

LIGIA AKEMI KIYUNA

Análise da atividade e expressão da proteína Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível papel protetor da enzima ALDH2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar B. Ferreira

Versão original.

São Paulo
2018

RESUMO

Kiyuna L.A. Análise da atividade e expressão da proteína Dicer em condições de estresse de aldeídos: possível papel protetor da enzima ALDH2. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, processo exacerbado no quadro de estresse oxidativo. Em função de sua alta reatividade com biomoléculas, seu acúmulo tem sido relacionado ao estabelecimento e progressão de inúmeras doenças, incluindo as cardiovasculares. Recentemente, nosso grupo identificou a interação entre 4-HNE e a proteína Dicer em coração de ratos com insuficiência cardíaca (dados não publicados). Dicer é uma RNase importante na biogênese de microRNAs (miRNA), com papel na regulação gênica pós-transcricional, de modo que alterações em sua função poderiam afetar diversos processos celulares. Tanto a interação entre o aldeído e Dicer, quanto o efeito sobre a mesma não foram descritos na literatura. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do 4-HNE na atividade e a expressão da Dicer. Nossa hipótese é que o 4-HNE afete negativamente o perfil de atividade e expressão da Dicer. Para testar essa hipótese, utilizamos o modelo animal de disfunção cardíaca induzida cirurgicamente e avaliamos: a formação de adutos de 4-HNE-proteínas, atividade e expressão de Dicer, e os níveis de miRNAs cardíacos. Em cultura celular (H9C2, MEF e HEK293), por sua vez, avaliamos o efeito agudo de 4-HNE sobre as mesmas variáveis após sua adição no meio de cultura. E, por último, utilizando a proteína recombinante, analisamos o efeito direto do aldeído sobre a estabilidade e atividade da enzima *in vitro*. Como esperado, em ensaios com a proteína isolada, observamos que o 4-HNE interage diretamente com a RNase Dicer, e a formação de conjugados Dicer-4-HNE é responsável pela inibição e perda de estabilidade da proteína de forma tempo- e concentração-dependentes. No modelo animal, demonstramos um prejuízo na atividade de Dicer no coração de animais com disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio, sem alteração em sua expressão, acompanhado de diminuição dos níveis da maioria dos miRNAs analisados. Notavelmente, ambos os parâmetros, assim como os níveis de adutos de 4-HNE-proteínas, foram melhorados no grupo tratado com Alda-1, agonista alostérico

da enzima ALDH2 (responsável pela remoção do 4-HNE). Dessa forma, sugerimos a existência de associação entre os níveis de 4-HNE, atividade de Dicer e alteração na expressão de miRNAs no quadro de disfunção cardíaca. Consistente com os dados observados *in vivo*, em modelos celulares, a exposição aguda ao 4-HNE demonstrou reduzir a atividade de Dicer e afetar a via de biossíntese de miRNAs. Porém, não observamos proteção por Alda nesse modelo. Conjuntamente, nossos dados sugerem que a atividade de Dicer é modulada por 4-HNE em quadros de estresse agudo e crônico de aldeídos. Contudo, mais estudos são necessários a fim de elucidar o mecanismo pelo qual essa modulação ocorre. Visto que o acúmulo de 4-HNE e a desregulação na biogênese de miRNAs tem sido associados ao desenvolvimento de patologias, o estudo da interação entre Dicer e o aldeído é importante na compreensão dessas doenças e planejamento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Dicer. microRNAs. 4-HNE. Estresse oxidativo. Disfunção cardíaca.

ABSTRACT

Kiyuna L. A. Impact of aldehydes on Dicer activity and expression: potential benefits of ALDH2 activation. [Dissertation (Master thesis in Morphofunctional Sciences)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) is a major by-product of lipid peroxidation, a process that is exacerbated under oxidative stress conditions. This aldehyde is a very reactive molecule associated with the establishment and progression of many diseases, including cardiovascular diseases. We recently found using proteomics that 4-HNE directly targets Dicer in failing hearts, a critical enzyme for miRNA biology (unpublished data). Neither the aldehyde-Dicer adduction, nor its effect on protein stability and activity has been previously reported. Therefore, this study aimed to fill this gap by further investigating 4-HNE-Dicer interaction and characterizing its effect on Dicer profile. We hypothesize that 4-HNE will make adducts with Dicer and compromise its function and levels. Using an animal model of cardiac dysfunction, we evaluated the following parameters: levels of 4-HNE adducted proteins, Dicer levels and activity, and the levels of heart specific miRNAs (myomiRs). The same variables were analyzed in distinct cellular models (H9C2, MEF, HEK293) after acute exposure to 4-HNE. Additionally, we synthesized recombinant Dicer, and protein function and stability were assessed *in vitro*. As expected, the experiments with recombinant protein revealed that 4-HNE directly interacts with Dicer, and the formation of 4-HNE-DICER adduct causes loss of Dicer cleavage activity and stability in a time- and concentration-dependent manner. Regarding the animal model, Dicer activity, but not protein levels, dropped in failing hearts, which was paralleled by a reduction of mature miRNA levels. Of interest, animals with cardiac dysfunction chronically treated with a small molecule activator of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), termed Alda-1, displayed an elevated cardiac Dicer activity and mature miRNA levels compared with vehicle-treated animals. ALDH2 is the main enzyme responsible for 4-HNE clearance. In this context, this study points out a potential connection among 4-HNE levels, Dicer activity and myomiR levels in cardiac dysfunction. Consistent with our *in vivo* data, cells acutely exposed to 4-HNE showed an increase in 4-HNE-protein adducts followed by a reduction in Dicer activity and changes in miRNA biosynthesis. However, Alda showed no protective effect in the

latter model. Taken together, our findings using animal and cellular models suggest that Dicer activity is impaired in chronic (cardiac dysfunction) and acute aldehyde stress conditions. However, the molecular mechanisms involved in this response are still unclear. As both 4-HNE accumulation and microRNAs have been linked to innumerous pathologies, clarifying the modulation of Dicer activity under such conditions will certainly contribute to a better understanding the diseases and future therapeutic strategies.

Keywords: Dicer. microRNAs. 4-HNE. Oxidative stress. Cardiac dysfunction.

1. INTRODUÇÃO

Segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre doenças não transmissíveis, no ano de 2012, as doenças cardiovasculares foram identificadas como a principal causa de morte no mundo (31,25% das mortes) (1). Dentre elas, as doenças isquêmicas do coração (DIC) foram responsáveis por 7,4 milhões de óbitos, valor correspondente a 13,21% do total registrado globalmente no mesmo período. No Brasil, em 2016, as mortes por DIC representaram 8,9% do total computado no país (2), proporção semelhante àquela obtida em 2006 (8,8%) (2).

As DIC encontram-se entre as principais causas de insuficiência cardíaca (IC) (3), a qual também é a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório. Ela é definida pela incapacidade dos ventrículos em bombear a quantidade de sangue necessária para suprir as necessidades do organismo (4), apresentando, quando crônica, manifestações clínicas como retenção de fluidos, edema periférico e congestão pulmonar, em casos mais graves.

Diversos estudos descrevem um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no coração em insuficiência (5,6), caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Além da sua ação direta sobre os constituintes celulares, as EROs são responsáveis pela geração de outras moléculas pró-oxidantes, como é o caso do aldeído 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), produto da peroxidação lipídica. Esse aldeído apresenta alta reatividade com biomoléculas, sendo capaz de formar ligações de alta afinidade (adutos) com proteínas, lipídios e DNA, as quais estão associadas à modificação da função e degradação de seus alvos, de modo que seu acúmulo tem sido correlacionado ao desenvolvimento de inúmeras doenças como o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (7).

Experimentos prévios do nosso laboratório, utilizando ratos com insuficiência cardíaca (IC), identificaram um aumento significativo nos níveis de 4-HNE cardíaco, associado ao desenvolvimento da patologia (8). No mesmo trabalho, uma análise proteômica dos alvos do aldeído, identificou a endonuclease Dicer, proteína essencial na biogênese de miRNAs, como um deles (dados não publicados). Entretanto, tanto a interação com o aldeído, como o efeito da mesma sobre a proteína, não foram descritas na literatura.

1.1. Estresse Oxidativo, 4-Hidroxi-2-Nonenal (4-HNE) e Aldeído Desidrogenase 2 (ALDH2)

Espécies reativas de oxigênio, denominação ampla que inclui os radicais livres (como os radicais superóxido, hidroxila, peroxila) e espécies não radicalares (ex.: peróxido de hidrogênio), são, em diferentes graus, reativas com biomoléculas (9). No contexto celular, o desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes caracteriza o estresse oxidativo, situação onde a concentração de EROs encontra-se transiente ou cronicamente acima dos níveis considerados fisiológicos. Contudo, apesar da definição do quadro ser amplamente disseminada, o limiar desse equilíbrio não é claro, visto que não sabemos o suficiente sobre a ação biológica dos chamados “oxidantes” e “antioxidantes” (9), o que impõe obstáculos no desenvolvimento de intervenções eficientes sobre os processos que os envolvem e seus efeitos benéficos e/ou deletérios.

Até recentemente, as EROs, principalmente, os radicais livres, eram vistas apenas como “vilãs” e causa de patologias (9). Com a identificação da enzima superóxido dismutase (SOD) em 1969 (10) ampliaram-se os estudos na área da Biologia Redox na tentativa de compreender as funções biológicas dessas moléculas reativas, até então, vistas apenas como subprodutos de reações com alvos randômicos e efeitos deletérios para o organismo. Hoje, sabe-se que essas espécies são provenientes tanto de fontes exógenas, como drogas, xenobióticos, radiação ultravioleta (UV), como por vias endógenas, dentre elas a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, ou enzimática (ex.: xantina oxidase, NADPH oxidase, entre outras) (Figura 1) (9). Adicionalmente, nos últimos anos, além de estudos avaliando o seu papel no desenvolvimento de doenças, muitos trabalhos tem descrito a importância de algumas espécies na sinalização celular, como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (11,12).

Além das EROs, outros produtos pró-oxidantes são gerados quando a célula encontra-se em estresse oxidativo, como é o caso dos aldeídos malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). O último é reconhecido como o principal subproduto do processo denominado peroxidação lipídica (não enzimática), reação em cadeia na

qual os lipídios poli-insaturados da membrana são oxidados por moléculas radicalares (radicais livres) (Figura 1) (7,13).

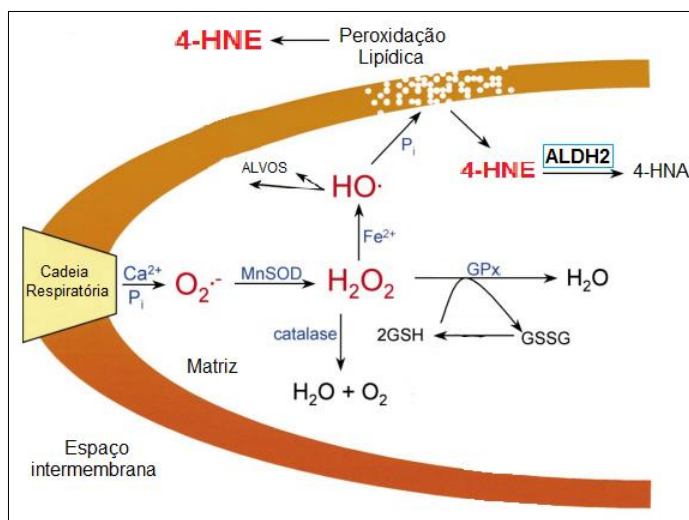


Figura 1. Geração de EROs na célula. Ilustração esquemática das principais espécies reativas de oxigênio (EROs) e suas conexões no interior da mitocôndria. Destaque para o processo de peroxidação lipídica da membrana mitocondrial, com formação do aldeído 4-HNE, e sua oxidação a 4-HNA (ácido 4-hidroxi-nonanóico) pela enzima mitocondrial ALDH2. A cadeia transportadora de elétrons (na membrana mitocondrial interna) apresenta pequenos “vazamentos” de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), sendo removido pela enzima Superóxido Dismutase (Mn-SOD) com

formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é reduzido à água (H_2O) pela catalase e glutaciona peroxidase (GPx), processo onde a glutaciona (GSH) é oxidada pela GPx (14). Imagem adaptada de Kowaltowski, A. et al, 2001 (14).

O 4-HNE é uma molécula altamente reativa devido a três sítios funcionais em sua estrutura química: a dupla ligação de carbono $C_2=C_3$, ao grupo carbonila C_1-O e ao grupo hidroxila no C_4 (Figura 3) (13). O aldeído é capaz de formar ligações com proteína via adição de *Michael* (chamada de aduto de *Michael* no restante do texto), através da ligação de grupos tiol e amino (cisteína, histidina, lisina) à sua dupla ligação de carbono $C_2=C_3$; e formação de base de *Schiff* através da ligação de seu grupo carbonila C_1-O às aminas primárias (ex.: lisinas) (13).

Assim como é visto para as EROs, a formação de adutos de *Michael* entre 4-HNE com DNA, lipídios e proteínas é capaz de inativar, modificar a atividade e função de seus alvos, ou mesmo levá-los a degradação (Figura 2), de modo que o acúmulo de 4-HNE tem sido correlacionado ao desenvolvimento de inúmeras doenças, como o câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (7,15). Contudo, diferentemente da maioria das espécies reativas de oxigênio, o 4-HNE possui um maior tempo de meia vida (16). Além disso, a presença de um sítio hidrofílico ($CHOH-CH=CH-CHO$) e um lipofílico ($CH_3-(CH_2)_4-$) em sua estrutura química, permitem que a molécula transite entre os compartimentos celulares sem impedimento e, atinja localidades distantes de seu sítio de formação (Figura 3) (16).

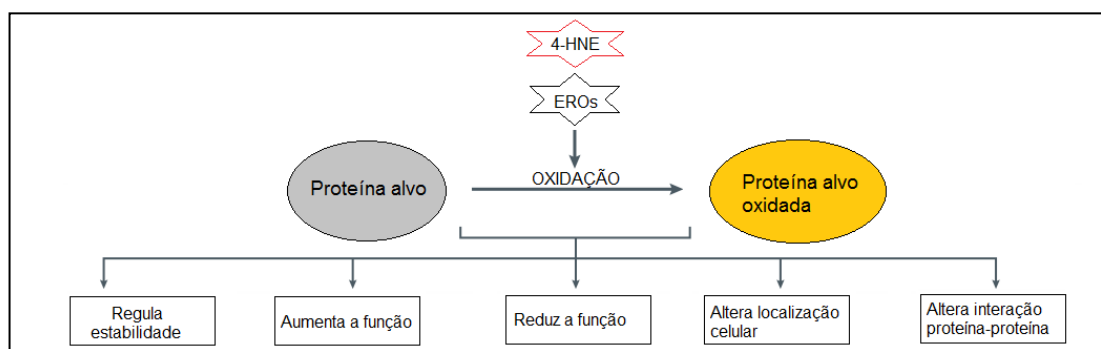


Figura 2. Esquema ilustrativo dos possíveis efeitos da oxidação de proteínas mediada por EROs e, possivelmente, por 4-HNE. Imagem adaptada de Holmström, K. M. & Finkel. T., 2014 (11).

Diversos estudos descrevem um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no coração em insuficiência (5,6), caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Seu excesso está associado à disfunção celular, peroxidação de lipídios e proteínas, dano ao DNA e morte celular. No contexto da IC, tal condição está relacionada ao decaimento da função contrátil cardíaca, sinalização de hipertrofia e remodelamento da matriz extracelular, processos envolvidos no remodelamento patológico do coração e desenvolvimento da insuficiência (6). Do mesmo modo que as EROs, níveis elevados de 4-HNE tem sido relacionados à cardiomiopatias e a própria IC (17).

A enzima mitocondrial aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), conhecida por seu papel no metabolismo do etanol, é responsável por oxidar (remover) o 4-HNE em um ácido menos reativo, o 4-hidroxi-nonanóico (4-HNA) (Figura 3), de modo a apresentar um papel relevante na defesa celular ao estresse de aldeídos (18). Nessa direção, estudos recentes observaram uma correlação inversa entre a atividade de ALDH2 e o dano cardíaco isquêmico, de forma que a enzima demonstrou ter papel cardioprotetor em isquemia (19,20).

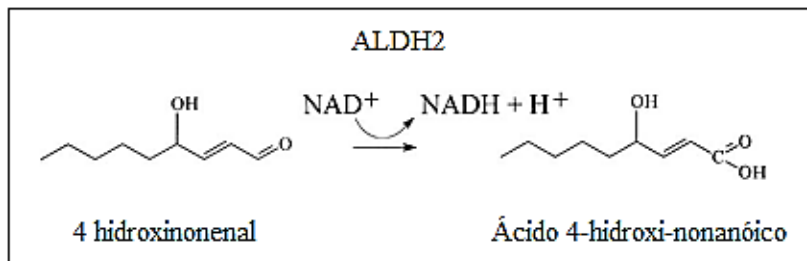


Figura 3. Oxidação da molécula de 4-hidroxinonenal em ácido 4-hidroxi-nonanoico, reação catalisada pela enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2). Imagem adaptada de Schaur, R.J., 2003 (13).

Em 2008, nossos colaboradores da Universidade de Stanford demonstraram que a ativação farmacológica da ALDH2 utilizando Alda-1, um agonista alostérico desenvolvido pelo grupo, protege o coração contra danos isquêmicos (19). A molécula Alda-1 (aldehyde dehydrogenase activator 1) foi identificada pelo grupo liderado por Mochly-Rosen (2008) por meio de um ensaio *high-throughput screen* (ensaio em larga escala), o qual detectou o aumento específico da atividade da enzima mitocondrial ALDH2 em até duas vezes (19). Ao ligar-se na entrada do sítio de ligação ao substrato (aldeído) da enzima, a Alda-1 promove redução do Km de ALDH2 por seu cofator NAD⁺ em 2.4 vezes e aumento de 4.4 vezes em sua eficiência catalítica (21).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que a progressão da disfunção ventricular induzida por infarto do miocárdio é acompanhada pela redução da atividade da ALDH2 cardíaca, acúmulo de 4-HNE cardíaco e circulante, e disfunção mitocondrial (20). Ainda, foi demonstrado que o tratamento contínuo com Alda-1 é capaz de aumentar a atividade da ALDH2, reduzir a quantidade de 4-HNE e melhorar a função mitocondrial cardíaca, além de aumentar a contratilidade cardíaca dos animais tratados (20). Esses resultados sugerem o possível envolvimento de aldeídos, como o 4-HNE, na fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Entretanto, os mecanismos celulares envolvidos na degeneração induzida pelos aldeídos são desconhecidos.

1.2. Dados prévios do Laboratório: onde tudo começou

Nesse cenário, considerando o potencial do 4-HNE de formar adutos de *Michael* com proteínas, e sua elevada concentração no coração após infarto do miocárdio (8) (Figura 4.A), questionamos quais proteínas seriam alvos da modificação pelo aldeído e, qual a contribuição dessa interação no desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

Em estudo anterior do laboratório (dados não publicados), foi conduzida uma análise proteômica do tecido cardíaco de ratos com insuficiência cardíaca, onde foram analisadas as proteínas que apresentaram formação de adutos de 4-HNE em IC e, cujo quadro era minimizado ou prevenido com o uso de Alda-1 (Figura 4.B).

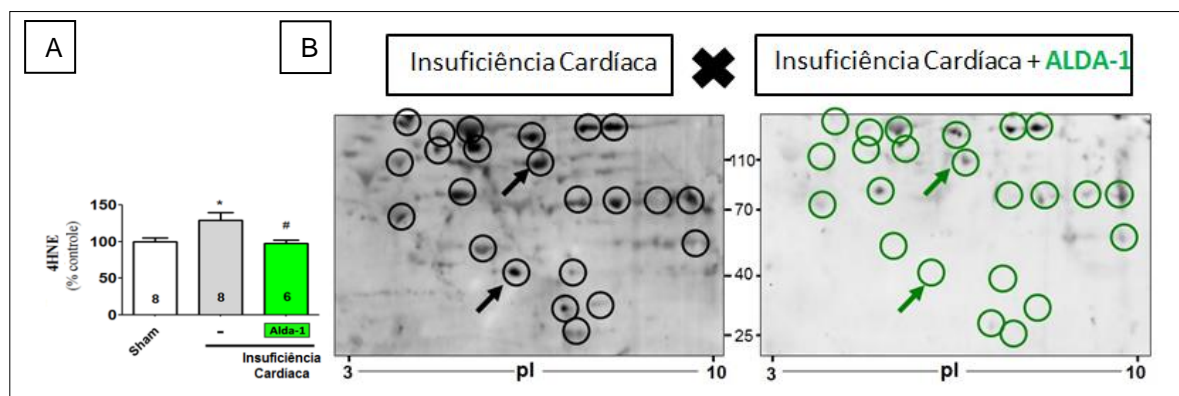


Figura 4. Formação de adutos de 4-HNE-proteínas em animais com insuficiência cardíaca (IC) induzida por infarto do miocárdio; (A) Níveis de adutos de 4-HNE-proteínas em animais com IC tratados e não tratados com Alda-1 e Sham (controle), os dados foram extraídos do trabalho conduzido no laboratório por Kátia Gomes (8); **(B)** Gel 2D das amostras de tecido cardíaco dos animais com IC tratados e não tratados com Alda-1 marcado com anticorpo anti-adutos de 4-HNE; em destaque, círculos e setas apontam de forma ilustrativa para proteínas cuja interação 4-HNE foi identificada em animais com IC, e minimizada ou prevenida em animais tratados com Alda-1 (dados não publicados).

Dentre as proteínas encontradas com estas características, identificamos a endonuclease Dicer, a qual apresentou três sítios de formação de adutos com o aldeído, os resíduos K1324, H1325 e H1339. A Dicer é uma proteína chave no processamento do microRNA (miRNA), molécula importante em todos os processos celulares, visto seu papel na regulação gênica pós-transcricional (Figura 5). Tanto a interação Dicer-4-HNE (regulação pós-traducional) quanto seus efeitos na disponibilidade e função da proteína ainda não foram descritos na literatura.

1.3. Dicer e a biogênese de miRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos, que atuam na regulação gênica pós-transcricional via inibição da tradução e degradação do RNA mensageiro alvo (mRNA), por meio de sua ligação, principalmente, à região 3'UTR do último (22). Um único miRNA pode regular a expressão de diversos genes e, de forma similar, um único gene pode ser

modulado por muitos miRNAs . Estudos apontam que eles participam da regulação de quase todos os processos celulares, sendo estimado que, em mamíferos, os miRNAs regulam aproximadamente 30% dos genes codificantes (23).

Com relação a sua biogênese, o miRNA pode ser transcrito a partir de um gene independente ou originar-se de íntrons de genes codificantes (22). O transcrito primário, denominado pri-miR (miRNA primário), passa por duas etapas de processamento até atingir sua forma madura (Figura 5). A primeira fase é catalisada pelo complexo microprocessador formado pelas proteínas DROSHA-DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) no interior do núcleo (24,25), o qual cliva o pri-miR em uma molécula de aproximadamente 70 nucleotídeos, denominada pre-miR (miRNA precursor). O pre-miR é reconhecido e transportado para o citoplasma através da Exportina 5, um fator de transporte nuclear, onde seu processamento é finalizado (25).

No citoplasma, a Dicer atua em associação com a TRBP (*trans-activation-responsive region RNA-binding protein*) no processamento do pre-MiR em miRNA maduro (duplex) (26). Deste último, uma das fitas (fita guia) é preferencialmente incorporada pela RNase Argonata 2 (AGO2) no complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), onde guia a inibição da tradução e a degradação do mRNA alvo por complementariedade de bases (Figura 5) (22,27).

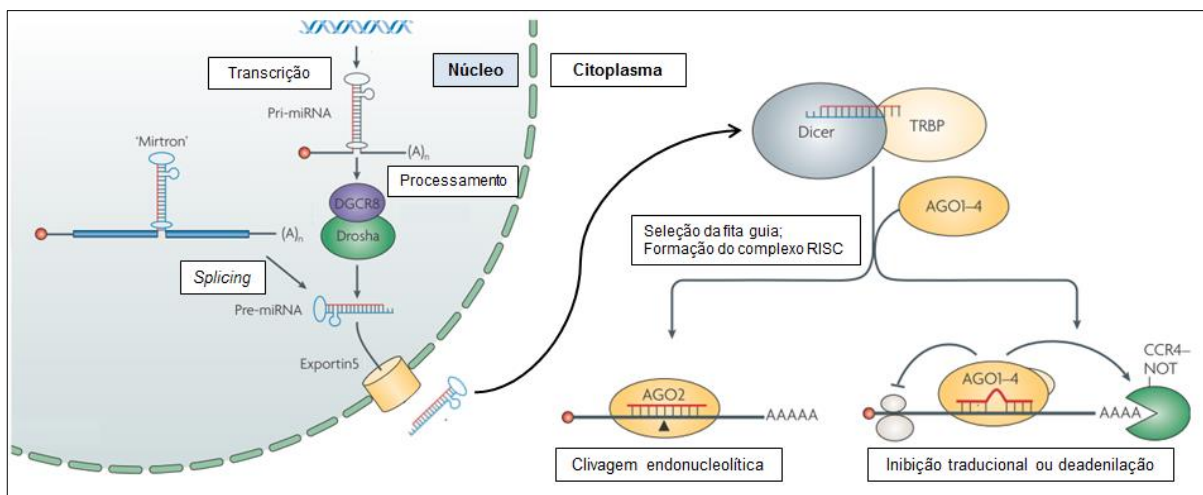


Figura 5. Representação ilustrativa da via canônica de biogênese do miRNA. Imagem adaptada de Filipowicz, W. et al, 2008 (23).

É importante ressaltar que além da via canônica apresentada acima, existem mecanismos alternativos de geração de miRNAs, os quais podem ser independentes

do complexo microprocessador ou de Dicer (28). Tais processos foram extensivamente revisados recentemente (29,30). Em 2016, um estudo reavaliou o papel de Dicer, Drosha e XPO5 na biogênese de miRNAs, através de um modelo celular nocaute para as proteínas de interesse (31). Enquanto que a deleção de Drosha aboliu a produção de miRNAs canônicos, as células nocaute para Dicer apresentaram expressão residual entre 14,4 - 21,4% do total de miRNAs expressos na linhagem controle. Os pesquisadores apontaram a existência de vias não canônicas de processamento do miRNA, independente de Dicer, e propuseram um modelo de clivagem do pre-miR dependente de AGO2, com efeito na seleção da fita guia (preferência da fita 5p) (31). Com relação à Exportina 5 (XPO5), a deleção da proteína afetou modestamente os níveis de miRNAs, de modo que os autores sugeriram a existência de outros mecanismos de transporte do pre-miR, independentes da proteína.

1.3.1. DICER

Em humanos, o gene DICER1 encontra-se localizado no cromossomo 14q32.13. A ribonuclease de 1.922 aminoácidos e peso molecular aproximado de 217kDa, apresenta estrutura única e multidomínios, os quais estão ilustrados na Figura 6.A, juntamente com sua organização espacial (Figura 6.B), proposta por Lau P. W. e colaboradores (2012) (32). Infelizmente, devido ao seu tamanho e complexidade, o cristal completo da proteína de mamíferos ainda não está disponível, sendo resolvido apenas o cristal da proteína do protozoário *Giardia lamblia* (33) (PDB - 2FFL). Nesse organismo e em modelos *in silico* presentes na literatura, é proposto que a Dicer funcione como uma “régua molecular”, através da disposição dos seus domínios, o que garante a clivagem dos seus substratos no mesmo local e com tamanho definido (33).

Nesse sentido, os domínios PAZ (local de ligação do dsRNA, extremidades 3' e 5') e RNaseIII (centro catalítico, onde ocorre a clivagem) são reconhecidos como as extremidades dessa “régua” (32,33) (Figura 6.B), com importante papel no comprimento do RNA resultante. Em *Drosophila*, por exemplo, a inserção de mutações pontuais no domínio PAZ desencadearam alterações no comprimento da fita de RNA resultante e redução em sua atividade de silenciamento (34). Por sua vez,

a clivagem do pre-miR por Dicer requer a ação coordenada de seus dois domínios catalíticos RNaseIII A e B (35). A inativação de qualquer um dos domínios leva a falha no processamento do substrato de RNA e alteração na produção de miRNAs (36). Por exemplo, a mutação e inativação do domínio RNaseIIIB tem sido diretamente associada a diversas formas de câncer em humanos (37).

Em 2018, Liu Z e colaboradores, utilizando a técnica de crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM, do inglês *CRYO-Electron Microscopy*), resolveram a estrutura da proteína Dicer humana em complexo com o seu substrato (pre-let-7) e seu cofator (TRBP) em nível quase atômico (resolução de 4,4 Å) (PDB 5ZAK e 5ZAL) (26) (ver Figura 37.D). A estrutura se mostrou consistente com os modelos anteriores (32,33), porém apresentou um maior detalhamento quanto a disposição dos domínios da proteína. Interessantemente, o modelo prevê um estágio intermediário de ligação entre Dicer e seu substrato, o qual parece ser uma fase prévia à clivagem, onde o pre-miR encontra-se ligado à proteína, mas afastado do centro catalítico. Tal modelo se assemelha ao descrito previamente por Taylor DW e colaboradores em 2013 (resolução > 20 Å) (38). Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram as conformações de Dicer frente ao reconhecimento de diferentes substratos de RNA (pre-miR e pre-siRNA) (38).

Com relação ao seu sítio catalítico, Dicer apresenta quatro regiões centrais (do inglês, *motifs*), as quais estão localizadas em seus dois domínios catalíticos RNaseIII A (E1316, D1320, D1561, E1564) e B (E1705, D1709, D1810 e E1813), sendo amplamente conservadas em todos os grupos de seres vivos (35) (Figura 6.A-B). Notavelmente, a estrutura desse sítio (dímero intramolecular) parece ser mantida por um núcleo hidrofóbico, além de ser envolto por múltiplos domínios, fornecendo potenciais sítios de regulação do mesmo (26). Na Figura 6.C, a região D1320 está destacada, visto que ela se encontra a apenas três aminoácidos de distância do primeiro resíduo identificado pelo nosso grupo como sítio de formação de aduto de *Michael* com 4-HNE (K1324).

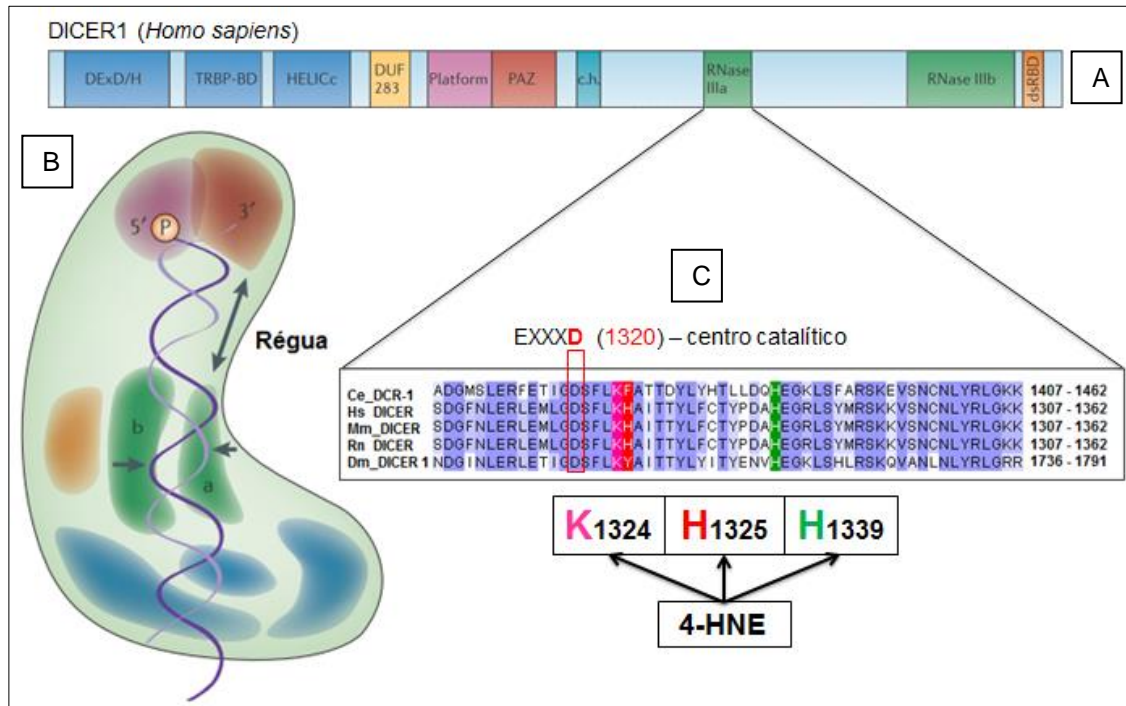


Figura 6. Domínios da DICER1 humana; (A) Representação gráfica da estrutura de DICER1, onde podem ser visualizados os domínios da proteína destacados em colorido; (B) Organização espacial de DICER1, proposta por Lau P. W. e colaboradores (2012) (32), as cores representam os domínios do item (A), Imagens (A) e (B) extraídas de Foulkes, W.D.; Priest, J.R.; Duchaine, T.F., 2014 (37); (C) Alinhamento múltiplo da sequência primária de DICER1 entre as espécies *Caenorhabditis elegans* (1407-1462), *Homo sapiens* (1307-1362), *Mus musculus* (1307-1362), *Rattus norvegicus* (1307-1362) e *Drosophila melanogaster* (1736-1791). Em destaque, o fragmento do domínio RNase IIIa, o qual apresenta os resíduos de interesse (rosa: K1324, vermelho: K1325, verde: K1339), possíveis sítios de formação de adutos de Michael de 4-HNE. Os demais aminoácidos estão coloridos baseados na porcentagem de identidade (Matriz BLOSUM62); Também em destaque um dos quatro centros catalíticos da proteína, o aminoácido D1320 (em mamíferos).

Vale mencionar que realizamos um alinhamento múltiplo da sequência primária de Dicer entre *Caenorhabditis elegans* (nematóide), *Homo sapiens* (homem), *Mus musculus* (camundongo), *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta) e *Rattus norvegicus* (rato), para avaliar a conservação dos sítios de interação com 4-HNE nesses organismos. Como resultado, verificamos que os resíduos K1324 e H1339 são conservados em todas as espécies analisadas, já o H1325 é conservado apenas nos mamíferos (Figura 6.C). A conservação dos resíduos poderia ser um indicativo de relevância evolutiva desse sítio para a proteína. Contudo, a interação desses resíduos com o aldeído nos demais organismos não foi avaliada.

Em vertebrados e nematóides, apenas um gene de Dicer foi identificado até o momento, e a proteína, como visto, tem a sua função relacionada à clivagem tanto de pre-miRs, na via dos miRNAs, como de moléculas de RNA dupla fita (dsRNA), na

síntese de siRNA endógenos (pequeno RNA de interferência, do inglês *small interfering RNA*). Contudo, nos últimos anos, outras funções têm sido propostas à Dicer, como sua participação no reparo de danos ao DNA (39,40) e, aparente migração para o núcleo (41), onde atuaria no processo de silenciamento gênico transcricional. Movimento também descrito no nematóide *C. elegans*, porém, apenas no início da oogênese, processo induzido pela fosforilação da proteína (42).

Em insetos, como em *Drosophila melanogaster*, que apresentam 2 isoformas, ou em plantas, como a *Arabidopsis Thaliana*, a qual apresenta 4 isoformas (*Dicer Like* 1-4, DCL1-4), cada isoforma da proteína demonstra ser especializada na função que executa (ex.: síntese de miRNA ou siRNA), apesar de poder ocorrer sobreposição de funções, principalmente, em plantas (43). Interessantemente, tanto em *Drosophila* (44) como em humanos (45), sua participação na defesa anti-viral já foi proposta. Nesses grupos, a existência de formas especializadas para diferentes funções pode estar associada com mecanismos distintos de regulação. Em mamíferos, os quais apresentam apenas uma isoforma, a proteína deve ser finamente regulada, visto que a mesma proteína atua em diversos processos e deve responder de forma adequada a diferentes estímulos, tanto fisiológicos como de estresse.

1.3.2. DICER e estresse oxidativo

A biogênese dos miRNAs representa um processo finamente regulado, sendo coordenado temporal e espacialmente. Essa regulação ocorre em diferentes níveis (Figura 7), desde a transcrição do pri-miR, seu processamento (DICER e DROSHA) e modificação (via edição, metilação, uridilação e adenilação), carregamento na proteína Argonauta (seleção da fita guia e incorporação ao complexo RISC), e decaimento (30). Modificações na disponibilidade e atividade de proteínas envolvidas em qualquer etapa de sua biogênese poderiam levar a mudanças no perfil final de miRNAs e, conseqüentemente, de proteínas por eles reguladas. Nessa direção, estudos recentes têm apontado que o mau funcionamento da gênese dos miRNAs está associado a diversas doenças, como cardiomiopatias e câncer (46–48).

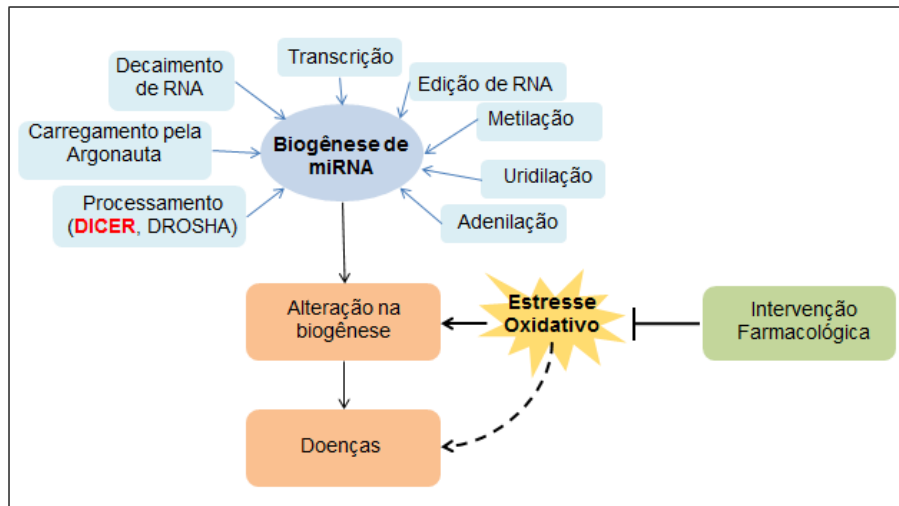


Figura 7. Regulação da biogênese de microRNAs. Ilustração esquemática dos fatores que atuam sobre a biogênese dos microRNAs e, como esse processo está relacionado ao desenvolvimento de doenças. Em amarelo, o possível papel da condição de estresse oxidativo como uma das causas da alteração no processo de biogênese. Destacada em vermelho, a DICER, proteína envolvida no processamento de miRNAs, a qual foi identificada em estudos preliminares do laboratório como um dos alvos do aldeído 4-HNE.

Entre as possíveis alterações na via de processamento do miRNA, a inativação parcial ou deleção de DICER têm sido associadas ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (47,48). Após deleção de DICER no coração de camundongos via sistema Cre-loxP, Chen e colaboradores (2008) observaram dilatação acentuada do ventrículo esquerdo, alteração nos níveis de proteínas contráteis e drástica redução nos níveis de miRNAs maduros, seguido de morte no quarto dia pós-nascimento (47). No mesmo estudo, os pesquisadores observaram redução nos níveis de Dicer no coração de pacientes no estágio final de IC induzida por cardiomiopatia dilatada. Interessantemente, seus níveis foram significativamente elevados no coração dos mesmos pacientes após instalação cirúrgica de aparelho de assistência ao ventrículo esquerdo.

Em 2012, Mori e colaboradores demonstraram que há redução nos níveis de Dicer e, conseqüentemente, na biogênese de miRNAs, em camundongos ao longo do envelhecimento (49). O declínio nos níveis de Dicer foi acompanhado pela diminuição da resistência ao estresse (ex.: de calor, estresse oxidativo), resposta também observada no nematoide *C. elegans*, o qual também apresentou redução no tempo de vida. Adicionalmente, em ensaios celulares no mesmo estudo, os pesquisadores verificaram que os níveis de Dicer estão reduzidos em função de estresse oxidativo

induzido (por Paraquat, peróxido de hidrogênio, UV), ou seja, a proteína, assim como o perfil de miRNAs, demonstra ser sensível a variações no estado redox celular.

Na mesma direção, estudos recentes em oncologia verificaram alteração nos níveis de Dicer e DROSHA em resposta a hipóxia (50,51). Twan van den Beucken et al (2014) encontraram, em condições de hipóxia, uma diminuição significativa na expressão da Dicer atribuída ao silenciamento de seu promotor e redução de sua transcrição (50). Sua menor expressão foi seguida de declínio na biogênese de miRNAs, principalmente da família miR-200.

No mesmo ano, Rajesha Rupaimoole e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes em células provenientes de tumor ovariano (51). Quando as células foram sujeitas a hipóxia prolongada (até 48 horas), houve uma redução significativa nos níveis de mRNA e proteína de Dicer e DROSHA, os quais foram recuperados quando retomadas as condições de normóxia, demonstrando a natureza dinâmica da regulação. Para validar o resultado obtido, os pesquisadores sequenciaram o pri-miRNA, pre-miRNA e miRNA maduro em normóxia e hipóxia, e observaram, como esperado, o acúmulo de pri-miRNA e redução de sua forma madura, sob hipóxia. Em ambos os estudos, o declínio nos níveis de DICER e DROSHA foi relacionado a um pior prognóstico (51).

Ambos, o quadro de estresse oxidativo (7,15,17) e a desregulação na biogênese de miRNAs (46–48), tem sido associados ao desenvolvimento de patologias. Nesse contexto, o estudo dos mecanismos pelos quais esses processos podem estar relacionados entre si é importante para uma melhor compreensão das doenças e maior êxito no desenvolvimento de terapias.

2. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o 4-HNE interage diretamente com a RNase Dicer *in vitro*, e a formação de conjugados Dicer-4-HNE é responsável pela inibição e perda de estabilidade de Dicer de forma tempo- e concentração-dependentes. Visto que a substituição dos resíduos pré-identificados como alvos de 4-HNE não protege Dicer contra os efeitos inibitórios do aldeído, propomos que o acúmulo de modificações por 4-HNE, não a ligação do mesmo a um sítio específico, seja responsável pela sua ação. Contudo, o papel biológico da interação Dicer-4-HNE em modelos mais complexos, como o celular e o animal, ainda não está claro, em função da dificuldade de validar e isolar esse fator (alteração pós-traducional) na análise da resposta observada.

No modelo animal, demonstramos um prejuízo na função de Dicer no coração de animais com disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio, acompanhado de diminuição dos níveis da maioria dos miomiRs analisados. Como ambos os parâmetros foram melhorados no grupo tratado com Alda-1, agonista alostérico da enzima ALDH2, sugerimos a existência de associação entre os níveis de 4-HNE, atividade de Dicer e alteração na expressão de miRNAs no quadro de disfunção cardíaca. Consistente com os dados observados *in vivo*, em modelos celulares, a exposição aguda ao 4-HNE demonstrou reduzir a atividade de Dicer e afetar a via de biossíntese de miRNAs. Porém, como mencionado, não é possível relacionar a resposta observada diretamente com a interação Dicer-4-HNE em ambos os modelos.

Conjuntamente, os nossos dados sugerem que o 4-HNE modula a atividade de Dicer em quadros de estresse agudo e crônico de aldeídos. Onde a concentração de 4-HNE, a duração da exposição e o estado redox celular devem ser determinantes na resposta desencadeada pelo aldeído. Contudo, mais estudos são necessários para melhor compreender seu mecanismo de ação e papel biológico.

REFERÊNCIAS*

1. WHO, World Health Organization. GLOBAL STATUS REPORT on noncommunicable diseases. 2014.
2. DATASUS, Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade [Internet]. 2018 [citado 31 de maio de 2018]. Recuperado de: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
3. Khatibzadeh S, Farzadfar F, Oliver J, Ezzati M, Moran A. Worldwide risk factors for heart failure: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):1186–94.
4. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 11º ed. Elsevier; 2006.
5. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, et al. Direct Evidence for Increased Hydroxyl Radicals Originating From Superoxide in the Failing Myocardium. *Circ Res.* 4 de fevereiro de 2000;86(2):152–7.
6. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* dezembro de 2011;301(6):H2181-90.
7. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* Elsevier B.V.; 2015;1852(5):826–38.
8. Gomes KMS, Campos JC, Bechara LRG, Queliconi B, Lima VM, Disatnik M-H, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. *Cardiovasc Res.* 1 de setembro de 2014;103(4):498–508.
9. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008;4(5):278–86.
10. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 25 de novembro de 1969;244(22):6049–55.
11. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junho de 2014;15(6):411–21.
12. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* abril de 2015;33:8–13.
13. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4–5):149–59.
14. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 20 de abril de 2001;495(1–2):12–5.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [Cited 2016 May 30]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

15. Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev.* janeiro de 2014;94(1):1–34.
16. Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta.* 7 de novembro de 1980;620(2):281–96.
17. Mak S, Lehotay DC, Yazdanpanah M, Azevedo ER, Liu PP, Newton GE. Unsaturated aldehydes including 4-OH-nonenal are elevated in patients with congestive heart failure. *J Card Fail.* junho de 2000;6(2):108–14.
18. Ebert AD, Kodo K, Liang P, Wu H, Huber BC, Riegler J, et al. Characterization of the molecular mechanisms underlying increased ischemic damage in the aldehyde dehydrogenase 2 genetic polymorphism using a human induced pluripotent stem cell model system. *Sci Transl Med.* 24 de setembro de 2014;6(255):255ra130.
19. Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 2008;321(5895):1493–5.
20. Gomes KMS, Bechara LRG, Lima VM, Ribeiro MAC, Campos JC, Dourado PM, et al. Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: benefits of Alda-1. *Int J Cardiol.* 20 de janeiro de 2015;179:129–38.
21. Belmont-Díaz JA, Yoval-Sánchez B, Calleja-Castañeda LF, Pardo Vázquez JP, Rodríguez-Zavala JS. Alda-1 modulates the kinetic properties of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). *FEBS J.* 2016;283(19):3637–50.
22. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* setembro de 2010;11(9):597–610.
23. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008;2008(2):102–14.
24. Kwon SC, Nguyen TA, Choi Y-G, Jo MH, Hohng S, Kim VN, et al. Structure of Human DRISHA. *Cell.* 14 de janeiro de 2016;164(1–2):81–90.
25. Nguyen TA, Jo MH, Choi Y-G, Park J, Kwon SC, Hohng S, et al. Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell.* 4 de junho de 2015;161(6):1374–87.
26. Liu Z, Wang J, Cheng H, Ke X, Sun L, Zhang QC, et al. Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell.* Elsevier Inc.; 2018;0(0):1191–1196.e12.
27. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet.* julho de 2013;14(7):447–59.
28. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ. A dicer-independent

- miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 3 de junho de 2010;465(7298):584–9.
29. Yang J-S, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*. 16 de setembro de 2011;43(6):892–903.
 30. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. agosto de 2014;15(8):509–24.
 31. Kim Y-K, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de março de 2016;113(13):E1881-9.
 32. Lau P-W, Guiley KZ, De N, Potter CS, Carragher B, MacRae IJ. The molecular architecture of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(4):436–40.
 33. MacRae IJ. Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* (80-). 2006;311(5758):195–8.
 34. Kandasamy SK, Fukunaga R. Phosphate-binding pocket in Dicer-2 PAZ domain for high-fidelity siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(49):14031–6.
 35. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 9 de julho de 2004;118(1):57–68.
 36. Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A, Sharp PA. In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA*. 2012;18(6):1116–22.
 37. Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nat Rev Cancer*. outubro de 2014;14(10):662–72.
 38. Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, et al. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. junho de 2013;20(6):662–70.
 39. Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*. 9 de agosto de 2012;488(7410):231–5.
 40. Swahari V, Nakamura A, Baran-Gale J, Garcia I, Crowther AJ, Sons R, et al. Essential Function of Dicer in Resolving DNA Damage in the Rapidly Dividing Cells of the Developing and Malignant Cerebellum. *Cell Rep*. 12 de janeiro de 2016;14(2):216–24.
 41. White E, Schlackow M, Kamieniarz-Gdula K, Proudfoot NJ, Gullerova M. Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol*. junho de 2014;21(6):552–9.
 42. Drake M, Furuta T, Suen KM, Gonzalez G, Liu B, Kalia A, et al. A Requirement for ERK-Dependent Dicer Phosphorylation in Coordinating Oocyte-to-Embryo

- Transition in *C.elegans*. *Dev Cell*. Elsevier Inc.; 2014;31(5):614–28.
43. Mukherjee K, Campos H, Kolaczowski B. Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants. *Mol Biol Evol*. março de 2013;30(3):627–41.
 44. Deddouche S, Matt N, Budd A, Mueller S, Kemp C, Galiana-Arnoux D, et al. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *drosophila*. *Nat Immunol*. dezembro de 2008;9(12):1425–32.
 45. Machitani M, Sakurai F, Wakabayashi K, Tomita K, Tachibana M, Mizuguchi H. Dicer functions as an antiviral system against human adenoviruses via cleavage of adenovirus-encoded noncoding RNA. *Sci Rep*. 2016;6:27598.
 46. Adams BD, Kasinski AL, Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Curr Biol*. Elsevier Ltd; 2014;24(16):R762–76.
 47. Chen J-F, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(6):2111–6.
 48. Da Costa Martins PA, Bourajjaj M, Gladka M, Kortland M, Van Oort RJ, Pinto YM, et al. Conditional Dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. *Circulation*. 2008;118(15):1567–76.
 49. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, MacOtelá Y, et al. Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab*. Elsevier Inc.; 2012;16(3):336–47.
 50. van den Beucken T, Koch E, Chu K, Rupaimoole R, Prickaerts P, Adriaens M, et al. Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. *Nat Commun*. 29 de outubro de 2014;5:5203.
 51. Rupaimoole R, Wu SY, Pradeep S, Ivan C, Pecot C V, Gharpure KM, et al. Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour progression. *Nat Commun*. 29 de outubro de 2014;5:5202.
 52. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. dezembro de 1978;58(6):1072–83.
 53. Shan G, Li Y, Zhang J, Li W, Szulwach KE, Duan R, et al. A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol*. agosto de 2008;26(8):933–40.
 54. Li Y, Lin L, Li Z, Ye X, Xiong K, Aryal B, et al. Iron homeostasis regulates the activity of the microRNA pathway through poly(C)-binding protein 2. *Cell Metab*. Elsevier Inc.; 2012;15(6):895–904.
 55. Zhang H, Forman HJ. Signaling by 4-hydroxy-2-nonenal: Exposure protocols, target selectivity and degradation. *Arch Biochem Biophys*. Elsevier Inc; 2017;617:145–54.

56. Barrera G, Biasi F, Fazio VM, Paradisi L, Dianzani MU. Repeated Treatments With a Low HNE Concentration Affect K562 Cell Proliferation. In: *Chemical Carcinogenesis 2*. Boston, MA: Springer; 1991. p. 337–42.
57. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
58. Davies BP, Arenz C. A fluorescence probe for assaying micro RNA maturation. *Bioorganic Med Chem*. 2008;16(1):49–55.
59. Emde A, Eitan C, Liou L-L, Libby RT, Rivkin N, Magen I, et al. Dysregulated miRNA biogenesis downstream of cellular stress and ALS-causing mutations: a new mechanism for ALS. *EMBO J*. 2015;34(21):2633–51.
60. Rose SD, Kim DH, Amarzguioui M, Heide J, Collingwood MA, Davis ME, et al. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(13):4140–56.
61. MacRae IJ, Zhou K, Doudna JA. Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(10):934–40.
62. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 1 de maio de 2009;25(9):1189–91.
63. MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson C V., Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(2):512–7.
64. Takeshita D, Zenno S, Lee WC, Nagata K, Saigo K, Tanokura M. Homodimeric Structure and Double-stranded RNA Cleavage Activity of the C-terminal RNase III Domain of Human Dicer. *J Mol Biol*. 2007;374(1):106–20.
65. Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovskiy A, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet*. 2006;38(3):356–62.
66. Schirle NT, MacRae IJ. The crystal structure of human Argonaute2. *Science*. 2012;336(6084):1037–40.
67. Cohn JA, Tsai L, Friguet B, Szweda LI. Chemical characterization of a protein-4-hydroxy-2-nonenal cross-link: Immunochemical detection in mitochondria exposed to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(1):158–64.
68. Siegel SJ, Bieschke J, Powers ET, Kelly JW. The oxidative stress metabolite 4-hydroxynonenal promotes Alzheimer protofibril formation. *Biochemistry*. 2007;46(6):1503–10.
69. Guo J-M, Liu A-J, Zang P, Dong W-Z, Ying L, Wang W, et al. ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE. *Cell Res*. julho de 2013;23(7):915–30.
70. Palaniyandi SS, Qi X, Yogalingam G, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. Regulation of mitochondrial processes: A target for heart failure. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2010;7(2):1–14.

71. Brown DA, Perry JB, Allen ME, Sabbah HN, Stauffer BL, Shaikh SR, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(4):238–50.
72. Liu X, Meng H, Jiang C, Yang S, Cui F, Yang P. Differential microRNA Expression and Regulation in the Rat Model of Post-Infarction Heart Failure. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160920.
73. Akat KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Correa Da Rosa J, et al. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de julho de 2014;111(30):11151–6.
74. Kakimoto Y, Tanaka M, Kamiguchi H, Hayashi H, Ochiai E, Osawa M. MicroRNA deep sequencing reveals chamber-specific miR-208 family expression patterns in the human heart. *Int J Cardiol*. 15 de maio de 2016;211:43–8.
75. van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*. novembro de 2009;17(5):662–73.
76. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang R-H, Tatsuguchi M, Huang Z-P, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. setembro de 2009;119(9):2772–86.
77. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 27 de abril de 2007;316(5824):575–9.
78. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res*. julho de 2011;39(13):5692–703.
79. Kai ZS, Pasquinelli AE. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. janeiro de 2010;17(1):5–10.
80. Pitchiaya S, Heinicke LA, Park JI, Cameron EL, Walter NG. Resolving Subcellular miRNA Trafficking and Turnover at Single-Molecule Resolution. *Cell Rep*. 2017;19(3):630–42.
81. De N, Young L, Lau P-W, Meisner N-C, Morrissey D V, MacRae IJ. Highly complementary target RNAs promote release of guide RNAs from human Argonaute2. *Mol Cell*. 9 de maio de 2013;50(3):344–55.
82. Hansen TB, Venø MT, Jensen TI, Schaefer A, Damgaard CK, Kjems J. Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun*. 13 de maio de 2016;7:11538.
83. Spengler RM, Zhang X, Cheng C, McLendon JM, Skeie JM, Johnson FL, et al. Elucidation of transcriptome-wide microRNA binding sites in human cardiac tissues by Ago2 HITS-CLIP. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(15):7120–31.
84. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 13 de março de

- 2012;13(4):271–82.
85. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 13 de abril de 2012;336(6078):233–7.
 86. Panda AC, Martindale JL, Gorospe M. Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles. *Bio-protocol*. 5 de fevereiro de 2017;7(3).
 87. Hu W, Collier J. What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell Res*. setembro de 2012;22(9):1322–4.
 88. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 11 de setembro de 2009;105(6):585–94.
 89. Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, Seki N. microRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*. janeiro de 2012;3(1):9–21.
 90. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. março de 2007;39(3):380–5.
 91. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 4 de agosto de 2005;436(7051):740–4.
 92. Fareh M, Yeom K-H, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun*. 9 de dezembro de 2016;7:13694.
 93. Masliah G, Maris C, König SL, Yulikov M, Aeschmann F, Malinowska AL, et al. Structural basis of siRNA recognition by TRBP double-stranded RNA binding domains. *EMBO J*. 15 de março de 2018;37(6).
 94. Ding J, Chen J, Wang Y, Kataoka M, Ma L, Zhou P, et al. Trbp regulates heart function through microRNA-mediated Sox6 repression. *Nat Genet*. julho de 2015;47(7):776–83.
 95. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian MicroRNA biogenesis. *Mol Cell*. Elsevier Inc.; 2015;57(3):397–408.
 96. Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell*. 2 de outubro de 2009;139(1):112–22.
 97. Herbert KM, Pimienta G, DeGregorio SJ, Alexandrov A, Steitz JA. Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a progrowth miRNA profile. *Cell Rep*. 27 de novembro de 2013;5(4):1070–81.
 98. Golden RJ, Chen B, Li T, Braun J, Manjunath H, Chen X, et al. An Argonaute

- phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature*. 2017;542(7640):197–202.
99. Quévillon Huberdeau M, Zeitler DM, Hauptmann J, Bruckmann A, Fressigné L, Danner J, et al. Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing in vivo. *EMBO J*. 2017;36(14):2088–106.
 100. Chaudhary P, Sharma R, Sharma A, Vatsyayan R, Yadav S, Singhal SS, et al. Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling. *Biochemistry*. 27 de julho de 2010;49(29):6263–75.
 101. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ*. 2013;20(12):1615–30.
 102. Ji Y, Dai Z, Wu G, Wu Z. 4-Hydroxy-2-nonenal induces apoptosis by activating ERK1/2 signaling and depleting intracellular glutathione in intestinal epithelial cells. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6(August):1–13.
 103. Ghodgaonkar MM, Shah RG, Kandan-Kulangara F, Affar EB, Qi HH, Wiemer E, et al. Abrogation of DNA vector-based RNAi during apoptosis in mammalian cells due to caspase-mediated cleavage and inactivation of Dicer-1. *Cell Death Differ*. 2009;16(6):858–68.
 104. Nakagawa A, Shi Y, Kage-Nakadai E, Mitani S, Xue D. Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease. *Science*. 16 de abril de 2010;328(5976):327–34.
 105. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JCB, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(16):2029–74.
 106. Gross TJ, Powers LS, Boudreau RL, Brink B, Reisetter A, Goel K, et al. A MicroRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to sumoylation of the endonuclease DICER. *J Biol Chem*. 2014;289(18):12823–34.
 107. Lai H-H, Li J-N, Wang M-Y, Huang H-Y, Croce CM, Sun H-L, et al. HIF-1 α promotes autophagic proteolysis of Dicer and enhances tumor metastasis. *J Clin Invest*. 1 de fevereiro de 2018;128(2):625–43.
 108. Ibrahim AA, Schmithals C, Kowarz E, Köberle V, Kakoschky B, Pleli T, et al. Hypoxia Causes Downregulation of Dicer in Hepatocellular Carcinoma, Which Is Required for Upregulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res*. 15 de julho de 2017;23(14):3896–905.
 109. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol*. março de 2009;46(6):1222–8.
 110. Pizzimenti S, Ferracin M, Sabbioni S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, et al. MicroRNA expression changes during human leukemic HL-60 cell differentiation induced by 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. *Free*

Radic Biol Med. 15 de janeiro de 2009;46(2):282–8.

111. Umberto Dianzani M. 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med.* 2003;24(4–5):263–72.
112. López-Bernardo E, Anedda A, Sánchez-Pérez P, Acosta-Iborra B, Cadenas S. 4-Hydroxynonenal induces Nrf2-mediated UCP3 upregulation in mouse cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med. Elsevier;* 2015;88(Part B):427–38.
113. Zhang Y, Sano M, Shinmura K, Tamaki K, Katsumata Y, Matsushashi T, et al. 4-hydroxy-2-nonenal protects against cardiac ischemia-reperfusion injury via the Nrf2-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol.* outubro de 2010;49(4):576–86.
114. Smathers RL, Fritz KS, Galligan JJ, Shearn CT, Reigan P, Marks MJ, et al. Characterization of 4-HNE modified L-FABP reveals alterations in structural and functional dynamics. *PLoS One.* 2012;7(6):1–16.
115. Farout L, Mary J, Vinh J, Szweda LI, Friguet B. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Arch Biochem Biophys.* 2006;453(1):133–40.
116. Doorn JA, Hurley TD, Petersen DR. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4-hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(1):102–10.
117. Campos JC, Queliconi BB, Dourado PMM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LRG, et al. Exercise Training Restores Cardiac Protein Quality Control in Heart Failure. *PLoS One.* 2012;7(12):1–12.
118. Feng Z, Hu W, Tang M-S. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8598–602.
119. Friguet B, Stadtman ER, Szweda LI. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal: Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *J Biol Chem.* 1994;269(34):21639–43.
120. Yuan Q, Zhu X, Sayre LM. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: Metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol.* 2007;20(1):129–39.
121. Kaufman DM, Wu X, Scott BA, Itani OA, Van Gilst MR, Bruce JE, et al. Ageing and hypoxia cause protein aggregation in mitochondria. *Cell Death Differ. Nature Publishing Group;* 2017;24(10):1730–8.
122. Grune T, Davies KJA. The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med.* 24(4–5):195–204.
123. Rudolph TK, Freeman BA. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal.* 29 de setembro de 2009;2(90):re7.
124. Musatov A, Carroll CA, Liu Y-C, Henderson GI, Weintraub ST, Robinson NC. Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry.* 25 de junho de

2002;41(25):8212–20.

125. Ishii T, Tatsuda E, Kumazawa S, Nakayama T, Uchida K. Molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: Identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 2003;42(12):3474–80.
126. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J*. dezembro de 2004;18(15):1791–800.
127. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81–128.
128. Oberti D, Biasini A, Kirschmann MA, Genoud C, Stunnenberg R, Shimada Y, et al. Dicer and Hsp104 Function in a Negative Feedback Loop to Confer Robustness to Environmental Stress. *Cell Rep*. 2015;10(1):47–61.
129. Ge X, Zhao X, Nakagawa A, Gong X, Skeen-Gaar RR, Shi Y, et al. A novel mechanism underlies caspase-dependent conversion of the dicer ribonuclease into a deoxyribonuclease during apoptosis. *Cell Res*. fevereiro de 2014;24(2):218–32.
130. Seta A, Tabara M, Nishibori Y, Hiraguri A, Ohkama-Ohtsu N, Yokoyama T, et al. Post-translational regulation of the dicing activities of arabidopsis DICER-LIKE 3 and 4 by inorganic phosphate and the redox state. *Plant Cell Physiol*. 2017;58(3):485–95.