significa rede, é um fino e delicado tecido nervoso ultra especializado, localizado na superfície interna do segmento posterior do olho, que contém os três primeiros neurônios da via visual aferente, dos quais os fotorreceptores, neurônios de 1ª. ordem, são células fotossensíveis que se tornam hiperpolarizadas na presença de luz. A partir daí, a informação visual segue com as células bipolares, neurônios de 2ª ordem, que processam os sinais em conjunto com as células horizontais e amácrinas possivelmente por células não neuronais, e os enviam para as células ganglionares, neurônios de 3ª ordem. Os axônios das células ganglionares formam o nervo óptico, que envia informações já processadas para áreas visuais do sistema nervoso central (Siqueira , 2009).

Histologicamente, a retina é dividida em 10 camadas: epitélio pigmentado da retina, camada de fotorreceptores (segmento externo dos cones e bastonetes, que contém o pigmento visual, e o segmento interno, que contém as mitocôndrias, núcleos, etc.); três camadas compostas por corpos celulares (nuclear externa e interna e células ganglionares); duas camadas intermediárias sinápticas (plexiformes interna e externa); duas membranas limitantes (membrana limitante interna e externa) e a camada de fibras das células ganglionares ou camada de fibras nervosas (Sebag, 2014).

A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores. Seus prolongamentos sinápticos, juntamente com os das células bipolares e horizontais, formam a camada plexiforme externa. Os corpos celulares das células bipolares estão situados na nuclear interna, que também é constituída pelos corpos celulares das células amácrinas e horizontais. Na região foveal, uma célula bipolar faz sinapse com um fotorreceptor; entretanto, na retina periférica, uma célula bipolar recebe o estímulo de mais de 100 fotorreceptores (Sebag, 2014). A segunda camada sináptica, a plexiforme interna, é responsável pela transmissão vertical da informação visual entre as células bipolares e ganglionares, e nela há também uma complexa rede moduladora, composta pelas células amácrinas.

A membrana limitante externa é formada pelo conjunto de complexos juncionais que unem as células de Müller aos fotorreceptores, no intervalo entre os seus segmentos externos e interno. A membrana limitante interna, por sua vez, é formada pela lâmina basal e os pés terminais das células de Müller e faz a interface da retina com a hialóide posterior do vítreo. Ambas as membranas limitantes não são consideradas membranas verdadeiras.

As células gliais são representadas pelos astrócitos, pela micróglia e principalmente pelas células de Müller, que formam o arcabouço de sustentação da retina, e têm seus limites definidos entre as membranas limitantes externa e interna. Têm também função protetora e de controle da homeostase retiniana.

As células de Müller e os astrócitos possuem um abundante citoesqueleto rico em filamentos gliais característicos (GFAP –proteína ácida fibrilar glial) e estão associados à presença de inúmeras junções comunicantes ("gap) e junções de adesão formando um citoesqueleto em forma de "túneis" que interligam vasos e neurônios na retina interna e externa. Essa relação íntima entre as células gliais decorre do fato de que ambas as células possuem alta permeabilidade ao potássio, o que permite a propagação de metabólitos como o glutamato, glutamina e lactato entre as células gliais, à semelhança de um sincício glial (Reichenbach, 2013).

Os astrócitos formam os pés vasculares que envolvem o sistema vascular criando a barreira hemato-retínica, componente importante que preserva a integridade da retina. Na retinopatia diabética, a quebra da barreira hemato-retínica leva a um extravasamento de constituintes plasmáticos para a retina e para o vítreo, formando o edema macular e levando à baixa acuidade visual (Sen, 1988).

A micróglia é formada por uma subpopulação altamente especializada de fagócitos mononucleares. Na retina, está localizada entre as camadas da fibras nervosas e células ganglionares, na camada nuclear interna e camada plexifome externa. Tem um papel importante no sistema de defesa e homeostase ocular.

#### 1.2 Estrutura do vítreo

O vítreo é uma matriz extracelular altamente hidratada e avascular que participa da homeostase, estrutura e troca de moléculas com as estruturas adjacentes. É um gel viscoelático, composto em mais de 98% por água, com o índex refrativo de 1,33. Sua viscosidade é 2 a 4 vezes maior do que a água, e varia com a idade. Consiste de diferentes macromoléculas, sendo que as mais importantes são: colágeno (especialmente tipos I, II, V, XI e IX), glicosaminoglicanos (hialuran) e glicoproteínas (fibrilina e opticina) (Sebag, 2014).

A rede de fibrilas de colágeno confere a essa estrutura a rigidez do corpo vítreo, e as moléculas de hialuronan preenchem esse espaço com a consistência de gel, promovendo uma estabilização. A distribuição de proteínas no vítreo não ocorre de forma uniforme, indicando diferentes atividades metabólicas em suas diferentes áreas. A estrutura do vítreo lhe confere uma característica de reservatório farmacológico, prolongando a ação de medicamentos como corticóides e anti-VEGF, sendo muito importante para o tratamento de doenças inflamatórias e vasculares.

A degeneração vítrea, também conhecida como sinérese vítrea, inicia-se na adolescência e o seu sintoma habitual são as moscas volantes, que são pequenas opacidades translúcidas móveis de diferentes formatos que se movem no campo visual, perceptíveis com os movimentos oculares. O córtex vítreo sofre uma redução desigual de densidade formando cavidades líquidas conhecidas como bursas (Sebag, 2014).

Com o processo de descolamento do vítreo posterior, algumas condições patológicas podem ocorrer, como a formação de roturas de retina, opérculos ou hemorragias vítreas, levando a um descolamento de retina. A tração exercida sobre a retina pode levar à formação de um buraco de mácula ou síndrome de tração vítreo macular. A delaminação e o remanescente do córtex vítreo sobre a retina associado à ativação de membranas contráteis pode levar à formação de membranas epirretínicas (Duker, 2013).

Apesar de raras, cerca de 90% das células do vítreo são constituídas por hialócitos, e o restante por fibroblastos. Os hialócitos podem ser encontrados no córtex, particulamente perto da base vítrea, do disco óptico e dos vasos da retina. Essas células apresentam características morfológicas, imunofenotípicas e funcionais semelhantes a macrófagos derivados de medula óssea, exceto por possuírem um número reduzido de lisossomos. Os hialócitos produzem colágeno e ácido hialurônico e têm sido identificados com anticorpos contra CD45, CD11a, CD64 e CD163 (ED-2) (Wu, 2014).

Dentre as possíveis funções dos hialócitos temos: a modulação das respostas imunes intravítreas, levando à inibição de reação imunológica (atividade anti-inflamatória), a remoção enzimática de fibrina que mantém a transparência do vítreo, a regressão do sistema vascular hialóide e a síntese da matriz extracelular.

Alterações patológicas dos hialócitos estão envolvidas com a retinopatia diabética, vitreorretinopatia proliferativa, membrana epirretínica, doenças da interface vítreo retiniana, assim como a formação de membranas cicatriciais contráteis. O aumento da celularidade vítrea é um indicativo de processos inflamatórios como uveítes intermediárias.



**Figura 1** - Hialócitos respondem a um estímulo inflamatório de forma bimodal (Wu e Hamassaki, 2017)

#### 1.3 Doenças da interface vítreo-retínica

O ponto comum das doenças da interface vítreo-retínicas é a tração que é exercida sobre a retina. Essa tração é gerada pela tensão de forças entre o vítreo, em particular do córtex vítreo posterior, e a membrana limitante interna da retina. A tração pode ocorrer: a) na retina periférica, e, neste caso trataremos do descolamento de retina ou b) na região macular, e, neste caso, trataremos das doenças buraco de mácula e membrana epirretínica.

O descolamento de retina foi reconhecido pela primeira vez no início de 1700 por Saint-Yves, mas o diagnóstico clínico permaneceu como uma incógnita até Helmholtz inventar o oftalmoscópio em 1850. Em 1863, von Graefe descreveu a sua associação com roturas retínicas e o seu curso natural, o qual, quando não é tratado leva à perda visual irreversível (Figueroa; López-Caballero;Contreras, 2010). O descolamento de retina ocorre quando fortes mecanismos fisiológicos e anatômicos que mantêm a retina neurossensorial unida ao epitélio pigmentado são rompidos. Há três tipos de descolamento de retina: exsudativo, tracional e regmatogênico, sendo este último o mais prevalente (Siqueira e Oréfice, 2009).

A associação de alterações do vítreo que levam à formação de roturas retínicas, que consequentemente evolui com o descolamento regmatogênico, foi reconhecida logo após a invenção do oftalmoscópio indireto. Von Graefe afirmava que era necessário o corte de membranas do vítreo para o tratamento do descolamento de retina para aliviar as trações e restabelecer a anatomia e fisiologia da retina (von Graefer, 1863). A patogênese do descolamento de retina regmatogênico é complexa e envolve fatores hereditários, alterações da estrutura do vítreo e processos de adesão na interface vítreo-retínica, que predispõem à formação de roturas e consequente separação da retina neurossensorial do epitélio pigmentado da retina.

A incidência do descolamento de retina regmatogênico é de 0,015% da população geral. A prevalência é maior entre os altos míopes (5%) e entre os casos que apresentaram complicações na cirurgia de catarata (10%). Trata-se de potencial quadro de cegueira irreversível, e sua caracterização torna-se de suma importância na aplicação de medidas preventivas e curativas (Nassaralla e Nassaralla, 2004; Kara José; Alves; Oliveira, 1992).

O tratamento cirúrgico do descolamento de retina regmatogênico consiste em selar as roturas retínicas, aliviar as trações que o vítreo ou outras membranas exer-

cem e reaproximar o tecido neurossensorial ao epitélio pigmentado da retina. Os avanços no controle da fluídica, a melhora do corte da sonda de vitrectomia, evitando assim tração sobre a retina, e a diminuição do calibre, de forma geral, dos materiais empregados na cirurgia, permitiram que a cirurgia de descolamento de retina apresentasse um índice de sucesso anatômico de 90% dos casos (Tani; Robertson; Langworthy 1981; Stanford e Chignell, 1985). O princípio básico da cirurgia vitreorretínica em descolamento de retina é fechar e selar as roturas retínicas e liberar qualquer tração periretínica.

A formação da retinopatia vitreo proliferativa é responsável por 80% dos casos em que houve falha do tratamento cirúrgico e consequente recidiva do descolamento de retina (Zhao, 2018). A retinopatia vítreo-proliferativa se caracteriza pela proliferação celular de ambas superfícies da retina descolada e face posterior do vítreo, levando à formação de membranas contráteis perirretínicas (Siqueira et al., 2009). Inúmeras terapias médicas, como o uso de 5-fluoracil, corticóides, colchicinas e retinóides, foram usadas para evitar a formação da retinopatia vítreo proliferativa, mas sem sucesso (Siqueira, 2009).

O descolamento de retina tracional é a principal complicação da retinopatia diabética proliferativa. A formação de membranas contráteis, com a presença de neovasos, é responsável por hemorragias e descolamento de retina de difícil tratamento cirúrgico e pobre resultado visual.

A retinopatia vítreo-proliferativa pode ser vista como um processo de cicatrização de tecidos especializados. Esse processo é caracterizado pela migração e proliferação de vários tipos celulares, incluindo hialócitos, células do epitélio pigmentado da retina e células gliais de Müller. O estudo morfológico de membranas removidas cirurgicamente mostra que as membranas derivam de células como fibroblastos e macrófagos; entretanto, observa-se um aumento importante da expressão de  $\beta$ -tubulina classe III, indicador da expressão de células do epitélio pigmentado da retina (Sen, 1988)

O buraco macular é um defeito anatômico que leva à separação de todas a camadas da retina neural na região da fóvea. Ele foi descrito pela primeira vez em 1869 por Knapp e Noyes, e posteriormente classificado e explicado por Gass (1988). Baseado em observações clínicas de discretas lesões foveolares que o buraco macular causa, ele postulou o mecanismo de tração tangencial que o vítreo posterior

cortical exerce sobre a fóvea (Gass, 1988). Com o avanço tecnológico, em especial da tomografia de coerência óptica (OCT), observa-se com clareza o vítreo e a sua relação de tração e adesão sobre a fóvea, mesmo em estágios iniciais da doença. Os pacientes com buraco macular apresentam sintomas como metamorfopsias, escotoma central e perda da acuidade visual. O sinal de Watzke-Allen, o escotoma absoluto na linha que é observada durante exame de biomicroscopia de fundo, é importante para o diagnóstico da doença.

O buraco macular acomete indivíduos a partir da sétima década de vida, podendo também acometer pessoas mais jovens. A sua prevalência populacional é 0,33 a 0,7% e 7,8 casos novos a cada 100.000 por ano (Mitchell, 1997). Pode ser classificado, segundo o Internacional Vitreomacular Traction Study (IVTS), como pequeno (diâmetro do buraco menor que 250 µm), médio (250-400) e grande (diâmetro do buraco maior que 400 µm), baseado na medida mais estreita do buraco no exame de OCT (Duker, 2013). Casos iniciais podem apresentar uma melhora do quadro anatômico de forma espontânea. Entretanto, caso isso não ocorra, necessitam de um tratamento cirúrgico, que consiste na remoção do vítreo cortical posterior, indução do descolamento do vítreo posterior, remoção da membrana limitante interna, colocação de um gás tamponante ou ar ambiente, solicitando-se ao paciente que ele fique com a face voltada para baixo (Kelly e Wendel, 1991). O índice de sucesso anatômico de fechamento do buraco macular é de 90%, em geral, sendo que 45% dos casos tem uma boa recuperação visual (acuidade visual de 20/40 ou melhor). Todavia, em casos com buraco macular grande (maior que 400 µm), o índice de sucesso anatômico de fechamento cai para 44% (Tam ,2018).

Há diversas técnicas cirúrgicas para tentar a recuperação do paciente no caso de buracos maculares grandes e recorrentes. Michalewska descreveu a técnica do flap invertido da membrana limitante interna, que consiste em não a remover completamente, deixando-a presa na borda do buraco, e posicionando o flap invertido de forma que o cubra completamente. A técnica se aproveita do fato de que o flap da membrana limitante interna contém fragmentos da célula de Müller, que pode induzir gliose na retina e na superfície da membrana. Portanto, o flap funciona como uma membrana basal que orientará o processo de cicatrização e proliferação tecidual (Michalewska; Michalewski; Adelman, 2010).

O uso de medicamentos adjuvantes para o fechamento de buraco macular é estudado constantemente, dentre eles o TGF-β. Quando ele é injetado durante a cirurgia, produz um efeito estimulador da fibrose, promovendo maior adesão entre retina e coróide, podendo ser estudado para auxiliar o tratamento de roturas retínicas em descolamento de retina e fechamento de buraco macular (Smiddy , 1989).

A membrana epirretínica possui várias nomenclaturas para descrevê-la, dentre elas temos dobra de retina primária, gliose retínica secundária, maculopatia em celofane, gliose pré-retínica macular, membrana vítreo pré-retínica, contração da interface vitreorretínica, puker macular, membrana epirretínica astrocítica e proliferação epimacular. Ela causa baixa acuidade visual na região central do campo visual de forma gradual, e pode evoluir com metamorfopsias, micropsias e diplopia monocular. Os quadros iniciais, em geral, são assintomáticos e de lenta evolução.

Em geral acomete indivíduos acima de 50 anos e nessa faixa etária tem uma prevalência de 7-12% (Mitchell , 1997), época que coincide com o descolamento do vítreo posterior fisiológico. A membrana epirretínica foi descrita em associação com inúmeras condições oculares e doenças, entre elas doenças vasculares da retina, doenças oculares inflamatórias, pós trauma, condições pós cirúrgicas, tumores intraoculares e distrofias retinianas.

A lesão estrutural da região macular ocorre devido à formação de uma membrana celular contrátil na região pré-macular, e o tratamento cirúrgico consiste na sua remoção. Entretanto, o resultado visual final nem sempre é satisfatório. A biogênese da membrana pré-macular deriva de uma incompleta e anômala separação do vítreo posterior, permitindo que células e colágeno remanescentes permaneçam aderidos à mácula. Em geral, as principais células envolvidas na formação são os hialócitos e células de Müller, mas astrócitos, miofibroblastos, fibrócitos e células inflamatórias também são encontrados em estudos com membranas removidas cirurgicamente (Kenyon; Michels, 1977). Estudos demostram a migração das células de Müller pelas roturas da membrana limitante interna causadas pela separação do vítreo, levando à formação de uma membrana contrátil (Bellhorn; Wise; Henkind, 1975).

A interface entre a retina e o vítreo tem um papel muito importante na patogênese dessas três doenças retinícas descritas, e, classicamente, quando ocorre na região macular, temos o buraco macular e a membrana epirretínica, também conhecidas como doenças da interface vítreo retínicas. O descolamento de retina regmatogênico também tem a sua patogênese nessa mesma interface, só que na região periférica da retina. Entretanto, ressaltamos que também envolve a interface retina e epitélio pigmentado da retina na evolução da doença, principalmente para formas complicadas como a retinopatia vítreo-proliferativa. Neste estudo, vamos utilizar o termo doenças da interface vitreorretínica para essas três doenças.

#### 1.4 Tipos celulares envolvidos na formação da membrana contrátil

Os hialócitos são encontrados no vítreo cortical, adjacentes à superfície interna da retina. Em condições fisiológicas, os hialócitos contribuem para manter a transparência do vítreo, mas em doenças da interface retínicas, observam-se alterações morfológicas, alteração da matriz extracelular e aumento do número de hialócitos (Sebag, 2014).

As células do epitélio pigmentado da retina, em situações de descolamento de retina regmatogênico, são encontradas dispersas no vítreo e em membranas contráteis da retinopatia vítreo proliferativa. Em modelos animais de retinopatia vítreo proliferativa, observa-se que as células do epitélio pigmentado da retina sofrem transformações metaplásicas com morfologias semelhantes a macrófagos (Kita, 2008).

Estudos de membranas perirretínicas demonstram que as células do epitélio pigmentado da retina se transdiferenciam em miofibroblastos. As células fibroblásticas contêm miofibrilas em seu citoplasma (Leask; Holmes; Abraham, 2002) que produzem o efeito contrátil das membranas da retinopatia vítreo proliferativa. Clinicamente, isso leva a novo descolamento de retina, dificultando a execução de procedimentos cirúrgicos e, assim, comprometendo o resultado visual, sendo uma grande causa de cegueira legal em casos complicados.

As células gliais, particularmente as células de Müller, formam as membranas que levam a complicações importantes em doenças da interface vitreorretínicas e retinopatia diabética. Essas células são essenciais para o funcionamento da retina, em razão das suas funções estruturais, na barreira hemato-retínica, tamponamento de íons e neurotransmissores, entre outros. Membranas formadas apenas com células de Müller não têm características contráteis, sugerindo que os outros componentes celulares estão envolvidos com a propriedade tracional das membranas da retinopatia vítreo proliferativa, especialmente células do epitélio pigmentado da retina (Bringmann; Wiedemann, 2009). Entretanto, as células de Müller exercem um importante papel na produção de citocinas e na regulação do processo de cicatrização da retina (Eastlake, 2015). Além de produtoras de citocinas, as células de Müller são alvos desses fatores inflamatórios. Por exemplo, se elas forem estimuladas com citocinas, como TGF-β1 e TGF-β2, Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), elas adquirem a capacidade de gerar forças tracionais *in vitro* (Guidry, Bradley; King, 2003).

Portanto, a compreensão da patogênese da formação da retinopatia vítreo proliferativa é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas. Os fatores de crescimento, como o TGF-  $\beta$ , IGF-1 e PDGF, fator de crescimento de hepatócitos e endotelinas, modulam a contração cicatricial das membranas prérretinianas. (Bringmann et al, 2009)

#### 1.5 TGF- β

TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional, com 3 isoformas (TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3) que regula a diferenciação, apoptose, migração, resposta imunológica celular e produção de proteínas da matriz extracelular. Na via canônica, TGF- $\beta$  se liga e ativa receptores serina-treonina do tipo I e tipo II. Estes transduzem a sinalização até o núcleo através da fosforilação das proteínas R-SMADS (SMADS 2 e 3), que depois se associam a co-SMADs (SMAD4). O complexo SMAD acumula no núcleo e modula a transcrição de genes-alvo. O controle da via de TGF-beta ainda depende da regulação negativa exercida pelo SMAD inibitório (SMAD7) e pelas enzimas E3 de ubiquitinação Smurfs (Kimura et al, 2007).

No olho, TGF- $\beta$  é expresso acima do normal no vítreo de pacientes com retinopatia vítreo proliferativa, especialmente o TGF- $\beta$ 2, que foi a isoforma predominante. Ele também contribui na transdiferenciação de hialócitos em células miofibroblasto com alfa-actina de músculo liso, que são responsáveis pela contração do colágeno, sugerindo ainda sua atuação na contração de membranas das doenças da interface vítreo retínicas (Hirakayama et al., 2004).

As membranas contráteis estão relacionadas a uma proteína contrátil, a cadeia leve da miosina através da via actina-miosina, Rho-Kinase, que participa da adesão celular, migração, proliferação e apoptose, modulando diretamente a via da fosforilação da cadeia leve da miosina (Kita et al., 2008). Em vítreo humano de pacientes com retinopatia vítreo proliferativa, detectouse uma grande concentração de TGF-beta1 e TGF-beta-2. Em coelho, o bloqueio de Rho- kinase levou à formação de membranas sem contratilidade (Kita et al., 2008).

Estudos da membrana de retinopatia vítreo proliferativa demonstram que o PDGF está aumentado, e modelos experimentais sugerem que esse fator é um prérequisito para a formação da retinopatia vítreo proliferativa. Existem cinco isoformas e dois tipos de receptores de PDGF. Os modelos experimentais de retinopatia vítreo proliferativa demonstram que os receptores alfa estão aumentados e têm um papel importante na contração de membranas perirretínicas (Lei et al., 2009).

#### 1.6 MicroRNAs

MicroRNAS (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos, endógenos e não codificantes. Eles inibem o processo de tradução de RNA mensageiro (mRNA) através do pareamento imperfeito, levando à sua posterior degradação (Kimura, 2007).

Descritas originalmente por Lee e Feinbaum, que em 1993, estudando *Cae-norhabditis elegans*, observaram um pequeno RNA regulatório que não codifica proteínas, mas age como potente regulador pós-transcricional da expressão gênica (Lee, 1993). O miRNA let-7 foi o segundo miRNA descoberto em *C. elegans*, observando-se que a sua sequência é preservada entre espécies diferentes sendo o primeiro identificado em vertebrados (Pasquinelli , 2000).

Os miRNAs foram rapidamente associados a marcadores tumorais devido ao seu perfil preciso na discriminação de tecidos tumorais. Let-7 foi o primeiro miRNA a ser validado com a formação de tumores no pulmão (Johnson , 2005).

Wohl e Reh (2016) mostraram o perfil de expressão de miRNAs na célula de Müller de camundongos, e observaram que alguns miRNAs eram altamente expressos em neurônios, outros nas células de Müller e um terceiro tipo altamente expresso em glia de Müller e neurônios, caso da família let-7. Em zebrafish, os membros da família let-7 regulam a desdiferenciação de células de Müller e a regeneração da retina (Ramachandran; Fausett; Goldman, 2010).

A associação de miRNA com a doenças oculares, principalmente as doenças vítreo-retínicas, têm aumentado nos últimos anos (Kaneko e Terasaki, 2017). Foi observada a participação de miR-29 no desenvolvimento de membranas fibróticas,

sendo que, em condições fisiológicas, ele funciona como um importante mediador na síntese de matriz extracelular em trabeculado humano (Villarreal et al., 2011). Takayama e colaboradores (2016) mostraram níveis aumentados de miR-148a no vítreo de pacientes com descolamento de retina; além disso, a transfecção com miR-148 mimético em células do epitélio pigmentado promoveu aumento da expressão da alfa-actina do músculo liso e aumento da migração.

Estudos em modelos de retinopatia diabética em olhos de ratos, correlacionam o aumento da concentração de miR-146 (Kovacs, 2011) e o miR-200b, modulando o fator de crescimento vascular no vítreo (McArthur, 2011).

### 2 OBJETIVOS

Apesar dos avanços na área, as doenças da interface vítreorretínica continuam sendo uma das principais causas de baixa visão ou até mesmo cegueira. Nesse contexto, este projeto visa investigar os fatores que levam à formação de membranas proliferativas contráteis, com especial ênfase para o estudo da contribuição de miRNAs da família let-7 que estão relacionados à via do TGF-β em células gliais de Müller.

### **Objetivos Específicos:**

- avaliar a expressão de let-7b, let-7c e let-7e em linhagem de células de Müller de ratos (rMC-1) tratadas ou não com TGF-β1;
- avaliar a expressão de let-7b e let-7c em linhagem humana de células de Müller (MIO-M1) tratadas ou não com TGF-β1 e TGF-β2;
- analisar a expressão gênica de alvos preditos de let-7 (COL1A1, COL1A2 e HAS2) tratadas ou não com TGF-β1 e TGF-β2;
- ensaio de gene repórter Luciferase para validação do COL1A1 e COL1A2 como alvos de let-7
- ensaio funcional de contração do gel de colágeno para avaliar a influência de let-7
- identificar miRNAS da família let-7 em amostras de vítreo humano coletadas durante a cirurgia de vitrectomia posterior via pars plana em olhos com diagnósticos de buraco macular, membrana epirretínica e descolamento de retina.

Portanto, a identificação dos miRNAs, seus alvos e funções deve trazer contribuições relevantes para o entendimento e escolha de alvos terapêuticos mais eficientes para o tratamento das doenças da interface vítreo-retínica.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A seguir, uma breve descrição das metodologias utilizadas neste estudo.

### 3.1 Linhagens celulares

Foram empregadas, neste trabalho, duas linhagens de células gliais de Müller, que serão descritas abaixo.

#### <u>3.1.1 Linhagem de rato (rMC-1)</u>

A linhagem celular de Müller de rato (rMC-1) (Sarthy et al.,1998), imortalizada após a transfecção do vírus simian 40 (VS40), apresenta preservação de características fenotípicas das células de Müller da retina e capacidade de expressar GFAP (glial fibrillary acidic protein) e CRALBP (cellular retinaldehyde-binding protein).

#### <u>3.1.2 Linhagem humana (MIO-M1)</u>

A linhagem celular de células de Müller humana, imortalizada espontaneamente (MIO-M1) (Limb, GA et al., 2002), mantém em cultura, a expressão de GFAP (glial fibrillary acidic protein), CRALBP (cellular retinaldehyde-binding protein), EGF-R (epidermal growth factor receptor), alfa-SMA (alpha-smooth muscle actin) e glutamina sintetase. As células MIO-M1 foram gentilmente cedidas pela Dra G. Astrid Limb (Division of Cell Biology, Institute of Ophthalmology, UCL, London, UK).

#### 3.2 Tratamentos

Células de Müller de rato da linhagem rMC-1 foram semeadas em placa de 24 poços na densidade de  $5x10^4$  células/poço. Após 24 h de adesão, as células foram privadas de soro por 24 h. Após esse período, o tratamento consistiu na adição de TGF- $\beta$ 1 (R&D Systems) em 3 diferentes concentrações, 1, 5 e 10 ng/ml. As células foram coletadas após 6, 24 e 48 h da adição de TGF- $\beta$ . Os experimentos foram realizados em dois experimentos independentes, conforme mostrado na figura 2.



**Figura 2** – Esquema de tratamento das células de Muller da linhagem de rato (rMC-1) com TGF-beta1 em diferentes concentrações e tempos para posterior análise daexpressão de miRNAs (let-7b, let-7c e let-7e).

Células de Müller da linhagem humana MIO-M1 foram plaqueadas e privadas de soro nas mesmas condições acima. O tratamento foi realizado com a adição de TGF-β1 ou TGF-β2 (R&D Systems) na concentração de 10ng/ml. As amostras foram coletadas após 24 e 48 h de tratamento, e os experimentos foram repetidos em quatro experimentos independentes para os miRNAs (let-7b e let-7c), conforme mostrado na figura 3. Para o estudo de COL1A1, COL1A2 e HAS2, os experimentos foram feitos em sextuplicata.



**Figura 3** - Esquema de tratamento das células de Muller da linhagem humana (MIO-M1) com 10 ng/ml de TGF-beta1 e TGF-beta2 em diferentes tempos (24 h e 48 h) para posterior análise da expressão de miRNAs (let-7b e let-7c) ou dos alvos (COL1A1, COL1A2 e HAS2 e ARBP).

#### 3.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

#### <u>3.3.1 Extração de RNA</u>

O RNA total foi extraído de amostras celulares (rMC-1 e MIO-M1) e de amostras de vítreo, de acordo com a metodologia desenvolvida por Chomczynki e Sacchi (1987). Foi utilizado o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante.

As amostras de vítreo humano foram homogeneizadas por sonicação, para auxiliar a dissociação da fase gelatinosa, e as amostras celulares foram homogeneizadas manualmente, diversas vezes, por *up and down*.

Após homogeneização e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, o clorofórmio foi adicionado as amostras celulares e de vítreo, e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos, 4°C. A fase aquosa, contendo o RNA, foi coletada e o RNA precipitado com isopropanol. Após lavagem com etanol 75% e posterior centrifugação a 12.000g por 5 minutos, 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi eluído em água destilada ultrapura (Invitrogen), livre de RNAse e DNAse.

A quantificação do RNA foi realizada no equipamento Biomate 3 (Thermo Scientific) por espectrofotometria, observando a leitura de absorbância no comprimento de onda 260nm (A<sub>260</sub>) e a razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> foi calculada para avaliar a pureza da extração (ausência de contaminação proteica), considerada satisfatória entre 1,8 -2,0.

## <u>3.3.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR quantitativo em tempo real para</u> análise de microRNAs

A transcrição reversa gerando cDNA específico para análise dos microRNAs let-7b, let-7c e let-7e em amostras celulares, e let-7b, let-7d e let-7e em amostras de vítreo, foi realizada utilizando os reagentes do kit TaqMan<sup>TM</sup> MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante: 10ng de RNA total, 1  $\mu$ l de transcriptase reversa Multiscribe<sup>®</sup>, na presença de 1,5  $\mu$ l de tampão 10x, 0,15  $\mu$ l de mix de dNTP (100mM), 0,19  $\mu$ l de inibidor de RNAse (20U/  $\mu$ l), 4 $\mu$ l de água ultrapura (livre de RNAse) e 3  $\mu$ l de primer "*stem-loop*" específico para os microRNAs de interesse contidos no kit Taqman® microRNA Assay (hsa-let-7b Assay ID 000378, hsa-let-7c Assay ID 000379, hsa-let-7d Assay ID 002283 e hsa let-7e Assay ID 002406, Applied Biosystems). A reação de transcrição reversa foi realizada de acordo com as seguintes condições: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 min
nutos, 85°C por 5 minutos e manutenção das amostras a 4°C, utilizando o termociclador T100<sup>™</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad).

Para a reação de PCR em tempo real, as amostras de cDNA foram diluídas 6,7x, através da adição de 87,5  $\mu$ l de água ultrapura (livre de RNAse e DNAse). Foram utilizados os conjuntos de sonda e primer específicos para cada microRNA, marcados com fluoróforo FAM do kit Taqman® microRNA Assay, 1ul, (ID assay já descritos anteriormente), somado a 10 $\mu$ l de Taqman® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG 2x (Applied Biosystem) e misturados a 9 $\mu$ l de cDNA diluído. As reações foram processadas em duplicata, no termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, nas seguintes condições: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Como referência para normalização da expressão dos microRNAs de interesse, foi utilizada a detecção dos níveis endógenos do pequeno RNA nuclear 6B -RNU6B (ID assay 001093) para a linhagem de células de Müller humana MIO-M1, e os níveis endógenos do pequeno RNA nucleolar snoRNA (ID assay 001718) para as células de Müller de rato rMC-1.

A análise das mudanças relativas da expressão gênica dos dados provenientes do PCR dos experimentos foi realizada pelo método proposto por Livak e será descrito de forma sucinta a seguir. O  $\Delta$ CT do alvo (diferença entre o CT do alvo com a CT do gene referência) foi calculado para todas as amostras controles e tratadas. O  $\Delta$ CT do calibrador foi determinado a partir da média de 6 amostras controle não tratadas do tempo em estudo em triplicata. A diferença entre o  $\Delta$ CT do alvo com o  $\Delta$ CT do calibrador foi utilizada para calcular o  $\Delta\Delta$ CT e assim calculado o fold change, que demonstra a diferença de expressão normalizada do gene estudado nas amostras tratadas em relação a expressão normalizada da amostra controle não tratada (Livak e Schmittgen, 2001).

# <u>3.3.3 Síntese de DNA complementar (cDNA) e PCR em tempo real para análise de genes de interesse</u>

Para a síntese de cDNA total, foi utilizado o protocolo do primer Oligo dT<sub>(20)</sub> (Invitrogen), capaz de hibridizar com a cauda poli A do RNA mensageiro. O mix foi preparado utilizando 2 $\mu$ g de RNA total obtido das amostras celulares (MIO-M1), seguido da adição de 1  $\mu$ l de primer oligo (dT)<sub>20</sub> 50  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de mix de dNTP (10 mM) e

água destilada ultrapura (livre e RNAse e DNAse) para volume final de 13  $\mu$ l. Após incubação a 65°C por 5 minutos, e seguido de 1 minuto em gelo, foi adicionado 4  $\mu$ l de tampão First-Strand 5X, 1  $\mu$ l de DTT 0,1M, 1  $\mu$ l de RNAseOUT e 1  $\mu$ l de enzima Transcriptase Reversa SuperScript <sup>TM</sup> III. Os reagentes foram homogeneizados e incubados a 50°C por 30-60 minutos e a inativação da reação ocorreu a 70°C por 15 minutos. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até a utilização.

O PCR em tempo real foi realizado utilizando 1  $\mu$ l de cDNA total, 12,5  $\mu$ l do reagente SYBR Green (Qiagen), primers específicos (tabela 1) e água, para volume final de reação de 25  $\mu$ l. As reações foram processadas em triplicata, em placa de 96 poços, no termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. O gene ARBP foi utilizado como controle endógeno.

Gene	Nome oficial	Sequência 5'-3'
COL1A1	collagen type I alpha 1	Fw CTGACTGGAAGAGTGGAGAGTA
	chain	Rv TTGTCCTTGGGGTTCTTGCT
COL1A2	collagen type I alpha 2	Fw TGAACTTGTTGCTGAGGGCA
	chain	Rv TGTCTTTTTAGAGCAGCCATCT
HAS2		
		Fw ATGCTTGACCCAGCCTCATC
	hyaluronan synthase 2	Rv TTAAAATCTGGACATCTCCCCCAA
		Fw TAGAGGGTGTCCGCAATGTG
ARBP	ribosomal protein, large	Rv CAGTGGGAAGGTGTAGTCAGTC

### Tabela 1 - Descrição dos primers usados para PCR de mRNA

## 3.4 Cálculo da expressão gênica diferencial

A concentração dos primers utilizados na reação de qPCR foi padronizada para a quantificação da expressão gênica. Realizamos reações utilizando diferentes concentrações de primers (entre 200 nM e 800 nM) e concentração fixa de cDNA para obter a concentração ideal de primers. Foi escolhida a menor concentração, sem formação de dímeros, que não comprometesse a curva de amplificação. Já para let-7 -b, -c e -e, como o ensaio é otimizado pelo fabricante, não foi realizada etapa de padronização. Pelo fato de ter sido escolhida a quantificação relativa entre as amostras, a eficiência de amplificação do produto teve de ser calculada. Desta forma, foram realizadas cinco diluições seriadas do cDNA template e uma curva-pa-drão foi construída, onde a média dos Cts obtidos em cada diluição variava em função do logaritmo da concentração de cDNA. O coeficiente angular da reta obtida foi utilizado para o cálculo da eficiência de amplificação do produto, segundo a fórmula:

 $ef= 10^{(-1/a)}$  (Sendo ef=eficiência, a= coeficiente angular da reta)

Foram aceitos valores de eficiência entre 1,80 e 2,10. Para os ensaios de quantificação da expressão gênica utilizando SYBR Green<sup>®</sup> foi realizada curva de dissociação para avaliação da especificidade da reação. O cálculo da expressão relativa entre as amostras foi realizado de acordo com a fórmula descrita por Pfaffl (2001). O gene ARPB, que codifica uma proteína ribossomal, foi utilizado como normalizador (controle endógeno) nas reações de qPCR para a análise de mRNA.

### 3.5 Busca on-line por alvos preditos do microRNA let-7

A busca por alvos preditos dos microRNA let-7b, 7c e 7e foi realizada computacionalmente, utilizando o programa on-line TargetScan (Lewis et al., 2005).

IL OOLIAT ENG	T000002250	64.5 3' LITR length: 2213						
	1000002200	outo o oriclengui. 2210			_			
	به باد م	s uk uk ak uk	4 1.k 1	Ja 1	is the	ala ala al	a sha sha	
Conserved sites for	ainus (asilico l	recally movement arong vertebrat						
ron-uap mi1-122 Chine 2 mi1-123	ali-d136-55 (2) 55 (2)	196-176-196 401 196-7-19675 19 18-20	-2-3 12-2-3	i	F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-212-5; F-2	29		
(Now porty conserved allow for mINAX lensing conserved among vertilabeling) (Now conserved allow for mINAX lensing conserved only smorg mammal) (Show lanks to post weak for mINAX lensing conservat and post (Show lanks to be used) conserved but confidently uncotaged unlinks lambal (Dow lanks for the unlinks and motion), most of which an mINAX <sup>3</sup> arguments or INAA hyperets mammaliad as mINAX4() Decembed SYM inserved mINAX lenge			Reg.         Eners with higher probability of performando ocean valion           ■ Eners ■ Twest #8         ■ Zaner A1           ■ Eners ■ Twest #8         ■ Zaner A1					
[Download style anage of mile [View table of miRNA sites] [View human panome trowser	NA starg		Diner 📕 7mer	-n0 2	iner-ki 🔳 n	en-sanonical		
(Show all species)								
Human Chimp Rhesus	1. ACUCCCUCC ACUCCCUCC ACUCCCUCC	-10 20 10 -AUCCCAACCUGGCUCCCUCCCACCCACCA- AUCCUAACCUGGCUCCCUCCCACCCACCA- AUCCCAACCUGGCUCCCUCCCACCCACCA	40	AACCC			-ACUSAACCCCCUC -ACUSAACCCCCCC -ACUSAACCCCCCC -ACUSAACCCCUC	
Squinnel	ACUCCCUCC	<ul> <li>ACCCCAMCOUGGOUCCOUCCCACCCAGECC</li> <li>ACCCCAAUCUGGUUCCOUCCCACCCAGECC</li> </ul>	ACU-UUCUCCCC	AUUCU	SGAAACA	GACAAACAACCCAA GACGAACAACCCAA	-ACUSAANUCCOUCC -ACUCAAUUUCCCCC	
Rat	ACUCCEUCC	-AUCCCAAUCUGGUUCECUCECACCEAGEEC-	ACU-UUCCCCCA	ACCCU	GGAAACA	GACCAACAACCCAA	-ACUCAAUUUCCCC-	
Pig	ACT CONCERNE					GACTARA CARCOLAR		
Cat	ACUCCCUCC	-CACCCAACCUS6CUCCCUCCCACCCAACCC	ACU-COCCCCUS	ACCCU	SGAAACA	GACAAACAACCCAA	-ACUSAACCCCCCA-	
Brown bat	ACUCCEUCE	-CACCCAACCUGGCUCECUCECACCEAACEC- ACUCUAACCUGGCUCECUCECACCEAACEC-	AUU-GGEECCUG	ACCCU	GGAAACA	GACAAACAACCCAA	-ACUGAACCEECCA	
Elephant	ACUCCUNCC	- ACCCCAACCUGGCUCCCUCCCACCCAGCCC- AUXIC CAACCGGCUCCCUCCCACCCAUCU	ACUGEECCOD	AGCCU	GGAAACA	GOCANACIACCONA	-ACUGAAUCEEECA-	
Macaw	AC	-CCCCACACGUSACUAAU		AAU	··· AAAAAC ····	ASACAAAAAA	-ACCASC-C	
Lizard	AC000006	UAAUGAGAGCUGAC		AA A	SGAAACG		-UAA-A	
X. tropicalis	AC				AAAACA	CAC	C	
Species key								
ownload table								
ownload table] onserved	P	redicted consequential pairing of ta	rget region (top)	Site	Context++	Context++ score	Weighted	
ownload table] onserved Position 789-795 of C	P OLIAI 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mIRNA (bottom)	rget region (top)	Site type 7mer-	Context++	Context++ score percentile	Weighted context++ score	
Position 789-705 of C has-miR-4500	P OL1A1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGLUGCUGAAAA-CUACCUCG [11] [11]]] UUCUGUGAUGAGAAJ	rget region (top)	Site type 7mer- m8	Context++ score -0.31	Context++ score percentile 90	Weighted context++ scor -0.31	
Position 789-795 of C hsa-miR-4500 Position 789-795 of C	P OLIA13'UTR 5' 3' OLIA13'UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUGCUCAAAGA-CUACCUCC IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer-	Context++ score -0.31 -0.29	Context++ score percentile 90 87	Weighted context++ sco -0.31 -0.28	
Position 789-705 of C hss-miR-4500 Position 789-705 of C hss-tet-7p-5p	P OL1A1 3' UTR 5' OL1A1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of to and mRNA (bottom) UCUGUSCURAGAC-UCUCCUCS IIIIII UUCUGUSCURADASAUCCUCS IIIIII UUCACAUGUUSCADSAUCCUCS	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29	Context++ score percentile 90 87	Weighted context++ sco -0.31 -0.28	
Position 789-705 of C hss-miR-4500 Position 789-705 of C hss-tet-7p-5o Position 789-765 of C	P OLIAI 3' UTR 5' 3' OLIAI 3' UTR 5' 3' OLIAI 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUSUSCHARAGA-CURCUCG UUCUSCHARAGACURCUCG UGUSUUGCUGANAGACURCUCG UUCACAUGUUGCUGANAGACURCUCG UGUSUUGCUGANAGACURCUCG UGUSUUGCUGANAGACURCUCG	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.29	Context++ score percentile 90 87 87	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28	
Position 789-795 of Cl hss-miR-4500 Position 789-795 of Cl hss-let-79-50 Position 789-785 of Cl hss-let-79-50 Position 789-785 of Cl hss-let-79-50 Position 789-785 of Cl	P OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCURJUGCURAMAA-UNICOL UUCULUSABAGEAUCCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS UGUSUUGCUSAAASCULCUS 	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context*+ score -0.31 -0.29 -0.29	Context++ score percentile 90 87 87	Weighted context++ sco -0.31 -0.28 -0.28	
ownload table] onserved Peation 789-795 of C has-rrift-4500 Peation 789-785 of C has-let-79-59 Postion 789-785 of C Postion 789-785 of C	P OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUSUUSCURANGA-CURCUCS UIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.29 -0.27	Context++ score percentite 90 87 87 87 87	Weighted context++ sco -0.31 -0.28 -0.28 -0.28 -0.27	
ownload table] onserved Postion 789-795 of C has-rif8-4500 Postion 789-795 of C has-let-79-59 Postion 789-785 of C has-let-75-59 Postion 789-785 of C has-let-75-59 Postion 789-785 of C	P OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUGCUAADA-CUACUGA UCUGUGCUAADAUCCUGA UGUGUUGCUAADAUCCUGA UGUGUUGCUAADAUCCUGA UGUGUUGAAAAGAUCCUGA UGUGUUGAAAAGAUCCUGA UGUGUUGAAAAGAUCCUGA UGUGUUGAAAAGAUCCUGA UGUGUUGAAAGAUCCUGA	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.29 -0.27	Context++ score percentile 90 87 87 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.28 -0.27	
ownload table] onserved Position 789-795 of C has-miR-4500 Position 789-795 of C has-let-79-59 Position 789-785 of C has-let-70-59 Position 789-785 of C	P OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UGUGUGCUGAAAGA-CUACCUCG UGUGUGCUGAAAGA-CUACCUCG UGUGUGCUGAAAGA-CUACCUCG UGUGUGCUGAAAGACUACUCG UGUGUGCUGAAAGACUACCUCG UGUGUGCUGAAAGACUACUCCG UGUGUGUGCUGAAAGACUACUCCG UGUGUGUGCUGAAAGACUACUCCG UGUGUGUGCUGAAAGACUACUCCG UGUGUGUGCUGAAAGACUACUCCG	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.29 -0.27 -0.27	Confext++ score percentile 90 67 67 67 66 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27	
ownload table] onserved Position 789-705 of C has-miR-4500 Position 789-795 of C has-let-79-59 Position 789-795 of C has-let-79-59 Position 789-785 of C has-let-78-59 Position 789-785 of C has-let-78-59 Position 789-785 of C	P OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUGUGAAAGA-UUCCUCG UCUGUUGUGAAAGA-UUCCUCG UGUGUUGUGAAAGAUUCCUCG UGUGUUGGAAAGAUUCCUCG UGUGUUGGUGAUGAUGAUGAU UGUGUUGUGAUGAUGAUGAU UGUGUUGCUGAAAGAUUCCUCG UGUGUUGCUGAAAGAUUCCUCG UGUGUUGCUGAAAGAUUCUCG UUGUGUUGCUGAAAGAUUCUCG UUGUUUCGUAAUGAUCUCUGAU UUGUUUCGAAAGAUUCUCG UUGUUUCGAAAGAUUCUCGAU	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Contexti++ score -0.31 -0.29 -0.29 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 90 87 87 87 87 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27	
eventiced table) onserved Pestion 789-705 of C hss-rei7-950 Position 789-785 of C hss-let-79-50 Position 789-785 of C hss-let-78-50 Position 789-785 of C hss-let-78-50 Position 789-785 of C hss-let-78-50 Position 789-785 of C	P OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCURJUGCURAMAA-CURCUCG UUCUJUGARAGSAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGSAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGSAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGSAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGSAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGSAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGAUCCUCG UGUSUUGCURAMAGUUCCUCG 	rget region (top)	Sike type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.29 -0.27 -0.27	Confesti++ score percentile 90 87 87 87 87 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table) onserved Peation 789-795 of C has-rrift-4500 Peation 789-785 of C has-let-79-59 Peation 789-785 of C has-let-78-59 Peation 789-785 of C has-let-78-59 Peation 789-785 of C has-let-78-59 Peation 789-795 of C	P OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUCURAMAA-CURCUCC UUCUUCARADEADCAD UGUSUUCURAMACAUCCUCC UGUSUUCURAAASCURCUCCG UUCUCAUDUUGAUAAUCUCCG UUCUCAUDUUGAUAAUCUCCG UUCUCAUDUUGAUAAUCUCCG UUCUCAUDUUGAUAAUCUCCG UUCUCAUDUUGAUAAUCUCCG UUCUCAUDUUGAUAAUCUCCG UUCUCAUAUDUUGAUAAUCUCG UUCUCAUAUDUUGAUAAUCUCG UUCUCAUAUDUUGAUAAUCUCG UUCUCAUAUDUUGAUAAUCUCG UUCUCAUAUDUUGAUAAUCUCG UUCUCAUAUDUUGAUAAUCUCG	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 90 87 87 87 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table) onserved Postion 789-795 of C has-rif8-4500 Postion 789-795 of C has-let-79-59 Postion 789-795 of C has-let-78-59 Postion 789-795 of C has-let-78-50 Postion 789-795 of C has-let-78-50 Postion 789-795 of C has-let-76-50 Postion 789-795 of C	P OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5' 0LTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUGCUGAAGA.CURCUCG. UCUGUUGCUGAAGAUGAUCAU UCUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUGCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG. UGUGUUGCUGAAGAUCCUCG.	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ soore -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Context++ score percentite 90 87 87 87 86 86 86 86 86	Weighted context++ scot -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table] onserved Postion 789-795 of C has-rtiR-4500 Postion 789-795 of C has-let-79.50 Postion 789-785 of C has-let-75.50 Postion 789-785 of C has-let-76.50 Postion 789-795 of C has-let-76.50 Postion 789-795 of C has-let-76.50 Postion 789-795 of C	P OLTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5' 0LTA1 3' UTR 5' 3' OLTA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom)          UCUGUUCCUAADA-CUACUCA          UCUGUUCCUAADA-CUACUCA          UUCUCUAADAUCAUCA          UUUCUCAADAUCAUCAUCA          UUUUCUCAADAUCAUCAUCA          UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Confext++ score percentile 90 87 87 87 87 86 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
eventional table) onserved Position 789-795 of C has-miR-4500 Position 789-795 of C has-let-79-59 Position 789-785 of C has-let-75-59 Position 789-785 of C has-let-76-59 Position 789-795 of C	P OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5'	Tedicited consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUSUUGCUGANGA-CUACUCG UCUSUUGCUGANGA-CUACUCG UUCUSUUGCUGANGA-CUACUCG UUCUSUUGCUGANGANGAUCUCG UUCUSUUGCUGANGANGAUCUCG UUCUSUUGCUGANGANGAUCUCG UUSUUGCUGANGANGAUCUCG UUSUUGCUGANGAUGUGGAU UUSUUGCUGANGAUGUGGAU UUSUUGCUGANGAUGUGCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG UUSUUGCUGANGAUGUCCUCG	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 90 87 87 87 87 86 86 86 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
eventiced table) onserved Position 789-705 of C has-miR-4500 Position 789-705 of C has-let-70-50 Position 789-705 of C	P OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' 0LIA1 3' UTR 5' 3' 0LIA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UUCUULSAAGAC-UUCCUCA. UUCUULSAAGACAUCUCCA. UUCUULSAAGACAUCUCCA. UUCUULSAAGACAUCUCCA. UUCUUCUUSAAGACAUCUCCA. UUCUUCUUSAAGACUUCCUCA. UUCUUCUUSAAGACUUCCUCA. UUCUUUCUUSAAGACUUCCUCA. UUCUUUCUUSAAGACUUCCUCA. UUCUUUUCUUSAAGACUUCCUCA. UUCUUUUUUGAAGACUUCUCA. UUCUUUUUUGAAGACUUCUCA. UUCUUUUUUUGAAGACUUCUCA. UUCUUUUUUGAAGACUUCUCA. UUCUUUUUUGAAGACUUCUCA. UUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	rget region (top)	Site type me me me me me me me me me me me me me	Context++- score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Confest++ score percentile 90 67 87 86 86 86 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table) onserved Peation 789-795 of C has-rrift-4500 Peation 789-785 of C has-let-79-59 Peation 789-785 of C has-let-78-59 Peation 789-785 of C has-let-78-59 Peation 789-785 of C has-let-78-59 Peation 789-785 of C has-let-76-59 Peation 789-785 of C has-let-76-59 Peation 789-785 of C has-rrift-89-59 Peation 789-785 of C	P OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 3'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUCURAMAA-UUCUCC UUCUUCAAUAAUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAUAUA	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Confesti++ score percentile 90 87 87 87 87 87 86 86 86 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table) onserved Postion 789-795 of C has-rrifk-4500 Postion 789-795 of C has-let-79-59 Postion 789-795 of C has-let-70-59 Postion 789-795 of C has-let-70-59 Postion 789-795 of C has-let-70-59 Postion 789-795 of C has-let-70-59 Postion 789-795 of C has-rifk-89-59 Postion 789-795 of C has-rifk-89-59 Postion 789-795 of C has-rifk-78-59 Postion 789-795 of C	P OLIA1 3' UTR 5' 3' OLIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 3' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 3' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5' 0LIA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUGCURANGA.CURCUCG. UCUGUUGCURANGA.CURCUCG. UCUGUUGCURANGA.CURCUCG. UCUGUUGCURANGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUGAUG	rget region (top)	Site type m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ soore -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 90 87 87 87 86 86 86 86 86 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table) onserved Postion 789-795 of C has-rif8-4500 Postion 789-795 of C has-let-79.50 Postion 789-785 of C has-let-75.50 Postion 789-785 of C has-let-75.50 Postion 789-785 of C has-let-76.50 Postion 789-795 of C has-let-76.50 Postion 789-785 of C has-let-76.50 Postion 789-785 of C has-let-76.50 Postion 789-785 of C has-let-76.50 Postion 789-755 of C has-let-76.50 Postion 789-755 of C	P OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUCCUAAAGA.UACCUC. UCUGUUCCUAAAGAUCCUCG. UCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. UCUCUUCUCAAAGAUCCUCG. 	rget region (top)	Site Site Tmer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Confext++ score percentile 20 67 67 67 66 85 86 85 85	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table] onserved Position 789-795 of C has-miR-4500 Position 789-795 of C has-let-79-59 Position 789-785 of C has-let-76-59 Position 789-785 of C has-let-76-59 Position 789-795 of C	P OLTA1 3' UTR 5' OLTA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and miRNA (bottom) UUCUULSAAAAA-UUACUCG UUCUULSAAAAA-UUACUCG UUCUULSAAAAACUUCUCG UUCUULSAAAAACUUCUCG UUUSAUUUCUAAAAACUUCUCG UUUSUUGUUSAAAAACUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG UUUSUUUGUUSAAAAAUUUCUUG	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	Contest++ score percentile 90 87 87 85 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86 86	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	
ownload table) onserved Peation 789-795 of C has-rrift-4500 Peation 789-785 of C has-lef-79-59 Peation 789-785 of C has-lef-76-59 Peation 789-785 of C	P OLIA1 3' UTR 5' OLIA1 3' UTR 5'	redicted consequential pairing of ta and mRNA (bottom) UCUGUUCURAMAA-UNCUCC UUCUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC UGUSUUCURANDACTURCUCC	rget region (top)	Site type 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8 7mer- m8	Context++ score -0.31 -0.29 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28 -0.28 -0.25	Conflext++ score percentile 90 87 87 85 86 86 86 86 86 86 86 85 85	Weighted context++ scor -0.31 -0.28 -0.28 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27	

**Figura 4** - Identificação do colágeno tipo1 cadeia A1 (COL1A1) como alvo de let-7 no programa TargetScan (fonte: <u>http://www.targetscan.org</u> ).

		_						
an COL1A2 ENS	T000002972	68.6 3'U	TR length: 839					
100		3%	<b>3</b> 0.	-0.		s.	a.	d.
Conserved sites for	nimu (anilico	broadly roos	wed away verteb	rates				
	- 1R- 2	5-20/22-51/92-1	(c/00-0c/07-0c with	7-5p let-7-5p/70-5;		<b>1</b>		
						2 8		
Show poorly conserved siles in the set	for million families core	erved among vertet	(11)					
Show poorly conserved sites to Show sites for poorly conserved	for miRNA families cons red but confidently annot	erved among many ared miRNA familie	nahi) Kabij	Key: Situa with Nober re	reitaiteil ihe of m	enternation comma	n milan	
[Show sites for other millibase miserinotetied as millibAs]	e annotations, most of wi	tich are millika? se	parces or RNA hepmania	📕 Graer 📕 7m	er mð 📕7	ner At 📃 no	n-sanonikal	
Download SVG image of miRt New table of miRtA sites!	NA shea]			Sites with lower pr	shability of pe er-cuit 📃 7	elerential conser inter A1 🛛 🗖 no	vation n-canonical	
Wew human ganome browser	r (hg19))							
(Show all species)								
Human	1 AUGAACUX	-AAUCUAAAUU-				AUUS		A
Chinp	AUGAACUK AUGAACUK	-AAUCUAAAUU-	AAAA-AA-	SAAAGAA SAAA		AUUS-	AAA-AA AAAAAA-	A
Squinnel	AUGAACU	-AACCUAAAUU	AAAA-GU-	CAAA AAA	6	MAUCUS658	66AAAAA-AC	A
Rat	GUGAAEUX	-AACCUAAAUU-		CAAAAAC		-CCCUG	···· AA···· AA··A··· A···	A
Rabbit	GUGAACUK	-CACCUAAAUU-	AAAA-AG-)	MA	AG/	ALKUS	AAA-AA	A
Cov	ACGAACU	-AACCUAAAUU-	6-AA-	AAA66AA		-AUCUS	····A···AA·C··A··	
Cat	AUGAACUK AUGAACUK	-AACCUAAAUUA		AAAAGAA		-SUCCS	AAA-AAA- AAA-AAA	A
Brown bat	UUGAAEUK	-AACCUAAAUU-	AAA-AG	MAGGAA		-AUCUA	AAAUAA-CA	·····
Opossum	6AACC	-UCUCCAGAAA	GGCAGAAA-GC-	AAAA66A		-AACAC	AA6-6CCC	CCA
Macaw	AUGAACU/ AUGAACU/	- AAAUUAACUU-	AAA	000000		11/ 8	AAA-UU	A
Lizard	A1858							
Con	AUGAAEUX AUGAAEUX		AAA-CC A-AC AAAA-Ag	AAAACAA UUA RAAAGAA		AAA	AAAAU AAAAU AAAAA	Å
Con	AUGAACIX	-AAACUAACUU- AAAUU- AAAUU-	AAA-CC AAAA.Aa.	ААААСАА UUR аАААGAA		AUCUG.	AAA.AA	A
Con [Species key]	AUGAACIX	-#AACUAACUU-	AAA-KC AAAAKC	4444CAA UUL BAAAGAA		. AUCUS		A
Booleskey	AUGAACIX	-AAACUAACUA	AAA-KC AAAA-KC	ААААСАА 				AA.
Books key Books key Conserved	AUGAACIX	-AAACUAACUA AAAUU- :	AAA.CC	AAAAGAA		. AUCUS	Contentias 2000	AA.
Books key Books key Conserved	AUGAACIX AUGAACIX	Predicted con	AAA	AAAA CAA UUA	) Site type	Gontext++	Context++ soore	Weigt context+
Boedes key Boedes key Download table] Conserved	AUGAACU AUGAACU COLIA2 3' UTR 5'	Predicted con	AlA	AAAACAA UDA UDA GAA GAA f target region (tog) mi) A	) Site type	Context++ score	Context++ score	Weigi context+
Isonin knj Isonin knj Isonin knj Position 378-385 of Cl Inselet-79-50	AUGAACIX	-AAACUAACUA- AAACU-AAACU- AAACU-AAACU- AAACU-AAACU- AAACU-AAACU- AAACU-AAACU- AAACU-AAACU- AAACU-AACU-	All	AAAA CAA ULA ULA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA.	) Site type 8mer	Context++ score -0.51	Confext++ score percentile 98	Weigi context+
Con Jownload table] Conserved Position 378-385 of Cl Insulat-79-55 Position 378-385 of Cl	AUGAACIX AUGAACIX XOLTA2 3' UTR 5' XOLTA2 3' UTR 5' XOLTA2 3' UTR 5'	Predicted con	AA	AAAA	) Site type Broar	Context++ -0.51	Confext++ score percentile 98	Weig context+
Con Boote key Boote key Boote key Boote atable Conserved Position 378-385 of Ch has-let-70-50 Position 378-385 of Ch has-let-70-50 Position 578-385 of Ch has-let-70-50	AUGAACIX AUGAACIX XOL1A2 3' UTR 5' XOL1A2 3' UTR 5' XOL1A2 3' UTR 5' 3'	Predicted con	AA A.A	AAAA	) Site type 8mer 8mer	-AAC		Weigi context+
Con     C	AGG	Predicted con UuccAAAG UuccAAAG UuccAAAG UuccAAAG	AAA.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C. A.C.C.C.C. A.C.C.C.C. A.C.C.C.C. A.C.C.C.C. A.C.C.C.C. A.C.C.C.C.C. A.C.C.C.C.C.C.C. A.C.C.C.C.C.C.C.C. A.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C.C	AAAA CAA UUA eAAA CAA f target region (log) rm) A U J	) Site type 8mer 8mer	Context++ score -0.51	Context++ score percentile 98	Weig context+
Con     C	ADDADX ADDADX ADDADX ADDADX ADD	Predicted con UUCCA	AAAA.Aa.     AAAA.Aa.     AAAA.Aa.     AAAA.Aa.     and miRNA (botto     AAGGUULAACUACCUC     IIIIIII     CAUCUULGAUGAACUACCUC     IIIIIIII     CAUCUULGAUGAGAG     GUULAACUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACUACU		) Site type 8mer 8mer	Context++ score -0.51 -0.50	A	Weigi context+ -0.4 -0.4
Con     C	ADDADX ADDADX ADDADX ADDADX ADD	-AACCUAACUU- AAACUAACUU : AACCUAAACU : AACCUAAACU : AACCUAAACU : UUCCAACU : UUCCAACU : UUCCAACU : UUCCAACU : UUCCAACU : UUCCAACU : UUCCAACU : UUCCAACU	AA A. A		) Sito type Bmer Bmer	- 442	Context++ score percentia 08 98 98	Weigi context+ -0.4 -0.4
Con     C	ADD	-AAACUAAAUU- AAAUU- AAAUU- - AAACUAAAUU- - AAACUAAAUU- Predicted con UUCCAAU UUCCAAU UUCCAAU UUCCAAU UUCCAAU UUCCAAU UUCCAAU UUCCAAU	AA A. Aa	4444	) Sito type Brner Brner Brner Brner	Context++ score -0.51 -0.50 -0.52		Weigi context+ -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	AGGACK AGGACK AGGACK COLIA2 3' UTR 5' 2' COLIA2 3' UTR 5' 3' COLIA2 3' UTR 5' COLIA2 3' COLIA2 3' UTR 5' COLIA2 3' COLIA2 3' CO	-AACCUAACUU- AAUU- CAACCUAAUU- CAACCUAAUU- Predicted con UUCCAAU UUSSA UUCCAAU UUSSA UUCCAAU UUSSA UUCCAAU UUSSA UUCCAAU UUSSA UUCCAAU UUSSA UUCCAAU	AA A		) Site type Broar Broar Broar Broar	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.52		Weigi context+ -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	ADD ACK ADD ACK ADD ACK ADD ACK ADD ACK ADD		AAAA.Aa     AAAA.Aa     AAAAAA     AAAAAAA     AAAA		) Site type 8mar 8mar 8mar 8mar	AUCUS	Context++ score percentile 98 98 98 98 98	Weigi context+ -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	ADD		AAAA.A.A. A.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.A.C. M.		) Site type Brear Brear Brear Brear Brear	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.52 -0.50	A-A-U 	Weigi context- 0.0 -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	ADD		AA A. A	AAAA	) Site type Brner Brner Brner Brner	Context++ score -0.51 -0.50 -0.52 -0.50 -0.50 -0.50		Weigi context- 0// 0// 0// 0// 0// 0// 0//
Con     C	AG2ACX AG3ACX AG3ACX IOLIA2 3' UTR 5' 3' IOLIA2 3' UTR 5' 1' IOLIA2 3' UTR 5' IOLIA2 3' IOLIA2 3' UTR 5' IOLIA2 3' UTR 5' IOLIA2 3' UTR 5' IOLIA2 3' IOLIA2 3' IOLIA2 3' IOLIA2 3' IOLIA		AA	AAAA	) Site type Bmar Bmar Bmar Bmar	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weigley context+ -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD		AAAA     AAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAAAA		) Sile type Bmar Bmar Bmar Bmar Bmar Bmar	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weight context+ -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD		AAA. A. A	4AAA	) Site type Binar Binar Binar Binar Binar Binar Binar	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weigt солган солган -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD		AA	AAAA	) Site type Brner Brner Brner Brner Brner Brner Brner Brner	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weigh context- -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.
Con     C	AUGLACV AUGLACV AUGLACV AUGLACV AUGLACV AUGLACV 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4		AA	AAAA	) Site type Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weigley context- 0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4
Con     C	AGGL ACK AGGL ACK AG		Add. Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Add.     Ad	4444	) Site type Smar Smar Smar Smar Smar Smar Smar Smar	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0		Weigh context+ 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4 0.4
Con     C	ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD		AAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAA     AAAAAA		) Site type Bmar Bmar Bmar Bmar Bmar Bmar Bmar Bmar	Contest+* score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0		Weigh context+- .0.4 .0.4 .0.4 .0.4 .0.4 .0.4 .0.4 .0.
Con     C	ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD		AAAA     AAA     AAAA     AAAAAA	AAAA	) Site type Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0		Weigt context- -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.4 -0.
Con     C	ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD ACV ADD		AAAA.A.A. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.	AAAA	) Site type Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weig context- .0/ .0/ .0/ .0/ .0/ .0/ .0/ .0/ .0/ .0/
Con     C	ADD ACX ADD ACX ADD ACX ADD ACX ADD ACX ADD		AAAA.Aa A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A.C. A		) Site type Brar Brar Brar Brar Brar Brar Brar Bra	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0		Weighter context- 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.
Con     C	ADD1				Site type Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Brear Br	Context++ score -0.51 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50 -0.50		Weig context -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0 -0

**Figura 5** - Identificação do colágeno tipo1 cadeia A2 (COL1A2) como alvo de let-7 no programa TargetScan (fonte: <u>http://www.targetscan.org</u> ).

n HAS2 ENSTO	000030392	4.4 3' UTR length: 5229				
ITHASE ENSTO	000030392	4.4 5 OTK length. 5225	CRONING /			
		-		1	4	
Provident and the form	-tana disetting					
N.3-170-50 N	d7-22-3p al7-204	-5:/211-5:m17-455-5: m18-429-3p				
nif 2015e 3pr420 nife	L62 % 1R 29 3	x 22 5 22 35/962 35/967 31 alf 204	55/221-55			
with 5 Op 11R 400 Sp	Lat 2 % at	17 22 34 11 22 34				
	00/424 00/407 D					
The state and the bar in	(59 C) - 6 (4-1)	6-1a				
15-001 BIS-10	-64.1					
915-96-5p/1271-87						
al5-400-5cal5-403-	ē.:					
Int-7-5p/90-5p	P					
a17-90-5 1	\$p41271-8:					
TIR.	96 Spr1271 - 95					
Show poorly conserved siles it Show conserved siles for will	tor million A families of	nserved among vertebraites) d only among manymatel				
Show poorly conserved sites to Show sites for poorly conserve	for miRNA families co ed but confidently and	nserved among mammale( rotated mIRNA families)	Key: Since with biobac periods in:	of numbers of some	and the second	
(Show sites for other millibase misannotated as millibAs)	annotations, most of	which are millikal' sequences or RNA fregments	📕 Smer 📕 Trrei-m8	Tiner A1	non-sanorical	
Download SVG image of miR8	NA sites)		Sites with known probability of	of preherential core	ervation (	
New human ganome browser	(hg19))		sner anerna	AnerAs	ion-sanor isa	
(Show all species)						
	1					
Human	U	CUUCCAUGUU		SACGULUGCASUCA	-CA	CACA
Rhesus	U	CUUCCAUSSU		SACGUUUGCASUCA	-CA	CACA
Squinnel	0	CUCACAUUG		GAUSUUUSCASSCA	-CACAAGCAG	ACACACACA
Rat	U	CUCACG	AUX	AUGULUUCCEUCA	-CACCUGGAGA	CACACAUACAA
Rabbit	U	CUAACAUUGA		GCCUUUCCAGUCA GACCUUUCCAGCCA	L-CA	CACA
Cow	0	CUUKCEUU		SAUSUUGCASUUS	CASA	CACACA
Dog	ų	CUUCUSUUSU	UK	SACOULUGCASUCA	-CGCACGCASA	CACACACA
Elephant	U	CUUACAUUGA		GACAUUUGCAGUCA GACGUUUG	CGCAUGASSA	CAEACAEA
Opossum	G		CU	MAGULUGCAAGC-		ACACACA
Chäcken	ų	GUUUCUGU	684	SAAGUU		ACCCAGA
10000	UUUSACCACU	GUSUCUUUAUUAUUUUUUAAUAUUCUUU	UUUUUUUUG6CU6CCCAU665A	AAASUU GAGAASUGCAAAA		MCCSRI
X. tropicalis	U	GALINCAGAUGUGC	CUX			MAA UALM
X. tropicalis	U	GALIACAGAUGUGC	CUL		~	····· AAAUAUA
X. tropicalis Con	U	GAUACAGAUGUGC	Cu	SACOULOCAGUCA	L.CA	ACACACA
X. tropicalis Con	U	GAUACASAUGUSC	CU	SACOULIOCAGUCA	L.CA	
X. tropicalis Con	U	GAUMCAGAUGUSC		SA-GUUUGCASUCA	L.CA	
X. trapicalis Con	U	GAUMCAGAUGUSC	Cu	SA-GUUUGCASUCI	L.CA	ACACACA
X. tropicalis Con	U	GAUMCAGAUGUSC		SA-GUUUGCASUCA	L.CA	
X. tropicalis Con Secies keyl	U	GAUMCAGAUGUSC	Uu	SA-GUUIGCASUCA	L.CA	ACACACA
X. tropicalis Con Sector keyl Sector keyl Sector keyl	U	GUMCaUUGU.		SA-GUUDCASUCI		ACACACA
X. tropicalis Con Sector keyl bwelload table] onserved	UK	GUMCaUUGU	yet region (top) Site	Context++	Context++ score	Weighted
X. tropicalis Con Sector keyl ownload table] onserved	U	-cauxcacAugusc	yet region (top) Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score
X. tropicalis Con Sector keyl benchad table] onserved Position 284-280 of H4	U	redicted consequential pairing of tan and mIRNA (bottom)	pet region (top) Site type 7mp-	Context++ score -0.31	Context++ score percentile 89	Weighted context++ score -0.31
X. tropicalis Con Sector by bwnload table] onserved Position 284-280 of H4 hsa-let-76-50 Decities 250 of H4	U	-cauxcasAugusc cuuxcauugu inedicted consequential pairing of tan and mIRNA (bottom) guguuuscccuuxuAxcaucac 	pet region (top) Site type 7men At	Context++ score -0.31	Context++ score percentile 89	Weighted context++ score -0.31
X. tropicalis Con Sector key bwnioad table] omserved Position 284-280 of HJ haa-let-7d-5p Position 284-290 of HJ	U V P AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5'	-GUMCaUUGU redicted consequential pairing of tan and mIRNA (bottom) GUGUUUGCCCUAUAUCCUCA UUGAUACGUUSCAUSAUSGACA GUGUUUGCCCUAUAUACCUCA	pet region (top) Site type 7mon A1 7mon	Context++ score -0.31 -0.30	Context++ score percentile 89 87	Weighted context++ score -0.31 -0.30
X. tropicalis Con Sector (m) Domicad table) <u>onserved</u> Position 284-280 of H/ haa-tel-76-5p Position 284-290 of H/ haa-miR-4458	U V P AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5' 3'	GUMCADUGU redicted consequential pairing of tan and mIRNA (bottom) GUGUUUGCCCUAUACUCAC UUGAUACGUUGCAUGAUGAACA GUGUUUGCCCUAUAUACUCAC IIIIII UUGAUACGUUGCAUGAUGAACA 	pet region (top) Site type 7mon A1 7mon A1	Context++ score -0.31 -0.30	Context++ score percentile 89 87	Weighted context++ score -0.31 -0.30
X. tropicalis Con Sector key owniced table] onserved Position 284-290 of HJ haa-ket-76.5p Position 284-290 of HJ haa-miR-4458 Position 284-290 of HJ	U P AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5'		pet region (top) Site type 7mon A1 7mon A1 7mon	Context++ score -0.31 -0.30	Context++ score percentile 89 87 86	Weighted context++ score -0.31 -0.50 -0.27
X. tropicalis Con Sector key Download table] Onserved Position 284-280 of HJ haa-ket-76-5p Position 284-290 of HJ haa-miR-4458 Position 284-290 of HJ hsa-ket-70-5p	U P AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5' AS2 3' UTR 5' 3' 3'	GUMCAUUGU redicted consequential pairing of tan and mRNA (bottom) GUGUUUGCCCUAUACCUCA UUGAUACGUUSCAUSAUSGAGA GUGUUUGCCCUAUAUACUCAC IIIII AACAAGGUGUGGAUGAGAGA GUGUUUGCCCUAUAUACCUCAC IIIII UUGGUGUUGCCCUAUAUACCUCAC IIIIII UUGGUGUUGCGAUGGAGA	pet region (top) Site type 7mon A1 7mon A1 7mon A1	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27	Context++ score percentile 89 87 85	Weighted context++ score -0.51 -0.50 -0.27
X. tropication Con Socies key position 284-290 of HV haa-ket-76-5p Position 284-290 of HV haa-ket-76-5p Position 284-290 of HV haa-miR-4458 Position 284-290 of HV hsa-ket-7b-5p Position 284-290 of HV	U P AS2 3' UTR 5' AS2 3' UTR 5' AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5'	-GUMCAUUGU	pet region (top) Site type 7mm A1 7mm A1 7mm	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27	Context++ score percentile 89 87 86	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27
X. tropicalis Con Socies key ownicad table) onserved Position 284-290 of H9 hsa-ket-76-5p Position 284-290 of H9 hsa-ket-76-5p Position 284-290 of H9 hsa-ket-76-5p Position 284-290 of H9 hsa-ket-7a-5p	U		pet region (top) Site type 7mon A1 7mon A1 7mon A1	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 89 87 86 86	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27
X. tropicalis Con Socies keyl consistent Position 284-290 of H4 hsa-Hei-76-5p Position 284-290 of H4 hsa-Hei-76-5p Position 284-290 of H4 hsa-Hei-76-5p Position 284-290 of H4 hsa-Hei-7a-5p Position 284-290 of H4	U		pet region (top) Site type 7mor At 7mor At 7mor At 7mor At	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 89 87 86 86	
X. tropicalis Con Socies keyl conserved Position 284-280 of H4 hsa-ket-76-5p Position 284-280 of H4 hsa-ket-76-5p Position 284-280 of H4 hsa-ket-76-5p Position 284-280 of H4 hsa-ket-76-5p Position 284-280 of H4 hsa-ket-76-5p	U		pet region (top) Site type 7mot 7mot A1 7mot A1 7mot A1 7mot A1	Context#+ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 89 87 86 86	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27
X. tropicalis Con Sector keyl conserved Position 284-290 of H4 hsa-ket-76-50 Position 284-290 of H4 hsa-ket-70-50 Position 284-290 of H4 hsa-ket-70-50 Position 284-290 of H4 hsa-ket-70-50 Position 284-290 of H4 hsa-ket-70-50 Position 284-290 of H4	U		pet region (top) Site type 7mo- A1 7mo- A1 7mo- A1 7mo- A1	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27	Context++ score percentile 89 87 86 86 86	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27
X. tropicalis Con Sector invi Development Position 284-280 of H4 hsa-tri-76-50 Position 284-290 of H4 hsa-tri-76-50 Position 284-290 of H4 hsa-tei-76-50 Position 284-290 of H4 hsa-tei-76-50 Position 284-290 of H4 hsa-tei-76-50 Position 284-290 of H4 hsa-tei-76-50 Position 284-290 of H4	U V V V V V V V V V V V V V	-cauacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadaususco- couacadausus	pet region (top) Site type 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28	Context++ score percentile 89 87 86 86 86 86 85	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28
X. tropicalis Con Sector (N) Con Sector (N) Position 284-280 of H4 hsa-tet-76-50 Position 284-290 of H4	U V V V V V V V V V V V V V		pet region (top) Site type 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1 7mer A1	Context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28	Context++ score percentile 89 87 85 85	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28
X. tropicalis Con Con Con Con Con Con Con Con Con Con	U V V AS2 3' UTR 5' AS2 3' UTR 5' AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5' 3' AS2 3' UTR 5'		pet region (top) Site type 7men A1 7men A1 7men A1 7men A1 7men A1 7men A1 7men A1	Context+++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28 -0.28	Context++ score percentile 89 87 86 86 86 86 85 85	Weighted context++ score -0.31 -0.30 -0.27 -0.27 -0.27 -0.27 -0.28 -0.28

**Figura 6** - Identificação do hialuronan sintase tipo 2 (HAS2) como alvo de let-7 no programa TargetScan (fonte: <u>http://www.targetscan.org</u>).

## 3.6 Ensaio de luciferase

O ensaio de luciferase foi utilizado para validação de alvos de let-7.

## 3.6.1 Construção do vetor pmirGLO contendo 3'-UTR COL1A1 e 3'-UTR COL1A2

Os segmentos preditos de interação dos microRNAs let-7 com a região 3'-UTR dos genes COL1A1 e COL1A2 (selvagem, WT) para construção junto ao vetor reporter pmirGLO, foram obtidos através do programa de predição online TargetScan. Os oligonucleotídeos forward (FWD) e reverse (RV) correspondentes aos sítios preditos foram desenhados com a adição de extremidades de restrição para as enzimas Xbal e Xhol, na posição 5' e 3', além da inclusão de um sítio de restrição interno para a enzima Notl, conforme demostrado na figura 8.



**Figura 7-** Construção de plasmídeo repórter para validação da interação let7-c/ COL1A1. *Primers* contendo a sequência da região3'-UTR que contém sítio de interação predita com let7-c foram anelados e clonados no plasmídeo pmiR-Glo (COL1A1 luc 3'-UTR wt). Além disto, foi construído um plasmídeo contendo mutações nos sítios de interação predita com let7-c (COL1A1 luc 3'-UTR mut).

O anelamento foi realizado utilizando 3  $\mu$ l de cada oligonucleotídeo, Fw e Rv a 100  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de tampão de anelamento 10x e 3  $\mu$ l de água destilada ultrapura. A re-

ação de anelamento ocorreu nas seguintes condições:  $37^{\circ}$ C por 30 minutos,  $95^{\circ}$ C por 5 minutos, de  $90^{\circ}$ C a  $25^{\circ}$ C com rampa de  $5^{\circ}$ C por 1 minuto e manutenção a  $4^{\circ}$ C. O anelamento resultou em um segmento dupla fita correspondente ao sítio predito de ligação ao microRNA let-7 (Tabela 2). Para ligação ao vetor repórter pmirGLO,  $1\mu$ l de oligonucleotídeo anelado diluído 1:200 foi misturado a  $1\mu$ l de plasmídeo pmirGLO linearizado (50ng) anteriormente digerido com as enzimas Xhol e Xbal (20U/ $\mu$ l, New England Biolab),  $1\mu$ l de enzima T4 DNA ligase (20U/ $\mu$ l, New England Biolabs) e  $1\mu$ l de tampão T4 DNA ligase 10X (para reação de volume final igual a  $10\mu$ l). A reação de ligação ocorreu nas seguintes condições:  $16^{\circ}$ C por 16 h,  $65^{\circ}$ C por 10 minutos e manutenção a  $4^{\circ}$ C.

Vetores contendo insertos mutados (MUT), que inviabilizam a ligação do microRNA let-7 aos transcritos alvo COL1A1 E COL1A2, também foram construídos e utilizados como controle, demostrado na figura 7.

As ligações de vetor repórter pmirGLO 3'-UTR COL1A1 e repórter pmirGLO 3'-UTR COL1A2 (WT e MUT) foram transformadas por choque térmico em bactérias competentes *E.coli* DH5-α. Após transformação, as bactérias foram semeadas em placa LB ágar com 100mg/mL de ampicilina. Dos clones resultantes da transformação, cerca de 5 clones de cada alvo foram selecionados e o DNA plasmideal foi extraído pelo kit QIAprep ®Spin Miniprep (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

A presença do inserto foi confirmada através do sequenciamento das amostras realizado pelo serviço do Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células Tronco, IB/USP. O primer EBV foi utilizado nesse processo.

### 3.6.2 Ensaio de gene repórter Luciferase

Para validar a possível regulação pós-transcricional dos microRNAs let-7, células da linhagem MIO-M1 foram semeadas em placa de 24 poços na densidade de 3,5x10<sup>4</sup> células. Após 24 h, as células foram transfectadas com os plasmídeos pmirGLO 3'-UTR COL1A1 WT ou pmirGLO 3'-UTR COL1A1 MUT e pmirGLO 3'-UTR COL1A2 WT ou pmirGLO 3'-UTR COL1A2 MUT (2,5µl) na presença ou ausência de 1nM de microRNA mimético de let-7c (mimics), seguindo o protocolo do reagente de transfecção Lipofectamine 2000. Após 24 h da transfecção, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com 1x Passive Lysis Buffer (PLB) sob agitação por 15 minutos. O lisado foi coletado e a atividade de luciferase (luminescência) foi medida em aparelho luminômetro Glomax (Promega) com o kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). Os valores foram normalizados pelo nível de luminescência da luciferase de *Renilla*, codificada no plasmídeo pmirGLO através de um promotor independente. As transfecções foram repetidas em triplicata.

## 3.7 Ensaio funcional

Para análise da influência do microRNA let-7c na sinalização de TGF-β, as células da linhagem MIO-M1 transfectadas com mimic de let-7c foram submetidas ao tratamento com TGF-β1 ou TGF-β2 (R&D Systems) na concentração de 10 ng/mL. Foram realizados testes preliminares para padronização dos ensaios de contração em gel de colágeno, levando em consideração três protocolos (KITA, 2008; NODA, 2004; GUIDRY, 1992) com pequenas adaptações.

## 3.7.1 Ensaio de contração em gel de colágeno

O gel de colágeno foi formado por 5 partes de colágeno tipo 1 (2mg/ml) (Sigma-Aldrich), 2 partes de água destilada estéril e 1 parte de PSB 10x filtrado, NaOH 0,1 M filtrado e células da linhagem MIO-M1, na densidade final de 2,5x10<sup>6</sup> células, divididas em 2 grupos: transfectadas com mimics de let-7c e não transfectadas, demostrado na Figura 9. Após 1 hora de incubação em estufa a 37°C para indução da formação do gel, o mesmo foi gentilmente desprendido das paredes da placa. Em triplicata, os géis foram tratados respectivamente com TGF-β1 e TGF-β2 (R&D Systems) na concentração de 10 ng/mL, e as placas armazenadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Os experimentos foram acompanhados e avaliados em 16 h após a adição de TGF-beta, por captura de imagem em câmera digital. O cálculo das medidas das áreas do gel contraído foi realizado através do software ImageJ for Windows.

A percentagem de contração foi determinada pela seguinte fórmula:

Percentagem de contração=  $relação = \frac{áreadohalodecontração}{áreatotaldopoço}$ 

#### 3.8 Coleta de vítreo humano

As amostras de vítreo humano foram captadas de pacientes cirúrgicos atendidos no ambulatório de retina do hospital referência em oftalmologia, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP). As amostras foram coletadas no período de abril de 2014 à junho de 2016, de pacientes diagnosticados com descolamento de retina regmatogênico, buraco de mácula ou membrana epirretínica. Pacientes com diabetes mellitus, doenças reumatológicas e outras doenças sistêmicas foram excluídos do trabalho. Todos os pacientes foram informados do estudo e receberam previamente o termo de livre consentimento, aceitando os termos para inclusão. Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do ICB/USP com parecer favorável na data 10/03/2014, sob o número CAAE: 20948913.4.0000.5467.

O material (1000-2000ul) foi coletado pelo mesmo cirurgião (D.C.W.), durante a cirurgia de vitrectomia posterior pars plana, por punção com agulha, de diferentes áreas do vítreo: região central, região pré-macular e região periférica. Após a coleta, o vítreo foi centrifugado a 10.000 rpm, por 15 minutos, e somente o sobrenadante foi preservado e transportado em gelo seco para posterior armazenamento em freezer - 80°C até o processamento.

### 3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPadPrism (versão 5.0). Os resultados foram submetidos ao teste t de Student ou ANOVA (análise de variância) com pós-teste de Tukey, sendo que as diferenças foram consideradas significantes estatisticamente quando Pvalor ≤0,05.

#### 4 RESULTADOS

Os miRNAs da família let-7 investigados neste estudo foram expressos por células gliais de Müller da linhagem de rato (rMC-1) e humana (MIO-M1).

## 4.1 Expressão de let-7b, let-7c e let-7e em linhagem de células de Müller de ratos (rMC-1) tratadas com TGF-β1

Os miRNAs da família let-7 (let-7b, let-7c e let-7e) foram expressos por células de Müller da linhagem rMC-1, sendo que let-7b apresentou os maiores níveis, seguido de let-7c e let-7e. Utilizamos como normalizador o Sno, que não variou com o tratamento com TGF-β1, e que foi utilizado como gene de referência. Conforme pode ser observado na Fig. 8, ocorre uma alteração nos níveis dos vários miRNAs nos diferentes tempos de cultivo, com uma diminuição em 24h e retorno próximo aos valores iniciais, após 48h.



**Figura 8** - Análise da expressão de let-7b, let-7c e let-7e em células de Müller controle da linhagem rMC-1. As células foram privadas de soro por 24 h e analisadas após 6, 24 e 48 h de cultivo na presença de soro. Dados expressos em Fold Change e normalizado com Sno, tendo como calibrador a média dos CTs nos diferentes tempos. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

A partir daí, analisamos a expressão diferencial (fold change) desses miRNAs após 6, 24 e 48 h de tratamento com diferentes concentrações de TGF-β1 (1 ng, 5ng e 10 ng/ ml).

A influência de TGF- β1 sobre a expressão de let-7b, let-7c e let-7e em células da linhagem rMC-1 foi dependente da concentração e do tempo. TGF- β1 induziu uma tendência a aumento da expressão de let-7b, let-7c e let-7e após 6 h nas diferentes concentrações utilizadas, mas apenas para let-7c na menor concentração essa alteração foi estatisticamente significante (p<0,05; Fig. 9).



**Figura 9** - Análise da expressão de let7-b, let-7c e let-7e em células de Müller da linhagem rMC-1 após 6 h de tratamento com TGF- $\beta$ 1 nas concentrações de 1, 5 e 10 ng/ml. Dados expressos em Fold Change e normalizados com Sno, tendo como calibrador a média dos CTs do controle sem tratamento no tempo 6 h para cada um dos miRNAs. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Após 24 h de tratamento (Fig. 10), TGF- β1 induziu uma diminuição significante de cerca de 40% na expressão de let-7b (p<0,001) e uma tendência de diminuição de 20% para let-7c na concentração de 5 ng/ml. Apesar de não significante, houve uma regulação positiva para let-7.



**Figura 10** - Análise da expressão de let7-b, let-7c e let-7e em células de Müller da linhagem rMC-1 após 24 h de tratamento com TGF-β1 nas concentrações de 1, 5 e 10 ng/ml. Dados expressos em Fold Change e normalizados com Sno, tendo como calibrador a média dos CTs do controle sem tratamento no tempo 24 h para cada um dos miRNAs. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Após 48 h de tratamento, houve um aumento de 60-70% na expressão de let-7b, let-7c e let-7e na concentração de 1 ng/ml (p<0,001). Com 5 ng/ml de TGF-  $\beta$ 1, esses valores continuaram maiores que o controle, mas somente foi significante para let-7c (FC=1,5; p<0.001). Finalmente, não houve alteração com 10ng/ml de TGF-  $\beta$ 1 (Fig.11).



**Figura 11** - Análise da expressão de let7-b, let-7c e let-7e em células de Müller da linhagem rMC-1 após 48 h de tratamento com TGF- $\beta$ 1 nas concentrações de 1, 5 e 10 ng/ml. Dados expressos em Fold Change e normalizados com Sno, tendo como calibrador a média dos CTs do controle sem tratamento no tempo 24 h para cada um dos miRNAs. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

Se considerarmos as diferentes concentrações de TGF-  $\beta$ 1, temos que, de modo geral, o tratamento com a concentração mais baixa de TGF-  $\beta$ 1 (1 ng/ml) apresentou um aumento da expressão inicialmente (6 h), um retorno aos níveis do controle em 24h, e um aumento em 48 h.

A concentração de 5 ng/ml levou a um padrão similar, com a diferença de que em let-7b e let-7c sofreram uma regulação negativa 24 h. Por sua vez, a expressão desses miRNAs aumentou em 6 h e se mostrou semelhante ao controle nos demais tempos após tratamento com 10ng/ml de TGF-β1, com exceção de let-7e em 48h.

## 4.2 Avaliar a expressão de let-7b e let-7c em linhagem humana de células de Müller (MIO-M1) tratadas ou não com TGF-β1 e TGF-β2.

Considerando os resultados anteriores obtidos com a linhagem de ratos rMC1, utilizamos também a linhagem humana MIO-M1 derivada de células de Müller para investigar a influência de TGF-β1 e também de TGF-β2 sobre a expressão da família let-7.

Nesta etapa, restringimos o estudo para os miRNAs mais expressos, let-7b e let-7c, e tempos de 24 e 48h e concentração de 10ng/ml, que é a utilizada pela maioria dos trabalhos.

Foram utilizados, a princípio, os normalizadores U6 e RNU6B, mas tendo em vista as alterações de U6 com os tratamentos, RNU6B foi escolhido como gene de referência.

O tratamento com TGF-  $\beta$ 2 induziu regulação negativa significante da expressão de let-7b em 24 h (p<0,001) em cerca de 60% e uma tendência também em 48h (Fig.12). Por sua vez, o efeito de TGF- $\beta$ 1 foi observado somente após 48h, quando let-7b diminuiu aproximadamente 55% (p<0,05).



**Figura 12** - Análise da expressão de let-7b em células de Müller da linhagem humana MIO-M1 após 24 e 48 h de tratamento com TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml). Dados expressos em Fold Change e normalizados com RNU6B, tendo como calibrador a média dos CTs do controle sem tratamento no tempo 24 h para cada um dos miR-NAs. Resultado representativo de 4 experimentos independentes.

O tratamento com TGF- $\beta$ 2 induziu uma robusta diminuição de cerca de 70% na expressão de let-7c em 24 h (p<0,001; Flg.13). Após 48 h, tanto TGF- $\beta$ 1 como TGF- $\beta$ 2 diminuíram a expressão de let-7c em cerca de 50% (p<0,001).



**Figura 13** - Análise da expressão de let-7c em células de Müller da linhagem humana MIO-M1 após 24 e 48 h de tratamento com TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml). Dados expressos em Fold Change e normalizados com RNU6B, tendo como calibrador a média dos CTs do controle sem tratamento no tempo 24 h para cada um dos miR-NAs. Resultado representativo de 4 experimentos independentes.

## 4.3 Influência de TGF-β1 sobre a expressão de possíveis alvos de let-7 (Colágeno 1A1, Colágeno 1A2 e Hialuronan Sintase 2)

A busca por alvos preditos computacionalmente de microRNA let-7 (b/c/e) foi realizada on-line utilizando os programas: TargetScan (Lewis et al., 2005). A partir daí foram selecionados 3 alvos: COL1A1, COL1A2 e HAS2.

Analisamos o efeito do tratamento de TGF-β1 e TGF-β2 na expressão de COL1A1, COL1A2 e HAS2 na MIO-1 através da expressão diferencial e utilizamos o normalizador ARBP.

O cálculo do  $\Delta$  calibrador foi feito a partir da média da expressão de 3 amostras de controles 0 hora analisados especialmente para essa finalidade. Todos os calibradores em COL1A1 e COL1A2 apresentaram CTs com diferença menor que 1. A expressão de COL1A1 sofreu uma leve variação com o tempo de cultura de 0 a 24 h e permaneceu estável em 48 hs (Fig.14). O tratamento com TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 2 não levou a alterações de expressão de COL1A1 em 24 hs ou 48 h, com valores próximos aos controles não tratados.



Expressão de COL1A1 (fold change)

**Figura 14** - Análise da expressão relativa de COL1A1 em células de Müller da linhagem humana MIO-M1 após o tratamento com 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. COL1A1 é expresso em Fold Change e normalizado com o ARBP. A média da expressão dos CTs do controle sem tratamento no tempo 0 foi usada como calibrador. Resultado representativo de 1 experimento em triplicata.

Semelhante à COL1A1, a expressão de COL1A2 pouco variou com os tempos de cultura (Fig.15). O tratamento com TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 2 não levou a alterações de expressão de COL1A2 em 24 h ou 48 h, com valores próximos aos controles não tratados.



**Figura 15** - Análise da expressão relativa de COL1A2 em células de Müller da linhagem humana MIO-M1 após o tratamento com 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. COL1A2 é expresso em Fold Change e normalizado com o ARBP. A média da expressão dos CTs do controle sem tratamento no tempo 0 foi usada como calibrador Resultado representativo de 1 experimento em triplicata.

Quando analisamos a expressão de HAS2 após tratamento com TGF- $\beta$ 1, observamos uma diminuição ao redor de 30% da expressão em 24h, e mais ainda em 48 h (70%), comparado aos respectivos controles (Fig. 16). TGF- $\beta$ 2 também reduziu a expressão de HAS2 em cerca de 70% após 48h.



## Expressão de HAS2 (fold change)

CT 0 hora CT 24 horasTGF-beta1CT 48 horasTGF-beta1 TGF-beta2

**Figura 16** - Análise da expressão relativa de HAS2 em células de Müller da linhagem humana MIO-M1 após o tratamento com 10 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. HAS2 é expresso em Fold Change e normalizado com o ARBP. A média da expressão dos CTs do controle sem tratamento no tempo 0 foi usada como calibrador. Resultado representativo de 1 experimento em triplicata. Em suma, observamos que o tratamento com TGF-β1 na MIO1 não afeta de forma geral a expressão COL1A1 e COL1A2. Entretanto, o tratamento com TGF-β1 e TGF-β2 induziu uma diminuição na expressão gênica de HAS2, que se acentuou de forma robusta em 48 h com uma redução de 70% em relação ao controle.

## 4.4 Ensaio de gene repórter Luciferase para validação de COL1A1 e COL1A2 como alvos de let-7

Para a validação da regulação pós-transcricional dos alvos COL1A1 e COL1A2 como alvo de let-7c, foram construídos dois vetores para cada um deles no ensaio de gene repórter (Luciferase): 1) pmiRGlo-COL1A1-wt e pmiRGlo-COL1A2-wt, que contém o potencial sítio de ligação de let-7c na 3<sup>°</sup>UTR à jusante do gene repórter Luciferase; 20 pmiRGlo-COL1A1-Mut e pmiRGlo-COL1A2-Mut, no qual o potencial sítio de ligação de let-7c na 3<sup>°</sup>UTR contém mutações que inviabilizam a ligação entre o miRNA e o transcrito-alvo (Figura 7).

A validação da regulação pós-transcricional dos alvos COL1A1 e COL1A2 foi realizada através da co-transfecção transiente dos plasmídeos pmiR-Glo-Col1A1-wt ou pmiR-Glo-Col1A1-mut e pmiR-Glo-Col1A2-wt ou pmiR-Glo-Col1A2-mut na presença de *let-7c mimic* (10 nM) ou *let-7c mimic* e inibidor nas células MIO-M1.

Como mostrada na Figura 17, a transfecção transiente de pmiR-Glo-Col1A1wt em células da linhagem MIO-M1 na presença de let-7c mimics levou a um aumento, e não a uma diminuição da atividade da luciferase. Por outro lado, a presença do inibidor de let-7c promoveu uma redução da atividade. A transfecção transiente do plasmídeo contendo o sítio mutado (pmiR-Glo-Col1A1-mut) produziu aumento nos níveis de luminescência, que foi reduzido na presença de let-7c.



**Figura 17** – Ensaio de gene repórter para ligação de let-7c. Transfecção do plasmídeo contendo sítio selvagem de ligação predita de let-7c na região COL1A1 3'-UTR (pmiR-Glo-Col1A1-wt) ou o sítio mutado (pmiR-Glo-Col1A2-mut) na presença de let-7c mimic ou let-7c mimic + inibidor em células de Müller da linhagem MIO-M1. Valores normalizados pela luminescência da luciferase. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

No ensaio de gene repórter Luciferase para COL1A2 (Fig. 18), a presença de let-7c mimic levou a uma discreta diminuição da atividade da luciferase. No entanto, a co-transfecção com o inibidor de let-7c mostrou um robusto aumento da atividade de cerca de 50%. A utilização de plasmídeo repórter mutante (pmiR-Glo-Col1A1-mut) também produziu aumento na atividade da luciferase mesmo na presença de let-7c mimic.

Assim, esses experimentos sugerem que não existe uma efetiva ligação de let-7c no sítio predito, mas uma influência de outros genes pós-transcricionais de COL1A1 e COL1A2.



**Figura 18** – Ensaio de gene repórter para ligação de let-7c. Transfecção do plasmídeo contendo sítio selvagem de ligação predita de let-7c na região COL1A2 3'-UTR (pmiR-Glo-Col1A2-wt) ou o sítio mutado (pmiR-Glo-Col1A2-mut) na presença de let-7c mimic ou let-7c mimic + inibidor em células de Müller da linhagem MIO-M1. Valores normalizados pela luminescência da luciferase. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Considerando os resultados dos ensaios de gene repórter luciferase para validação de alvos, optamos por investigar se let-7b era capaz de interagir com a 3'UTR de COL1A2 levar à sua repressão pós-transcricional. Para isso, foram construídos e co-transfectados os plasmídeos repórter (pmiR-Glo-Col1A2-wt e pmiR-Glo-Col1A2-mut) juntamente com o miRNA mimético de let-7b nas células MIO-M1.

Conforme observado na Figura 19, let-7b mimic diminuiu a atividade da luciferase em cerca de 30%. No entanto, a co-transfecção com o inibidor de let-7b mostrou uma robusto aumento da atividade de cerca de 4x. A transfecção do plasmídeo repórter mutante (pmiR-Glo-Col1A2-mut) não produziu alterações nos níveis de luminescência, mas na presença de let-7b mimic um aumento da atividade da luciferase foi detectado.



**Figura 19** – Ensaio de gene repórter para ligação de let-7b. Transfecção do plasmídeo contendo sítio selvagem de ligação predita de let-7b na região COL1A2 3'-UTR (pmiR-Glo-Col1A2-wt) ou o sítio mutado (pmiR-Glo-Col1A2-mut) na presença de let-7b mimic ou let-7b mimic + inibidor em células de Müller da linhagem MIO-M1. Valores normalizados pela luminescência da luciferase. Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

Dessa forma, observamos a efetiva ligação de let-7b no sítio predito e a consequente repressão pós-transcricional de COL1A2, e também outras influências póstranscricionais sobre COL1A2.

# 4.5 Ensaio funcional de contração do gel de colágeno para avaliar a influência de let-7 (Fig. 20)

O ensaio de contração de gel de colágeno foi utilizado como modelo de estudo funcional para investigar a influência de miRNAs da família let-7c na sinalização de TGF- $\beta$  em células da linhagem MIO-M1. As células da linhagem MIO-M1 transfectadas ou não com mimic de let-7c foram submetidas ao tratamento com TGF- $\beta$  1 ou TGF- $\beta$ 2 (10 ng/mL).



**Figura 20** – Influência de let-7c na contração do gel de colágeno induzido por TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. Géis de colágeno contendo células da linhagem MIO-M1 foram expostos ou não a TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 (10 ng/ml) na presença ou ausência de let-7c mimic e fotografados depois de 16 h.

A análise do ensaio de contração de gel de colágeno sugere que existe uma contração mesmo no controle. Quando as células foram tratadas com TGF- $\beta$ 1 por 16 h não ocorreu alteração significativa na contração em relação ao controle (12% vs 14%; p=0,46), enquanto TGF- $\beta$ 2 foi até menos efetivo em promover a contração (19% vs 14%; p=0,02) comparado ao controle.

Por outro lado, o let-7c mimic levou a uma diminuição significativa da contração na ausência (23% vs 14%; p<0,05) ou presença de TGF- $\beta$ 1 (22% vs 12%; p<0,05), e uma tendência de diminuição para TGF- $\beta$ 2 (29% vs 19%; p=0,07) comparados aos respectivos controles sem let-7c mimic.

Em suma, let-7c mimics inibiu a contração de células gliais de Müller no gel de colágeno na ausência ou presença de TGF-β1.

## 4.6 identificação de miRNAS da família let-7 em amostras de vítreo humano coletadas durante a cirurgia de vitrectomia posterior via pars plana em olhos com diagnósticos de buraco macular, membrana epirretínica e descolamento de retina

Vitrectomia posterior via pars plana foi realizada em 7 pacientes, 4 com diagnóstico de buraco macular e 3 com o diagnóstico de descolamento regmatogênico. Conforme mencionado na seção de Material e Métodos, foram obtidas amostras do vítreo de diferentes áreas: central, pré-macular e periférica. No entanto, em todas as amostras as concentrações de RNA total encontradas foram extremamente baixas. Considerando o processo de quantificação e dosagem do RNA total, somente algumas que tiveram razão entre 1,8 e 2,0 puderam ser utilizadas.

O RNU6B foi testado para ser utilizado como gene de referência para normalização da expressão dos miRNA do experimento, mas os níveis endógenos do RNU6B foram indetectáveis nas nossas amostras de vítreo humano.

Embora não utilizando um normalizador, após a reação de PCR em tempo real, observa-se uma diferença entre a expressão do let-7b, nas amostras do paciente 1 (Fig. 21). Parece haver uma maior expressão gênica em regiões mais próximas do tecido retiniano, numa região conhecida como hialóide posterior. Já os resultados encontrados com a expressão de let-7d, nas amostras do paciente 1 foram seme-lhantes entre as diferentes regiões (Fig. 21).



**Figura 21** – Análise da expressão (CTs) de let7-b (esquerda) e let-7c (direita) em amostra vítrea de diferentes regiões de um paciente com diagnóstico de buraco de mácula.

## 5 DISCUSSÃO

As células de Müller constituem o principal tipo celular glial na retina dos vertebrados, promovendo o suporte estrutural e metabólico, a homeostase e a neuroproteção da retina neural, entre outras funções, assim como participando de eventos patológicos, como por exemplo na formação de membranas contráteis (Vecino, 2016; Reichenbach & Bringmann, 2013). Conforme descrito por Eastlake e colaboradores (Eastlake, 2016), as células de Müller constituem uma fonte importante de citocinas e fatores inflamatórios, que aumentam significativamente na retina gliótica. Dentre eles, podemos citar as diferentes isoformas de TGF-  $\beta$  (1,2 e 3).

TGF-  $\beta$ 1 é a isoforma predominante produzida pelas células de Müller *in vitro*, enquanto TGF-  $\beta$ 2 predomina na retina normal e é a única regulada positivamente na retina gliótica humana (Eastlake, 2016). De qualquer maneira, todas as três isoformas se ligam como homodímeros (forma mais ativa) ao TGFR2 (receptor 2 de TGF- $\beta$ ), que recruta e ativa TGFR1 para ativar a sinalização (rev. Meng, 2016).

TGF-β1 pode induzir fibrose por ativação das suas vias, dependentes ou não de Smad (canônica e não canônica, respectivamente), levando à apoptose, aumentando a síntese de matriz extracelular e reduzindo a degradação, assim como induzindo a transdiferenciação. Nos últimos anos, tem sido mostrado que miRNAs, que atuam como potentes reguladores pós transcricionais de diversas vias de sinalização, também podem participar dessa regulação (rev. Meng et al., 2016). No entanto, a identificação dos miRNAs e a validação da interferência com as vias de sinalização no vítreo e retina humano ainda não foram completamente estabelecidas.

Esses pequenos RNAs endógenos, identificados no vítreo humano pela primeira vez por Ragusa e colaboradores, apresentam uma expressão que difere em relação a outros fluídos biológicos, como o soro, a saliva ou a urina (Ragusa, 2013). Nesse contexto, a identificação das células e vias que podem levar à desrregulação dos microRNAs é importante para a compreensão das retinopatias vítreo-proliferativas.

O miRNA let-7 é frequentemente descrito como regulador negativo nos processos pró-fibróticos. Células mesangiais tratadas com TGF-β apresentaram uma diminuição da expressão, principalmente de let-7b e let7-c, após 6 e 12 h (Park, 2014).

Comparando os resultados do nosso estudo utilizando a linhagem rMC-1, também observamos uma diminuição importante da expressão de let7-b e -c, especialmente na concentração de 5 ng/ml após 24 h de tratamento com TGF- β1. Entretanto, de modo geral, houve um aumento da expressão em 6 h de tratamento com TGF-β1, independente da concentração, e em 48 h nas concentrações mais baixas (1 e 5 ng/ml). Na concentração mais elevada, 10 ng/ml, que é a mais utilizada nos trabalhos, a expressão dos let-7 se assemelhou ao controle.

É interessante mencionar que quando utilizamos a linhagem humana de células de Müller (MIO-M1), a expressão de let-7b e let-7c foi alterada com 10ng/ml de TGF- $\beta$ 1 ou TGF- $\beta$ 2. TGF- $\beta$ 2 induziu a uma queda da expressão de let-7b e let-7c, que variou entre 70% e 40 %, após 24 e 48 h de tratamento. Por sua vez, o tratamento com TGF- $\beta$ 1 levou a uma diminuição da expressão apenas em 48 h de tratamento. Os resultados estão de acordo com a análise dos miRNA no vítreo humano coletado do paciente com buraco macular e também em concordância com a literatura atual (Russo, 2017). O buraco macular provoca ou decorre de um aumento de TGF- $\beta$ 2 no vítreo, produzido pela célula de Müller (Kita, 2008; Eastlake, 2016), condição esta simulada no nosso experimento, levando à diminuição da expressão de let7-b e -c.

A expressão dos miRNAs esteve bastante reduzida em todas as amostras do controle 0h de MIO-M1. Os resultados foram diferentes em relação às outras amostras e apresentaram também um comportamento distinto em relação às amostras de rMC-1 tratadas.

Em nossos experimentos, seguimos os protocolos que usam linhagens celulares de hialócitos (Kita, 2008) e células mesangiais (Park, 2014), que preconizam a restrição de soro por 24 h antes de iniciar o tratamento. Esta prática é comum na maioria dos experimentos com linhagens celulares para equalizar todas as células no mesmo ciclo celular e eventualmente eliminar citocinas e fatores inflamatórios que estejam presentes no soro.

Entretanto, a restrição total de soro por 24 h pode levar a uma alteração relevante no perfil proteico, como já observada em células trofoblásticas da placenta (Novoa-Herran, 2016). Estudos com membrana epirretínica utilizando MIO-M1 (Bu, 2015) e com linhagem de células do epitélio pigmentado da retina imortalizada tratadas com TGF-β1 para avaliação de miR-21 (Usui-Ouchi, 2016) não realizaram restrição de soro em suas metodologias. Portanto, essa condição pode ter influenciado nos nossos resultados e foi uma das razões de não termos incluído o tempo de 6h nos experimentos com a linhagem MIO-M1.

Observando a literatura, até o presente momento não encontramos estudos com MIO-M1 tratado com TGF- $\beta$  associado à avaliação da expressão da família let-7. Encontramos um estudo de retinoblastoma, o tumor de retina mais comum na infância desenvolvido a partir de células precursoras dos fotorreceptores, que utilizou a MIO-M1 como normalizador em relação a linhagens de retinoblastoma, e avaliou a uma diminuição global da expressão da família let-7 na presença deste tumor (Danda, 2013).

Considerando os resultados sobre a influência de TGF-  $\beta$  em linhagens de células de Müller de rato e humana, nosso estudo demonstrou que alterações do micro-ambiente, causadas por diferentes concentrações de TGF-  $\beta$ 1 e TGF-  $\beta$ 2 levam a alterações do padrão de expressão de miRNAs da família let7. Além disso, que TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 levam à diminuição do padrão de expressão de miRNAs da família let-7 na única linhagem humana de células de Müller que mantêm as características fenotípicas e funcionais.

A partir daí fomos investigar os possíveis alvos desses miRNAs e que poderiam estar correlacionados à alteração da interface vítreo-retiniana.

A família let-7 possui a mesma sequência heptamétrica conservada (*seed se-quence*), que em geral está situada nas posições 2-7 do miRNA 5´-end, e essa sequência vai se ligar ao RNA mensageiro. Portanto, podemos afirmar que eles têm genes alvos em comum, e analisando Target Scan (<u>http://www.targetscan.org/</u>) observamos alvos como COL1A1, COL1A2 e HAS2, proteínas que possuem relação com as doenças da interface vítreo-retiniana.

A fisiopatologia das doenças da interface vítreo-retiniana depende da compreensão das alterações da matriz extracelular do vítreo. Estudos com amostras removidas durante a vitrectomia de membranas epirretínicas demonstram a presença de GFAP (glial acidic fibrillary protein), um dos marcadores de células de Müller, e a presença de α-SMA (smooth muscle actin), um dos marcadores de miofibroblastos, associado a um aumento de produção e rearranjo de colágeno tipo I e IV (Bu, 2014). O colágeno tipo I, um componente abundante da matriz extracelular, é sintetizado por 2 genes, COL1A1 e COL1A2.

Em nosso estudo, não houve alteração da expressão de RNAm de COL1A1 e COL1A2 após a estimulação de MIO-M1 com TGF-β1 e TGF-β2. O mesmo aconteceu com a expressão gênica de COL1A1, mas não com a de COL1A2, que diminuiu em fibroblastos tratados com TGF-β (Dzobo: Leaner; Parker, 2014). Os autores concluíram que a produção de RNAm era regulada por múltiplos estágios, e essa interferência dificultava uma correlação entre o estímulo na célula, a produção do RNAm e da proteína.

O HAS2 é o gene que sintetiza o glicosaminoglicano hialuronan, que tem um papel importante da formação da matriz extracelular em geral, sendo o principal responsável pela estrutura gelatinosa do vítreo. Em retina de galinhas, observou-se um aumento de atividade de HAS2 durante o desenvolvimento da retina. O aumento de HAS2 no sistema nervoso central pode estar relacionado a processos de lesão neuronal, cicatrização e doenças desmielinizantes (Sherman, 2015). Em nossos experimentos, observamos que a expressão de HAS2 diminuiu após o tratamento com TGF- β1 e TGF-β2 em MIO-M1.

Em nosso estudo, validamos COL1A2 como um novo alvo de let-7b na célula de Müller, uma vez que let-7b interage com o mRNA. Portanto, a expressão de COL1A2 é negativamente correlacionada como gene alvo direto de let-7b. Ao estabelecer uma ligação funcional, podemos propor que o aumento de let-7b diminui a síntese da cadeia alfa2 de colágeno do tipo I da matriz extracelular. Ji e colaboradores também correlacionaram negativamente COL1A2 com let7-g em linhagem celular de carcinoma hepático (Ji, 2010).

Observamos um aumento expressivo da luciferase em MIO-M1 transfectado com mimic let-7b e inibidor de let7-b. Esperávamos que o resultado fosse semelhante à amostra que não recebeu nenhum tratamento, simulando uma condição em que anulamos o estímulo causado à linhagem. Da mesma forma, nas células MIO-M1 transfectadas com mimic let-7b e plasmídeo com a sequência trocada, observamos um aumento da expressão da luciferase. Possíveis diferenças na eficiência entre

mimic e inibidor podem explicar o primeiro resultado, assim como a existência de vários fatores que podem estar presentes no meio ou na própria linhagem poderiam alterar a expressão da Renilla luciferase (Shifera e Hardin, 2010).

Nos estudos funcionais utilizando o ensaio de contração de gel de colágeno, observamos uma forte correlação entre a presença de citocina TGF- β1 e TGF- β2 em células de Müller e a sua modulação pelo miRNA let-7c.

Comparando o ensaio de contração semelhante realizado com hialócitos (Kita, 2008), ele observou que, na ausência de TGF-beta, o gel com hialócitos não apresenta contração, mas em nossos experimentos com MIO-M1 o gel contraiu. Observamos também que as nossas amostras apresentaram uma contração satisfatória após 12 h, e as amostras com hialócitos foram analisadas após 3 dias. Nas análises após o período de 21 h, observamos uma forte contração, o que dificultava a delimitação da área do gel. Além disso, observamos que, com restrição de soro, ocorre uma menor contração com 12 h, e aparentemente satisfatória após 18 h da restrição de soro, com resultados semelhantes ao de outros autores (Novoa-Herran, 2016).

O vítreo humano é composto de forma majoritária por água; entretanto, ele contém proteínas que ainda não foram completamente estudadas. Um estudo analisando quatro diferentes áreas do vítreo: hialóide anterior, córtex vítreo, vítreo central e base vítrea, mostrou uma variada expressão proteica que se diferencia por regiões e se segmenta também por vias inflamatórias específicas (Skeie, 2015). Por isso, utilizamos uma técnica cirúrgica que prioriza a coleta do vítreo de diferentes áreas do vítreo: região central, região pré-macular e região periférica. A técnica descrita de coleta de vítreo humano durante a cirurgia de vitrectomia posterior via pars plana (Kita, 2008; Russo, 2017) prioriza apenas a região central. Desta forma, encontra-mos variação da quantidade de microRNA quando comparamos o let-7b encontrado no vítreo cortical e o vítreo central, sendo o vítreo periférico com maior expressão gênica.

Outra diferença técnica utilizada foi a abertura da infusão de solução salina balanceada, um líquido enriquecido cuja a função é repor o espaço correspondente ao vítreo removido. Autores descrevem a técnica de extração do vítreo com a infusão fechada, e colhendo amostras que variaram de 400 a 2000 µl (Kakkassery, 2017 ; Russo, 2017), que corresponde a 50% do volume vítreo, uma situação que evitamos no nosso estudo devido a riscos de perda da integridade do globo ocular causada pela hipotonia, que pode gerar prejuízos a visual e até a perda do globo ocular devido a uma hemorragia expulsiva. Em consequência disso, a amostra obtida foi caracterizada por uma concentração mínima de RNA total devido a diluição do vítreo.

Neste estudo observamos a ação de miRNA em retinopatias vítreo-proliferativas, identificando uma baixa expressão de let7-b e let7-d em amostras vítreas de pacientes com buraco macular.

A análise não normalizada obtida da expressão gênica obtida do vítreo de pacientes com buraco macular e uma baixa expressão de let7-b e let7-e, são comparáveis com os dados também não normalizados encontrados por um trabalho recente que analisou pacientes com buraco macular e comparou com o vítreo de pacientes que foram operados por moscas volantes (Russo, 2017). Esses autores encontraram CTs de let7-b que variaram de 40 a 33,1 em pacientes com buraco macular e naqueles com descolamento de vítreo posterior, que foram considerados como controles, apresentaram CTs entre 16 a 18, mostrando uma redução importante de expressão.

Uma questão importante em nossos estudos foi o normalizador, visto que há uma grande controvérsia sobre o normalizador ideal em amostras humanas. Os primeiros trabalhos sobre vítreo não mostravam um normalizador definido, sendo ele escolhido de acordo com a amostra e o miRNA em estudo (Ragusa, 2013) e, portanto, testamos como normalizador RNU6B. No entanto, não foi detectado nas nossas amostras. O RNU6B foi um dos primeiros a ser usado como normalizador por ser muito utilizado em culturas de células, entretanto, entre tecidos coletados temos menor evidencia da sua eficiência. U6 também foi utilizado como normalizador, mas para pesquisa de soro de pacientes com sepse e cirrose hepática comparado com paciente saudáveis, ele não se mostrou um bom normalizador (Benz, 2013). Apesar de frequentemente o RNU6B e U6 (RNU6A) serem escolhidos como normalizadores, eles não são miRNAs e sim RNAs pequenos e não codificantes, portanto, não refletem a mesma eficiência na sua extração, transcrição reversa e amplificação do PCR em relação aos miRNAs. Devido a esse aspecto, há também autores que defendem o abandono do normalizador, o que deve ser analisado com muito cuidado (Schwarzenbach, 2015).

Os miRNAs sugeridos pelos fabricante da StepOnePlus RT-PCR System (Life rechnologies, Applied Biosystems) eram o microRNA-103, microRNA-191, microR-NA-42-5p, microRNA-16, microRNA-425, microRNA-93 e microRNA-451, entretanto após análise para estudos com amostra vítrea o único que se mostrou um normalizador aceitável foi o miRNA-16, quando comparado a amostras de pacientes com linfoma (Tuo et al., 2014 e Ménard et al. 2016). Outro miRNA citado com um norma-lizador foi RN44 em amostras vítreas coletadas de pacientes com descolamento regmatogênico de retina (Takayama et al, 2016; Fulzele et al, 2015). As publicações mais recentes elegem o U6 como um bom normalizador (Usui-Ouchi, 2016; Russo, 2017).

Dados da literatura demonstram que os miRNAs let7 são diretamente modulados pela sinalização da via TGF- $\beta$  (Parker, 2014). Em nosso estudo foi encontrada uma baixa expressão de let7-b e let7-e em uma análise não normalizada obtida da expressão gênica obtida do vítreo de pacientes com buraco macular. Outros autores mostraram que amostras vítreas de pacientes com buraco macular apresentam diminuição da expressão de let7, assim como uma importante diminuição outros miR-19b e miR-24 (Russo, 2017), que estão correlacionados à via de sinalização do TGF- $\beta$  em neuroblastoma (Mestdagh, 2010) e em células musculares esqueléticas (Sun, 2008). Dessa forma esse conjunto de achados reforçam a influência de uma grupo de miRNA que são encontrados alterados em amostras de vítreo de pacientes com BM, doença que possuem grande influência de TGF- $\beta$  na sua fisiopatogenia (Sebag, 2014; Kita, 2008).

Outras células que tem um grande potencial na produção de miRNAs são os hialócitos. Foi mostrado por imunohistoquímica, a presença de TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 e  $\beta$ -3 em hialócitos de globos oculares provenientes de banco de tecidos (Lutty, 1993). O tratamento com 1ng/ml de TGF- $\beta$ 1 provoca um aumento de até 3 vezes na produção da matriz extracelular em hialócitos (Sommer, 2008). Entretanto, dificuldades para o crescimento de uma cultura primária de hialócitos de ratos, ausência de literatura com uma metodologia clara e principalmente ausência de uma linhagem imortaliza-da humana, nos desestimularam o estudo dos hialócitos no momento.

Assim, o processo inflamatório tem um papel central na patogenênese das retinopatias vítreo-proliferativas, e sua melhor compreensão é o caminho para a prevenção da cegueira. A formação de membranas contráteis, que causam lesões irreversíveis na retina neurossensorial, decorre do desbalanço de fatores inflamatórios e citocinas no vítreo e na retina e como nosso trabalho sugere, também de miRNAs.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo indica que os miRNAs são modulados pelas vias inflamatórias e exercem importantes efeitos na modulação da matriz extracelular, visto que:

- TGF-β1 e TGF-β2 induziram diminuição da expressão de let-7 linhagem humana de células de Müller (MIO-M1) e na linhagem de rato de células de Müller (rMC-1) em determinadas condições;
- TGF-β1 e TGF-β2 não alteraram a expressão gênica das cadeias alfa 1 e alfa 2 do colágeno tipo 1, mas alteraram da enzima de síntese de hialuronan em células de Müller da linhagem humana MIO-M1;
- COL1A2 é alvo de let7-b, segundo o ensaio de gene reporter por luciferase;
- let-7c inibe a contratilidade das células gliais de Müller da linhagem MIO-M1;
- 5. let-7 está presente em amostra de vítreo humano com retinopatia vítreoproliferativa.

Dessa forma, neste estudo concluímos que o micro-ambiente das células de Müller na retina vítreo-proliferativa, caracterizado pelo aumento da expressão de TGF-β1 e TGF-β2, leva a uma diminuição dos miRNA da família let7. Consequentemente, é possível que haja remodelação da matriz extracelular, levando à formação de membranas densas e contráteis.

Esses resultados devem contribuir tanto para o entendimento como para o desenvolvimento de alvos terapêuticos mais eficientes para o tratamento das doenças da interface vítreo-retínica.

## **REFERÊNCIAS\***

Bellhorn FA, Wise GN, Henkind P. Ultrastructure and clinicopathologic correlation of idiopathic preretinal macular fibrosis. Am J Ophthalmol. 1975 Mar; 79: 366-73.

Benz F, et al. U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. Experimental & Molecular Medicine. 2013 Sep; 45(9): 42.

Bringmann A, Wiedemann P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2009 Jul; 247(7): 865–83.

Bu SC, et al. Substrate Elastic Modulus Regulates the Morphology, Focal Adhesions, and alpha-smooth Muscle Actin Expression of Retinal Muller Cells. Invest OphthalmoL Vis Sci. 2015 Sep; 56(10): 5974-82.

Chomcznski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extration. Anal Biochem. 1987 Apr; 162(1): 156-9.

Danda R, et al. Targeted Expression of Suicide Gene by Tissue-Specific Promoter and MicroRNA Regulation for Cancer Gene Therapy. PLoS ONE. 2013 Dec; 8(12): e83398.

Duker JS, et al. The Internacional Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction and macular hole. Ophthalmology. 2013 Dec; 120(12), 2611-9.

<sup>\*</sup>De acordo com: Internacional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: HTTPS://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform.requirements.html

Dzobo K, Leaner VD, Parker MI. Absence of feedback regulation in the synthesis of COL1A1. Life Sci. 2014 May;103(1): 25-33.

Eastlake K, et al. Müller Glia as an Important Source of Cytokines and Inflammatory Factors Present in the Gliotic Retina During Proliferative Vitreoretinopathy. Glia. 2016 Apr; 64(4): 495-606.

Ebihara N, et al. Expression and function of fibroblast growth factor-inducible 14 in human cornal myofibroblasts. Exp. Eye Res. 2009 Aug; 89(2): 256-262.

Figueroa MS, López-Caballero C; Contreras I. Resultados anatómicos y funcionales de la vitrectomía aislada en el tratamiento del desprendimiento de retina regmatógeno pseudofáquico. Arch Soc Esp Oftalmol. 2010; 85: 59-63.

Fulzele S, et al. MicroRNA-146b-3p Regulates Retinal Inflammation by Suppressing Adenosine Deaminase-2 in Diabetes. BioMed Research International [internet]. 2015 Mar [citado em 01 mar 2015] 15:846501. doi:10.1155/2015/846501. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359882/

Gass JDM. Idiopathic senile macular hole: its early stages and pathogenesis. Arch Ophthalmol. 1988 May;106(5): 629-39.

Guidry C, Bradley KM, King, JL. Tractional force generation by human Müller cells: growth factor responsiveness and integrin receptor. Invest OphthalmoL Vis Sci. 2003 Mar; 44(3): 1355-63.

Hirayama K, et al. The involvement of the Rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:3896–3903.
Hirota K, et al. Comparisons of microRNA expression profiles in vitreous humor between eyes with macular hole and eyes with proliferative diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2015 Mar; 253(3): 335-42.

Honjo Y, et al. Neuron-specific TGF-beta signaling deficiency results in retinal detachment and cataracts in mice. Biochem Biophys Res Com. 2007 Feb; 352(2): 418-22.

Iannetti L, et al. Role of the Intravitreal Growth Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Epiretinal Membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:3896–3903. 2011 Jul; 52(8): 5786-9.

Inoue Y, et al. Hyaluronan dynamics during retinal development. Brain Research. 2009 Feb; 1256: 55-60.

Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Apr; 11(4):252–63.

Ji J, et al. Let-7g targets collagen type I  $\alpha$ 2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 2010 May ;52(5):690-7.

Johnson SM, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell. 2005 may; 120(5): 635-47.

Kakkassery V, et al. Vitreous microRNA levels as diagnostic biomarkers for vitreoretinal lymphoma. Blood. 2017 Jun; 129(23):3130-3.

Kara José N, Alves M e Oliveira P. Como educar a população para a prevenção do trauma ocular. Arq Bras Oftalmol, 55:160-2,1992.

Katsman D, et al. Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Induce Gene Expression Changes in Muller Cells of the Retina. PLos ONE. 2012 Nov 7(11), e50417.

Kei T, et al. Increased Ocular Levels of MicroRNA-148a in Cases of Retinal Detachment Promote Epithelial–Mesenchymal Transition. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016 Jun; 57(6):2699-705. doi:10.1167/iovs.15-18660.

Kelly NE, Wendel RT. Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study. Arch Ophthalmol. 1991 May; 109(5): 654-659.

Kenyon KR, Michels RG. Ultrastructure of epirretinal membrane removed by pars plana vitreoretinal surgery. Am J Ophthal. 1977 Jun; 86(6), 815-23.

Kimura ET et al. TGFb, activina e sinalização SMAD em câncer de tiróide. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 2007 v. 51, p. 683-689.

Kita T, et al. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. PNAS. 2008 Nov, 105 (45), 17504-9. doi: 10.1073/pnas. 0804054105.

Kovacs B et al. MicroRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Jun 21;52(7):4402-9.

Krol L, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat. Rev. Genet. 2010 Nov; 11(9);597-610.

Leask A, Holmes A, Abraham DJ: Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. Curr Reumatol Rep. 2002.4:136-142. Lei H et al. Growth Factors outside the PDGF Family Drive Experimental PVR. IOVS 2009; 50 (7) 3394-3403.

Limb GA, et al. In Vitro Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Müller Cell Line (MIO-M1). Invest Ophthalmol Visual Science. 2002 Mar; 43(3): 864-869.

Limb GA, et al. Distribution of cytokine proteins within epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. Curr Eye Res. 1994 Nov; 13(11);791–8.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods. 2001 Dec; 25(4):402-8.

Lutty G A, et al. Heterogeneity in localization of isoforms of TGF-beta in human retina, vitreous, and choroid. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1993 Mar; 34(3): 477-87.

McArthur K, et al. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. Diabetes. 2011 Apr;60(4):1314-23.

Ménard C, et al. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. Oncotarget. 2016 Apr; 7(15):19171-84. doi:10.18632/oncotarget. 8280.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF-β: the master regulator of fibrosis. Nat Rev Nephrol. 2016 Jun;12(6):325-38. doi: 10.1038/nrneph.2016.48.

Mestdagh P, et al. The miR-17 92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- $\beta$  pathway in neur blastoma. Mol Cell. 2010 Dec 10; 40(5):762–73.

Michalewska Z, Michalewski J, Adelman RA. Inverted internal limiting membrane flap technique for large macular holes. Ophthalmology. 2010 Oct; 117 (10), 2018-25.

Mitchell P, et al. Prevalence and association of epirretinal membranes. The Blue Montains Eye Study. Ophthalmology. 1997 Jun; 104(6):1033-1040.

Nassaralla JR JJ e Nassaralla BA. Degenerações periféricas da retina do olho míope X LASIK. Arq Bras Oftalmol. 2004; 67(2).

Novoa-Herran S, et al. Serum depletion induces changes in protein expression in the trophoblast-derived cell line HTR-8/SVneo. Cell Mol Biol Lett. 2016 Oct; 16: 21-22.

Odriozola A, et al. miRNA analysis in vitreous humor to determine the time oft death: a proof-of concept pilot study. Int J Legal Med [internet]. 2013 Dec [citado em 20 Dec 2012]; 127: 573-8.

Park JT, et al. Repression of let-7 by transforming growth factor- Beta1-induced Lin28 upregulates collagen expression in glomerular mesangial cells under diabetic conditions. Am J. Physiol Renal Physiol; 2014 Dec; 307 (12): 1390-1403.

Pasquinelli AE, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature. 2000 Nov; 408(6808): 86–9.

Peter M.E. Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluriopotency and cancer progression. Cell Cycle. 2009 Mar; 8(6), 843-52.

Ragusa M, et al. MicroRNAs in vitreus humor from patients with ocular diseases. Mol Vis. 2013; 19:430-40.

Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D. Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. Nat Cell Biol. 2010 Nov;12(11):1101-7.

Ramachandran R, et al. Conditional gene expression and lineage tracing of tuba1a expressing cells during zebrafish development and retina regeneration. J. Comp. Neurol. 2010 Oct, 518(20): 4196-212.

Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. Glia. 2013 May; 61(5): 651-78.

Russo A, et al. miRNAs in the vitreous humor of patients affected by idiopathic epiretinal membrane and macular hole. PLoS ONE 2017 Mar;12(3): e0174297.

Sarthy VP, et al. Establishment and characterization of a retinal Muller cell line. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998 Jan; 39 (1): 212–6.

Schwarzenbach H, et al. Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? Clinical chemistry. 2015 Nov; 61(11): 1333-42.

Sebag J. Vitreous: in Health and Disease. New York: Springer 2014.

Sen HA, et al. The role of breakdown of the blood-retinal barrier in cell-injection models of proliferative vitreoretinopathy. Arch Ophthalmol, 1988; 106: 1685-1687.

Sherman LS, et al. Hyaluronan Synthesis, Catabolism, and Signaling in Neurodegenerative Diseases. International Journal of Cell Biology [internet]. 2015 Sep [citado em 10 Sep 2015]: 368584. Shifera AS, Hardin JA. Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. Anal Biochem [internet]. 2010; 396(2):167-72.

Siqueira RC e Oréfice F. Descolamento de retina e vitreorretinopatia proliferativa. Exame clínico da retina e vítreo. Rio de Janeiro: Cultura Médica: p. 96, 2009.

Skeie JM, Roybal CN, Mahajan VB. Proteomic Insight into the Molecular Function of the Vitreous. PLoS ONE [internet]. 2015 May]; 10(5): e0127567.

Smiddy WE, et al. Transforming growth factor beta. A biologic chorioretinal glue. Arch Ophthalmol. 1989; 107, 577–80.

Stanford MR, Chignell AH. Surgical treatment of superior bullous rhegmatogenous retinal detachments. Br J Ophthalmol. 1985; 69:729-32.

Sun Q, et al. Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. Nucleic Acids Res. 2008 May; 36(8): 2690–9.

Takayama K et al. Increased Ocular Levels of MicroRNA-148a in Cases of Retinal Detachment Promote Epithelial-Mesenchymal Transition. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 May 1;57(6):2699-705.

Tam ALC, et al. The current surgical management of large, recurrent, or persistent macular holes. Retina. 2018 Jul; 38(7): 1263-75.

Tani P, Robertson DM, Langworthy A. Prognosis for central vision and anatomic reattachment in rhegmatogenous retinal detachment with macula detached. Am J Ophthalmol. 1981; 92:611-2. Tuo J, et al. "Distinct microRNA-155 Expression in the Vitreous of Patients with Primary Vitreoretinal Lymphoma and Uveitis." American journal of ophthalmology. 2014 Mar; 157(3): 728–34.

Usui-Ouchi A, et al. Upregulation of Mir-21 Levels in the Vitreous Humor Is Associated with Development of Proliferative Vitreoretinal Disease. PLoS ONE 2016 Jun [11(6): e0158043.

Vecino E, et al. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Prog Retin Eye Res. 2016 Mar; 51:1-40.

Villarreal Jr et al., Coordinated Regulation of Extracellular Matrix Synthesis by the MicroRNA-29 Family in the Trabecular Meshwork. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2011; vol. 52 (6) 3391-339.

Wilkins JR, et al. Characterization of Epiretinal Membranes Using Optical Coherence Tomography. Ophthalmology. 1996 Dec; 103(12): 2142-51.

Wohl SG, Reh TA. The microRNA expression profile of mouse Müller glia in vivo and in vitro. Sci Rep. 2016 Oct 14;6: 35423.

Yafai Y, et al. Muller glial cells inhibit proliferation of retinal endothelial cells via TGFbeta2 and Smad signaling. Glia. 2014 Sep; 62(9): 1476-85.

Wu DC, Hamassaki DE. Anatomia, Fisiologia e Embriologia do Vítreo. In Frazão MAM. CBO-Diagnóstico em Oftalmologia da Anamnese à Genética. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, 2017.

Zhao XY, et al. Vitrectomy for patientes with proliferative vitreoretinopathy retinal detachment: a meta-analysis of prospective studies. Retina. 2018 Jul; 28 (3), 462-470.