LORENA TEIXEIRA FRASSON

Expressão de Let-7, Lin-28 e HMGA2 nas células progenitoras retinianas do Epitélio Ciliar de mamíferos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

LORENA TEIXEIRA FRASSON

Expressão de Let-7, Lin-28 e HMGA2 nas células progenitoras retinianas do epitélio ciliar de mamíferos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profª. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio

Versão Original

São Paulo
2019

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)

Teixeira Frasson, Lorena
Expressão de Let-7, Lin-28 e HMGA2 nas células progenitoras retinianas do epitélio ciliar de mamíferos / Lorena Teixeira Frasson; orientadora Carolina Beltrame Del Debbio. -- São Paulo, 2019.
84 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células-tronco retinianas. 2. Let-7. 3. Lin-28. 4. HMGA. 5. Epitélio Ciliar. I. Beltrame Del Debbio, Carolina , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lorena Teixeira Frasson

Título da Dissertação: Expressão de Let-7, Lin-28 e HMGA2 nas células progenitoras retinianas do epitélio ciliar de mamíferos

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "***Degeneração e regeneração da retina e vítreo***", registrada sob **nº 75**, nas fls. 34, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 25/08/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) ***Dânia Emi Hamassaki*** (Investigador Principal) e os membros da equipe: *Davi Chen Wu, Gabriela de Jesus Lustoza Costa, Ana Carolina Gualassi, Juliana Mendes Piovesan, Raquel Cecília Teles Rodrigues, Carolina Beltrame Del Debbio, Priscilla Sayami Akamine*. Esta licença de uso de animais expira em 25/08/2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP *até o último dia de validade da atual proposta*. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "***Degeneration and regeneration of retina and vitreous***", registered **as Number 75**, in pages 34, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 8/25/2015.

Under this license, ***Dânia Emi Hamassaki*** (Principal Investigator) and team members *Davi Chen Wu, Gabriela de Jesus Lustoza Costa, Ana Carolina Gualassi, Juliana Mendes Piovesan, Raquel Cecília Teles Rodrigues, Carolina Beltrame Del Debbio, Priscilla Sayami Akamine* are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 8/25/2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Aos meus pais.

Por serem exatamente o que são. Por me criarem exatamente como me criaram.

Por me darem toda a estrutura, tanta estrutura.

Por fazerem com que eu possa sentir de tudo, tentar caminhos, voar para longe, sabendo que tenho, sempre tive e sempre terei suporte.

Por me darem a chance rara, o quase luxo, de apenas viver.

Porque todo o resto fizeram por mim.

À minha irmã.

Por estar sempre presente independente da distância.

Por ser acalento nos momentos difíceis e parceria nos infinitos bons momentos.

Por me ajudar sempre, e com tudo.

Ao meu amor.

Por estar do meu lado em todas as etapas deste trabalho.

Por não me deixar desanimar e me dar toda força necessária para continuar perseverando,

Por ser calma, aconchego e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Prof.ª Carolina Beltrame Del Debbio. Obrigada por todo o período de aprendizado e cumplicidade. Por suas palavras sempre positivas, sempre vendo o melhor lado, mesmo quando tudo parecia dar errado. Obrigada por ir além do papel de orientadora e se preocupar com o lado pessoal também. O meu aprendizado foi muito mais enriquecedor devido à sua ajuda e dom de ensinar.

Aos colegas de laboratório (Aline, Barbara, Ana), à Prof.ª Dânia e seus alunos (Rafael, Gabriela, Vinícius), obrigada pela parceria, pela troca e por toda ajuda que me deram durante todas as fases do projeto, cada um à sua maneira, de conversas à ajuda com os experimentos.

À Sayami, que não esteve presente na finalização, mas foi imprescindível para o início. Obrigada pela acolhida, por me ensinar tanto, por toda a dedicação e ajuda. Meu coração é grato por ter te conhecido.

Aos professores do departamento. Que durante suas aulas, seminários, rodas de conversa e confraternizações passaram pelo meu caminho e foram deixando marcas duradouras, conhecimentos e muita experiência.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão do auxílio Jovem Pesquisador (processo # 2015/24001-1) e bolsa de estudo (processo #2017/07699-0).

RESUMO

FRASSON, L.T. **Expressão de Let-7, Lin-28 e HMGA2 nas células progenitoras retinianas do epitélio ciliar de mamíferos**. 2019. 84 Páginas. Dissertação de Mestrado em Biologia de Sistemas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A retina é um tecido nervoso que pode ser exposto a fatores degenerativos ambientais e genéticos, resultando em perda visual ou cegueira completa. Embora não seja capaz de se regenerar, algumas células epiteliais localizadas na periferia retiniana, na região do Epitélio Ciliar, foram identificadas como células-tronco/progenitoras com capacidade de gerar novos neurônios retinianos. Apesar de possuir capacidade de regeneração do tecido retiniano, esta capacidade não se desenvolve de forma eficiente, indicando a presença de mecanismos inibitórios atuando sobre o potencial regenerativo das células do Epitélio Ciliar (EC). Dentre os mecanismos inibitórios conhecidos atualmente, se encontram os microRNAs.

Neste trabalho, demonstramos que os microRNAs da família Let-7 são altamente expressos nas células do EC de mamíferos adultos, principalmente nas células do Epitélio Não-Pigmentado, que não apresentam a capacidade de reprogramação em células-tronco. Estes miRNAs são pouco expressos em animais neonatos e se acumulam nestas células durante o amadurecimento/desenvolvimento do tecido. As proteínas Lin28 e HMGA2, que se apresentam como importantes reguladores de Let-7 e uns dos alvos mais bem descritos na literatura, respectivamente, apresentaram padrão inverso de expressão ao do Let-7, sendo altamente expressas nos animais neonatos, com expressão reduzida ao longo do amadurecimento do tecido. As células do Epitélio Ciliar reprogramadas em células-tronco (neuroesferas) apresentaram a expressão de Let-7 semelhante às de neonatos, com maior expressão de Lin28a e HMGA2. Por fim, a manipulação experimental de Let-7, através de agentes mimetizadores e inibidores desse miRNA, induziu um importante aumento de HMGA2 e uma discreta regulação de Lin-28, sugerindo que o eixo regulatório Lin-28-Let-7-HMGA possa controlar algumas funções nas células do Epitélio Ciliar.

Palavras-chave: Células-tronco retinianas. Let-7. Lin-28. HMGA. Epitélio Ciliar.

ABSTRACT

FRASSON, L.T. **Let-7, Lin28 and HMGA2 expression in mammalian retinal progenitor cells.** 2019. 84 Pages. Master Thesis (Systems Biology Program) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

The retina is a nerve tissue that can be exposed to environmental and genetic degenerative factors, resulting in visual loss or complete blindness. Although unable to regenerate, some epithelial cells located on the retinal periphery, in the region of the Ciliary Epithelium have been identified as stem / progenitor cells capable of generating new retinal neurons. Despite its ability to regenerate retinal tissue, this capacity does not develop efficiently, indicating the presence of inhibitory mechanisms acting on the regenerative potential of Ciliary Epithelium (CE) cells. Among the currently known inhibitory mechanisms are microRNAs.

In this work, we demonstrate that Let-7 family of microRNAs are highly expressed in adult mammalian CE cells, mainly in non-pigmented epithelium cells, which do not have the reprogramming capacity into stem cells. These miRNAs are poorly expressed in newborn animals and accumulate in these cells during tissue maturation / development. The proteins Lin28 and HMGA2, which are important regulators of Let-7 and one of the best described targets in the literature, respectively, showed an inverse expression pattern to Let-7, being highly expressed in newborn animals, with reduced expression with the maturation of the tissue. Ciliary epithelium cells reprogrammed into stem cells (neurospheres) showed similar Let-7 expression to newborns, with higher expression of Lin28a and Hmga2. Finally, the experimental manipulation of Let-7 by mimetic and inhibitors specific agents of this miRNA induced a significant increase of HMGA2 and a slight regulation of Lin-28, suggesting that the regulatory axis Lin-28-Let-7-HMGA may control some of the functions in the cells of the Ciliary Epithelium stem cells.

Keywords: Retinal stem cells. Let-7. Lin-28. HMGA. Ciliary epithelium.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	*Analysis of Variance* (Análise de Variância)
Ascl1a	*Achaete-scute homolog 1a*
Brdu	*5-Bromo-2'-deoxyuridine*
CC	Corpo Ciliar
CCHC	*CysCysHisCys*
cDNA	*complementary DNA* (DNA complementar)
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEFAP-USP	Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo
CHX10	*Ceh-10 Homeo Domain Containing Homolog*
C-Myc	*Cellular Myelocytomatosis*
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRX	*Cone-rod homeobox*
CSD	*Cold Shock Domain*
Ct	*Cycle threshold*
DAPI	*4', 6-Diamidino-2-Phenylindole*
DGCR8	*Digeorge Syndrome Critical Region Gene 8*
Dicer	endoribonuclease Dicer
DMEM/F-12	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
EC	Epitélio Ciliar
ECL	*Enhanced Chemiluminescence* (Reação de Quimioluminescência Potencializada)
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
EGF	*Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidermal)
EGR1	*Early Growth Response 1*
ENP	Epitélio Não Pigmentado
EP	Epitélio Pigmentado
EPR	Epitélio Pigmentado Retiniano
FGF	*Fibroblast Growth Factor* (Fator de Crescimento Fibroblástico)
GADPH	*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GFP	*Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)
GLAST	*Glutamate Aspartate Transporter*

Gta Rb	*Goat anti-Rabbit*
HBSS	*Hank's Balanced Salt Solution*
HMGA	*High Mobility Group Protein*
HSPD1	*Heat Shock 60kDa Protein 1*
IPSCs	*Induced pluripotent stem cells* (Células-tronco pluripotente induzida)
Ki67	Kiel clone 67
Let-7	*Lethal-7*
Lhx2	*LIM homeobox 2*
Lin28a	*Lineage variant 28 homolog A*
Lin28b	*Lineage variant 28 homolog B*
Lin41	*Lineage variant 41*
mGluR6	*metabotropic Glutamate Receptor 6* (Receptor metabotrópico de Glutamato 6)
miRNA	micro RNA
MPS1	*Mucopolysaccharidosis type I*
mRNA	*messenger RNA* (RNA mensageiro)
MTT	*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*
NGF1a	*Nerve growth factor 1a*
Oct4	*Octamer-binding transcription factor 4*
Opti-MEM	*Reduced-Serum Minimal Essential Medium*
Otx2	*Orthodenticle Homeobox 2*
Pax6	*Paired box protein 6*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
POUSF1	*POU Class 5 Homeobox 1*
Pre E	*Precursor Element* (Elemento Precursor)
qPCR	*quantitative PCR* (PCR quantitativo)
RAN-GTP	*Ras-related Nucleotide Guanosine Triphosphate* (Proteína Ran ligada ao nucleotídeo trifosfato de adenosina)
RD	Retinopatia Diabética
RIPA	*Radioimmunoprecipitation Assay* (Ensaio de Radioimunoprecipitação)
RISC	*RNA-induced Silencing Complex* (Complexo de Silenciamento induzido do RNA)
RNase	Ribonuclease
Rx	*Retinal homeobox*

SNC	Sistema Nervoso Central
snoRNA	*Small nucleolar RNAs*
Sox2	*(Sex determining region Y)-box 2*
TBS-T	*Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20*
TCF3	*Transcription Factor 3*
TRBP	*HIV-1 TAR RNA binding protein* (Proteína ligante de RNA HIV-1 TAR)
TUTase	*Trypanosome Mitochondrial 3' Terminal Uridylyl Transferase*
U.A	Unidade Arbitrária
UTR	*Untranslated Region*
WB	*Western Blot*
ZMC	Zona Marginal Ciliar
Zif268	*Zinc Finger 268*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático de um corte transversal do olho humano com destaque para um aumento na área da retina 18
Figura 2 - Participação da Zona Marginal Ciliar (ZMC) na formação retiniana de vertebrados 20
Figura 3 - Desenho esquemático do Epitélio Ciliar (EC) 22
Figura 4 - Esquema ilustrativo do mecanismo de biogênese do miRNA 25
Figura 5 - Desenho esquemático do eixo formado por Lin-28, Let-7 e HMGA2 31
Figura 6 - Análise da qualidade dos pequenos RNAs extraídos para realização de técnica de array ... 34
Figura 7 - Análise por PCR *Array* da expressão de miRNAs maduros pelas células do Epitélio Pigmentado e Epitélio Não-Pigmentado 39
Figura 8 - Análise por PCR Array da expressão de miRNAs maduros nas células do Epitélio Ciliar, com foco nos miRNAs da família Let-7 40
Figura 9 - Análise por PCR em tempo real (quantitativo) da expressão dos miRNAs da família Let-7 no Epitélio Ciliar de animais Adultos 41
Figura 10 - Análise por PCR em tempo real (quantitativo) da expressão dos miRNAs da família Let-7 no Epitélio Ciliar de animais Neonatos e Adultos 42
Figura 11 - Expressão transcricional de Lin-28a e Lin-28b nas células do EC de animais neonatos e adultos 44
Figura 12 - Expressão proteica de Lin-28 nas células do EC 44
Figura 13 - Expressão de Lin-28 no olho de embrião de 15 dias 46
Figura 14 - Expressão de Lin-28 no olho de animais neonatos 47
Figura 15 - Expressão de Lin-28 no olho de animais adultos 48
Figura 16 - Expressão transcricional de HMGA2 nas células do EC de animais neonatos e adultos ... 50
Figura 17 - Expressão proteica de HMGA nas células do EC 50
Figura 18 - Expressão de HMGA2 no olho de embrião de 15 dias 52
Figura 19 - Expressão de HMGA2 no olho de animais neonatos 53
Figura 20 - Expressão de HMGA no olho de animais adultos 54
Figura 21 - Neuroesferas derivadas de células de Epitélio Pigmentado 55
Figura 22 - Expressão dos miRNAs de Let-7b, Let-7c e Let-7e em neuroesferas 57
Figura 23 - Expressão transcricional de Lin-28a, Lin-28b e HMGA2 59
Figura 24 - Padronização das concentrações dos agentes mimetizadores e inibidores de Let-7b (A), Let-7c (B) e Let-7e (C) em cultura de células do EP 61
Figura 25 - Ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]) após exposição das células do Epitélio Ciliar a diferentes concentrações do agente de transfecção Lipofectamina 63

Figura 26 – Expressão de *caspase3* após tratamento com Lipofectamina 63
Figura 27 - Análise indireta da eficiência da transfecção por SiGLO 64
Figura 28 - Expressão dos miRNAs de Let-7b, Let-7c e Let-7e após manipulação 66
Figura 29 - Efeito da manipulação de Let-7 na formação das neuroesferas. Contagem de Neuroesferas por tamanho em 5 campos aleatórios diferentes após aumento de expressão por agente mimetizador (Mimic) ou inibição dos miRNAs Let-7b, Let-7c e Let-7e 68
Figura 30 - Expressão de Lin28 e Hmga2 após manipulação de Let-7 71
Quadro 1 - Lista de primers utilizados para RT-qPCR 35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 Epidemiologia das doenças que envolvem a retina 17

1.2 Retina e neurogênese 18

1.3 Células-tronco/progenitores retinianos 20

1.4 Corpo Ciliar 21

1.5 Definição e biogênese dos miRNAs 24

1.6 Funções dos miRNAs 25

1.7 Família Let-7 de miRNAs 26

1.8 Let-7 na retina 27

1.9 Lin-28 e a regulação de Let-7 27

1.10 HMGA2 como alvo de Let-7 29

1.11 O eixo regulatório Lin-28-Let-7-HMGA2 30

2 OBJETIVOS 32

2.1 Objetivos Gerais 32

2.2 Objetivos Específicos 32

3 MATERIAIS E MÉTODOS 33

3.1 Uso de animais e princípios éticos 33

3.2 Coleta das amostras 33

3.3 PCR Array *33*

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para quantificação de RNAs *34*

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para quantificação de microRNAs *35*

3.6 Western Blotting *36*

3.7 Imunofluorescência *36*

3.8 Cultura celular para obtenção de neuroesferas derivadas do epitélio ciliar *37*

3.9 Transfecção de células com agente Mimic e Inibidor de Let-7e *37*

3.10 Análise estatística dos tratamentos *37*

4 RESULTADOS 39

4.1 Presença de miRNAs maduros nas células do EC pela técnica de PCR array 39

4.2 Expressão de miRNAs da família Let-7 nas células do EC 39

4.3 Padrão de expressão de Lin-28a e Lin-28b nas células do Epitélio Ciliar 43

4.4 Padrão de expressão de HMGA2 nas células do Epitélio Ciliar 49

4.5 Ativação das células-tronco do EC e formação de neuroesferas 55

4.6 Expressão de Let-7 nas Neuroesferas derivadas do EP de animais neonatos 55

4.7 Expressão transcricional de Lin-28a, Lin-28b e HMGA2 nas Neuroesferas 58

4.8 Padronização da transfecção dos agentes miméticos e inibitórios de Let-7 60

4.9 Expressão de Let-7 após tratamento com mimetizadores e inibidores específicos *65*

4.10 Efeito da ativação e inibição de Let-7 na formação de neuroesferas *67*

4.11 Manipulação de Let-7 e efeito na expressão de Lin-28 e HMGA2 ..... *69*

5 DISCUSSÃO. 71

6 CONCLUSÕES..... 76

7 REFERÊNCIAS. 77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das doenças que envolvem a retina

Doenças que envolvem a retina são a principal causa de cegueira em adultos em populações urbanas no Brasil. A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma das mais significantes, pois é a maior causa de cegueira em indivíduos com mais de 50 anos em países desenvolvidos (BRESSLER, 2004). Estudos internacionais mostraram que cerca de 30% da população mundial com mais de 75 anos já apresenta algum estágio da doença. No Brasil, não há registro de estudos epidemiológicos que compreendam todo o território nacional, mas sim em locais isolados. Em Pernambuco, por exemplo, um estudo mostrou que 23 a 30% dos pacientes com mais de 55 anos de um hospital de referência já possuíam a doença (SANTOS et al., 2005). Com base em análise de dados obtidos de outros países pelo Ministério da Saúde, pode-se concluir que o Brasil possui uma prevalência de pessoas com DMRI de 2,2% na faixa de 70-79 anos e de até 10,3% na faixa de mais de 80 anos. Outra doença de extrema significância atualmente é a Retinopatia Diabética (RD). Dados de um estudo realizado no Brasil mostraram que a RD foi associada à baixa visão ou cegueira em 38,7% dos pacientes analisados (SALOMÃO; MITSUHIRO; BELFORT, 2009). Sua prevalência no Brasil é estimada entre 7,6% a 39% dos indivíduos com diabetes (SCHELLINI et al., 2014). Além de indivíduos idosos ou com doenças que predispõem o aparecimento de doenças oculares, segundo a Agência Internacional de Combate à Cegueira, é possível estimar que, no Brasil, 26 mil crianças sejam cegas devido a doenças oculares que poderiam ter sido evitadas ou tratadas (OTTAIANO et al., 2019).

Apesar de já existirem algumas alternativas de tratamento para as doenças que causam cegueira, nem todas possuem sua eficácia comprovada ou apresentam efeito de longa duração. Na DMRI, por exemplo, a ação dos fármacos dura em torno de 4-6 semanas e só é observada melhora em 1/3 dos casos. Já na Retinose Pigmentar, outra doença que acomete jovens e idosos, não há nenhum tratamento disponível eficiente comprovado cientificamente (SOLOMON et al., 2016). Desta forma, é imprescindível que novas pesquisas sejam feitas para que se possa oferecer alternativas mais eficazes e seguras ao tratamento dos pacientes com deficiências visuais.

1.2 Retina e neurogênese

A retina é um tecido nervoso integrante do Sistema Nervoso Central e uma estrutura fundamental do olho. Topograficamente, ela se localiza no fundo do olho e forma um disco circular de aproximadamente 35 mm de diâmetro nos seres humanos. O campo circular de aproximadamente 6 mm ao redor da fóvea é considerada como retina central e, além desse ponto até a *ora serrata*, é considerada como retina periférica (Figura 1). Ela é composta de várias camadas distintas. A camada mais interna é formada de neurônios ganglionares, cujos axônios formam o nervo óptico. A camada nuclear interna contém os corpos celulares das células neurais bipolares, horizontais e amácrinas. Essa camada também possui corpos celulares das células gliais de Müller, que estendem seus prolongamentos através das outras camadas. Em seguida, a camada nuclear externa contém os corpos celulares de dois tipos de fotorreceptores, os cones e os bastonetes. Entre as camadas nucleares há duas camadas plexiformes, que possuem sítios de comunicação sináptica.

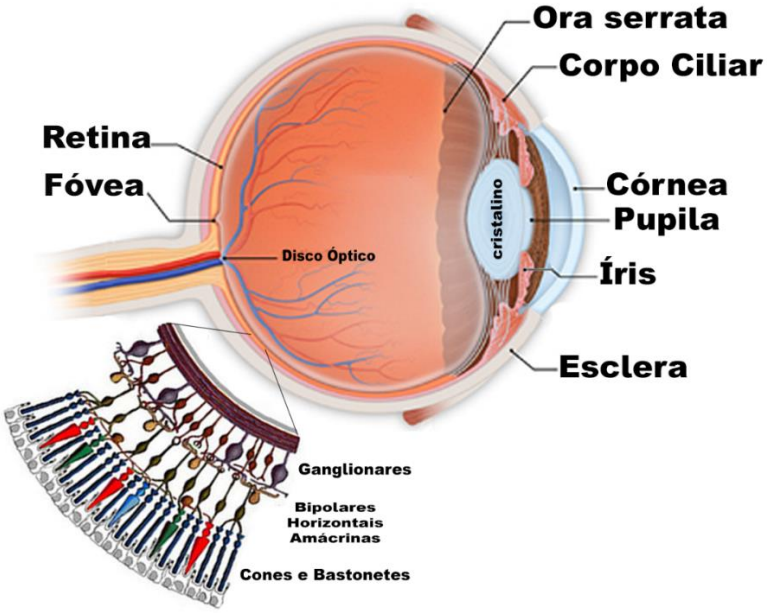

Figura 1 – Desenho esquemático de um corte transversal do olho humano com destaque para um aumento na área da retina. A luz atravessa as estruturas internas do olho até chegar na retina. Os fotorreceptores cones e bastonetes, localizados na Camada Nuclear Externa, irão realizar a fototransdução. O sinal visual é modulado pelos neurônios Bipolares, Amácrinas e Horizontais localizados na Camada Nuclear Interna, e pelas células Ganglionares, cujos axônios originam o nervo óptico. A imagem da retina é enviada ao córtex visual primário, localizado no lobo occipital do cérebro (adaptado de https://webvision.med.utah.edu e https://www.aao.org).

O processo de desenvolvimento do olho começa por volta da 3ª semana do desenvolvimento e compreende tecidos de diferentes origens embrionárias. O cristalino e a

córnea são derivados da ectoderme, enquanto a retina e as camadas epiteliais da íris e o corpo ciliar são derivados da placa neural anterior. Durante o processo de gastrulação forma-se um campo ocular na região central da placa neural anterior, em seguida ele se divide em dois formando a vesícula óptica e mais tarde o cálice óptico. A camada externa do cálice óptico se transforma no epitélio pigmentado retiniano e a camada interna se transforma em retina, dando origem à diferentes tipos celulares, incluindo os fotorreceptores. Ao final do desenvolvimento, a margem do cálice óptico sofre uma transformação e se diferencia em íris e posteriormente em corpo ciliar (GRAW, 2010).

Em determinado momento do desenvolvimento, inicia-se o processo de neurogênese. As células progenitoras retinianas começam a se diferenciar após a sinalização de fatores de crescimento, como o FGF, que ativam uma transformação inicial nas células que eventualmente se propaga por toda a extensão da retina (CAI; FENG; ZHANG, 2010). As células em processo de diferenciação passam por diferentes estágios, em que se diferenciam em tipos celulares específicos. Após o período da neurogênese, esta atividade se encerra em alguns animais e permanece até a vida adulta em outros, sendo estas espécies capazes de gerar novos tipos celulares na retina durante a vida adulta. Peixes e anfíbios são exemplos de animais que possuem a capacidade de neurogênese na vida adulta, o crescimento contínuo da retina se dá devido à adição de novas células retinianas ao longo da vida, elas se originam das células-tronco presentes na periferia retiniana, em uma região conhecida como Zona Marginal Ciliar (ZMC) (Figura 2). As aves, também possuem ZMC, porém com uma capacidade mais restrita à adição de novas células em relação aos peixes e anfíbios, sendo limitada às primeiras semanas do nascimento. Acredita-se que as aves e mamíferos, apesar de apresentarem crescimento da estrutura ocular por um período pós-natal, não apresentem crescimento devido à adição de novas células, mas sim de um esticamento da retina, associado ao crescimento da órbita ocular (PERRON; HARRIS, 2000). Evidências sugerem que, com o curso da evolução, os mamíferos perderam a região da ZMC, estrutura que continha o nicho de células-tronco retinianas, e com isso perderam a capacidade de neurogênese que advinha dessas células.

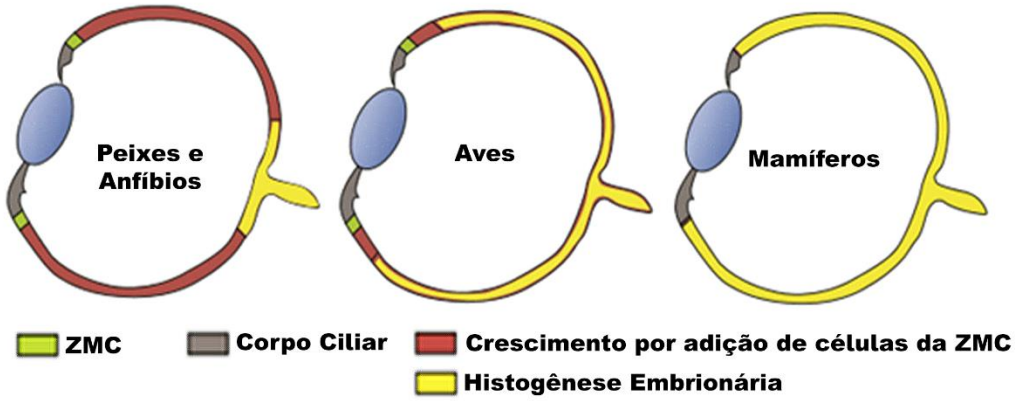

Figura 2 – Participação da Zona Marginal Ciliar (ZMC) na formação retiniana de vertebrados. Em cinza está representado o Corpo Ciliar, que é comum nos diferentes animais, e a ZMC está representada em verde, presente apenas em anfíbios, peixes e aves, não sendo observada nos mamíferos A porção da retina originada durante o estágio embrionário/neonatal em diferentes animais é indicada em amarelo, enquanto a porção derivada das células da ZMC está indicada em vermelho. (Modificado de MOSHIRI et al, 2004).

A retina está sujeita a diversos processos degenerativos patológicos ambientais ou genéticos, como a retinose pigmentar, DMRI e glaucoma. Por não apresentar capacidade de neurogênese retiniana nos mamíferos em sua fase adulta, essas patologias podem acarretar em danos às células neurais da retina e, consequentemente, ocasionar a perda visual parcial ou completa. Atualmente, estudos estão sendo feitos com o objetivo de compreender e melhorar o potencial regenerativo da retina dos mamíferos com o intuito de oferecer melhores prognósticos clínicos para as doenças citadas.

1.3 Células-tronco/progenitores retinianos

Hoje em dia, sabe-se que muitas das células não neurais localizadas no olho de mamíferos podem ser reprogramadas em células-tronco/progenitores retinianos após estímulo adequado, se desdiferenciando e perdendo suas propriedades de células adultas e diferenciadas. As células oculares com características de progenitores retinianos conhecidas até o momento são: células gliais de Müller (BRINGMANN et al., 2006, DAS et al., 2006; DEL DEBBIO et al., 2010), Epitélio Pigmentado Retiniano (EPR) (AMEMIYA et al., 2004), células do Epitélio Ciliar (EC) (TROPEPE et al., 2000; DEL DEBBIO et al., 2013), Íris (HARUTA et al., 2001) e células do Limbo (ZHAO et al., 2002; PARAMESWARAN et al., 2012). Atualmente, a fonte celular que demonstra maior vantagem clínica atrelada ao potencial regenerativo, disponibilidade, acessibilidade para a coleta e/ou tratamento *in lócus*, ausência de complicações éticas, além de baixos índices de respostas indesejadas, são as células derivadas do **Epitélio do Corpo Ciliar.**

1.4 Corpo Ciliar

O Corpo Ciliar (CC) é uma estrutura complexa situada entre a íris e a retina (Figura 1). O CC forma parte do segmento anterior do olho e é um importante regulador fisiológico, agindo diretamente na percepção visual. Este tecido é composto por músculos ciliares (com fibras longitudinais, circulares e radiais) e processos ciliares. Os processos ciliares são compostos de estroma (tecido conjuntivo frouxo vascularizado), e duas camadas de tecido epitelial, denominada de **Epitélio Ciliar (EC)** (Figura 3). O epitélio mais externo e contínuo ao Epitélio Pigmentado Retiniano possui grande quantidade de grânulos de pigmento, recebendo o nome de **Epitélio Pigmentado (EP)**, enquanto o epitélio mais interno (em contato com o vítreo e cristalino), não é pigmentado, recebendo o nome de **Epitélio Não-Pigmentado (ENP)**. As células do ENP são maiores que as células do EP e possuem uma quantidade maior de mitocôndrias devido à alta atividade metabólica e de síntese (DELAMERE, 2005). A forma ondulada do EC permite fornecer ao epitélio uma grande área de superfície para secreção do humor aquoso, glicoproteínas do vítreo, antioxidantes, enzimas e neuropeptídios (DELAMERE, 2005; BISHOP; BUTTERY; POLAK, 2002; COCA-PRADOS; ESCRIBANO; ORTEGO, 1999). Fibras zonulares conectam o CC ao cristalino e, em conjunto com a atividade dos músculos ciliares, promovem a acomodação do cristalino (ajuste do foco) (HANSSEN; FRANC; GARRONE, 2001; RAVIOLA, 1971). O EC é anatomicamente dividido em duas regiões, uma próxima à retina denominada *pars plana*, seguida da *pars plicata.*

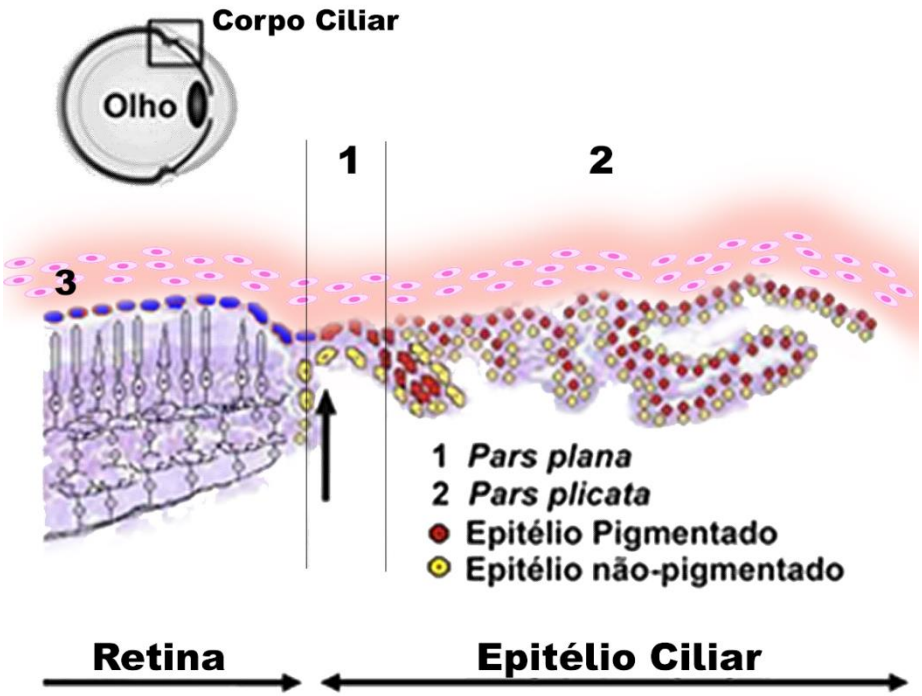

Figura 3. Desenho esquemático do Epitélio Ciliar (EC). O EC se localiza adjacente à retina e é composto por uma bicamada epitelial: Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP). Anatomicamente é classificado em *pars plana* (1) e *pars plicata* (2). O EC está em contato com os músculos ciliares (não identificados na figura) e a coroide (3). A seta indica o final da retina à esquerda e começo do Epitélio Ciliar à direita. Adaptado de (DEL DEBBIO et al., 2014)

O EC não contém células neuronais, porém compartilha a mesma origem embrionária dos progenitores retinianos no cálice óptico (LOCKER et al., 2010). Em doenças como o glaucoma hipersecretório, umas das alternativas clínicas para o alívio dos sintomas é a aplicação de terapia à laser no CC, aliviando assim a pressão intraocular.

No ano 2000, dois grupos independentes identificaram que algumas células do EC de mamíferos foram capazes de incorporar BrdU, sugerindo que essas células se encontravam em proliferação e poderiam ser potenciais células-tronco quiescentes (AHMAD; TANG; PHAM, 2000; TROPEPE et al., 2000). Em seguida, experimentos em cultura indicaram que, na presença dos fatores de crescimento como o Fator de Crescimento Fibroblasto (FGF) e Fator de Crescimento Epidermal (EGF), as células do EC formaram uma estrutura esférica suspensa composta de clones heterogênicos de células progenitoras neurais denominada Neuroesfera e expressaram uma gama de genes progenitores retinianos (Pax6, Sox2, Chx10, Rx, Lhx2, Nestina). De forma curiosa, as células do ENP não apresentaram essa capacidade de formar Neuroesferas, indicando a baixa presença (ou ausência) de células-tronco nesse tecido.

A Nestina é uma proteína de filamento intermediário que é expressa no sistema nervoso central em desenvolvimento estando presente também em várias estruturas do olho durante diferentes estágios do desenvolvimento, como no cálice óptico, cristalino, retina e nervo

óptico (YANG et al., 2000). Alguns dos primeiros experimentos nesta área não identificaram a presença de Nestina e outros marcadores de células-tronco ou progenitores nas células do EC e retina de mamíferos adultos sem o estímulo com fatores de crescimento (AHMAD; TANG; PHAM, 2000). Porém, experimentos feitos posteriormente realizados em ratos transgênicos expressando Nestina-GFP mostraram que uma pequena proporção de células do EC (0.7%) expressaram Nestina, mesmo sem o estímulo de fatores de crescimento (ABDOUH; BERNIER, 2004).

Para identificar o tipo de células-tronco/progenitoras presentes neste tecido e seu potencial de diferenciação, alguns pesquisadores induziram a expressão de genes fundamentais para a formação de fotorreceptores (como Otx2 e Crx) nas Neuroesferas derivadas do EC e observaram que as células se diferenciaram em um fenótipo específico de fotorreceptor, apresentando características morfológicas e imunocitoquímicas de fotorreceptores *in vitro* (AKAGI et al, 2004; INOUE et al, 2010), sugerindo que as células do EC apresentaram potencial de células-tronco/progenitores retinianos.

Além disso, outros pesquisadores submeteram essas células a condições ambientais que mimetizaram o desenvolvimento retiniano precoce e tardio (meio condicionado derivado de células em estágio embrionário ou neonato, respectivamente). Nessas condições, as células perderam algumas das propriedades de células epiteliais (incluindo a pigmentação) e foram capazes de se diferenciarem em diversos tipos neuronais retinianos, incluindo os fotorreceptores e células gliais de Müller (DAS et al., 2005).

A capacidade de gerar células-tronco/progenitoras retinianas e de diferenciação neural das células do EC foi caracterizada e comprovada nos seres humanos, desde idades bem precoces (neonatos) até em indivíduos com 70 anos de idade (*post-mortem*), mostrando que o potencial de reprogramação em células-tronco é uma característica preservada entre os mamíferos, incluindo os seres humanos (COLES et al., 2004; TROPEPE et al., 2000).

Estudos também comprovaram seu potencial de reprogramação *in vivo,* através da ativação local das células do EC por meio de injeções intraoculares de fatores de crescimento ou por transplante (CHACKO et al., 2003; DAS et al., 2004; XU et al., 2007; DEL DEBBIO et al., 2014).

A maior vantagem clínica apresentada por este tecido foi descrita por Xu e colaboradores em 2007, onde o autor indicou que são necessários apenas 5mm de tecido do EC humano para obter uma quantidade de células progenitoras satisfatória, e que este montante pode ser extraído cirurgicamente do próprio paciente sem o comprometimento da integridade do olho e visão (XU et al., 2007).

Apesar do potencial do EC de se reprogramar em células-tronco/progenitores retinianos e, consequentemente, regenerar o tecido, a retina de mamíferos apresenta um potencial muito limitado (para não dizer ausente) de regeneração tecidual, o que reforça a gravidade das doenças neurodegenerativas que atingem as células retinianas. A presença do potencial regenerativo acoplada à ineficiência deste mecanismo de regeneração, sugere a presença de mecanismos regulatórios dessa atividade nas células do EC, como os microRNAs (miRNAs), por exemplo.

1.5 Definição e biogênese dos miRNAs

Umas das mais abundantes classes de moléculas reguladoras de genes em organismos multicelulares são os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são sintetizados a partir de miRNAs primários (pri-miRNAs) que são transcritos pela RNA polimerase II e processados em dois estágios a partir da ação de duas RNases, Drosha, uma enzima endonuclease RNase III, e pelo seu cofator DFCR8 no núcleo. Os pré-miRNAs são então exportados para o citoplasma pela exportina 5 e pela proteína nuclear Ran-GTP. Quando chegam ao citoplasma são clivados pela RNase III Dicer e pelo TRBP (KIM; HAN; SIOMI, 2009), produzindo uma cadeia dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos, que constitui o miRNA (Figura 4).

Esses pequenos RNAs não codificantes se ligam ao RNA mensageiro (mRNA) alvo clivando-o ou reprimindo a síntese proteica, através da complementariedade imperfeita às regiões 3’ não traduzidas (UTRs) dos miRNAs alvos. A molécula de miRNA é incorporada ao RISC (complexo de silenciamento induzido) que o guia ao mRNA alvo com o objetivo de inibir a tradução, participando assim da regulação da expressão gênica. Essa forma de pareamento permite que um único miRNA regule a expressão de vários RNAs mensageiros diferentes, da mesma forma um único RNA mensageiro também pode ser regulado de forma conjunta por diferentes miRNAs (BARTEL, 2009). Hoje em dia, sabe-se que muitos destes miRNAs estão localizados nas regiões intrônicas dos próprios genes alvos.

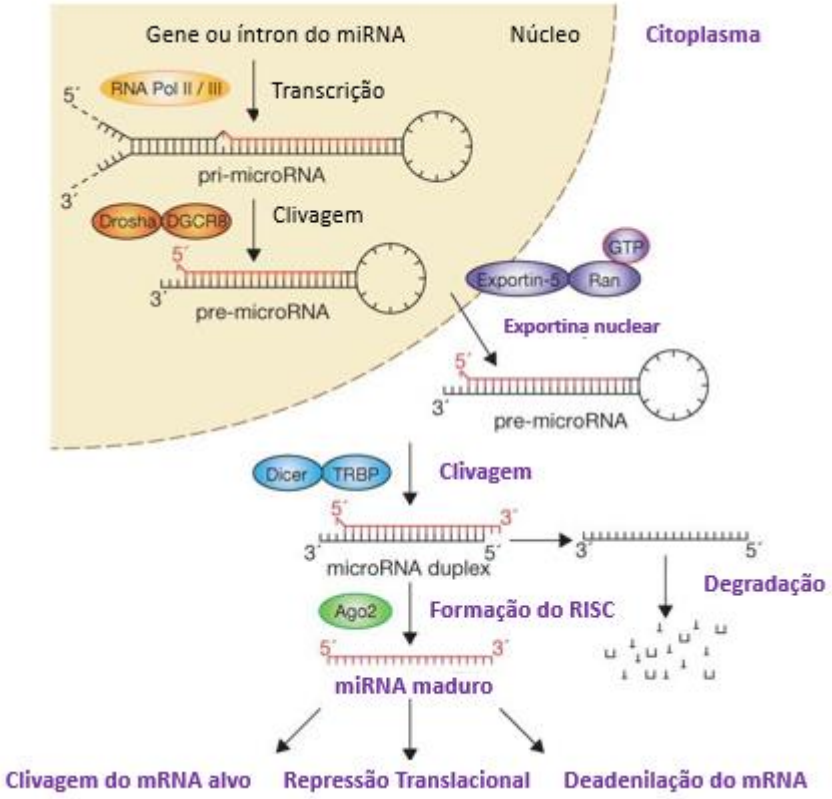

Figura 4. Esquema ilustrativo do mecanismo de biogênese do miRNA. O processo se inicia no núcleo, onde é transcrito pela RNA polimerase I, em seguida o pri-miRNA é clivado pela Drosha e seu cofator DGCR8, resultando no pre-miRNA. O pre-miRNA é exportado para o citoplasma e sofre clivagem pela enzima Dicer e seu cofator TRBP, gerando um transcrito de fita dupla, que é incorporado ao complexo RISC liberando uma das fitas para degradação, completando assim, a formação do miRNA maduro que irá se ligar ao RNA mensageiro alvo, clivando-o ou reprimindo a síntese proteica (WINTER et al., 2009).

1.6 Funções dos miRNAs

Os miRNAs exercem funções em diferentes processos biológicos como o desenvolvimento, diferenciação, proliferação e morte celular.

O ciclo celular e a diferenciação são controlados por vários processos no desenvolvimento. Um exemplo é um dos primeiros eventos do desenvolvimento, a transformação das células pluripotentes em células de uma linhagem específica, esse evento só é possível devido a diminuição da expressão de marcadores de pluripotência e a ativação de genes de expressão da linhagem específica, diminuindo seu potencial de auto renovação. Essas mudanças são acompanhadas pelo aumento da expressão de diversos miRNAs. Um ensaio de depleção da proteína ligante de RNA DGCR8, que é essencial para a biogênese dos miRNAs,

mostrou que em sua ausência as células falham em diminuir totalmente a expressão dos marcadores de pluripotência e apresentam limitada expressão dos genes específicos das linhagens, demonstrando a importância da presença dos miRNAs para a regulação do desenvolvimento e diferenciação celular (WANG et al., 2007).

Além de regular a diferenciação, os miRNAs também estão presentes em outras fases do ciclo celular, como na fase de proliferação. Em que pode atuar estimulando ou inibindo o ciclo celular, em alguns casos até induzindo a apoptose. O miR-101, por exemplo, se mostrou um inibidor do crescimento celular e indutor de apoptose *in vitro*, além disso, sua expressão foi encontrada diminuída ou até mesmo inexistente em tecidos humanos com câncer de mama (GUAN et al., 2016).

Por estarem relacionados com a regulação de diversos tumores, alguns miRNAs podem ser tanto potenciais oncogenes, quanto supressores de tumor (LEE; DUTTA, 2007). Como oncogenes, eles podem atuar ajudando o tumor a se manifestar. Por exemplo, o miR17-92 se mostrou amplificado em alguns tipos tumorais. Além disso, sua super expressão em células B de linfoma aceleraram a tumorigênese induzida por c-Myc em conjunto com a supressão da apoptose (HE et al., 2005). Em contrapartida, no câncer de mama, a expressão de miRNAs foi analisada em amostras normais e neoplásicas e foram encontrados padrões de expressão significantemente diferentes entre os tecidos, onde vários miRNAs encontraram-se significativamente reduzidos em amostras de câncer de mama (IORIO et al.,2005), mostrando uma possível função de supressor de tumor.

Dentre os miRNAs que são considerados supressores de tumor, estão os miRNAs da família Let-7.

1.7 Família Let-7 de miRNAs

Os miRNAs da família Let-7 foram um dos primeiros a serem identificados em *Caenorhabditis elegans* e os primeiros a serem descritos em mamíferos (REINHART et al., 2000). Apresentam-se pouco expressos em tecidos embrionários e acumulam-se nas células ao longo do seu desenvolvimento e diferenciação celular (LEE et al., 2005).

Em *C. elegans*, são essenciais para a transição da fase larval para o estágio adulto (PASQUINELLI et al., 2000). A perda de Let-7 causou desequilíbrio na diferenciação celular deste organismo, onde as células não conseguiram sair do ciclo celular e se diferenciarem no tempo correto, assim como o aumento de Let-7 induziu a diferenciação precoce durante o estágio larval destes animais (REINHART et al., 2000).

Algumas doenças estão associadas à expressão desregulada de Let-7 em combinação com a super expressão de outros miRNAs, como no caso do câncer, mencionado anteriormente. O primeiro caso estudado da influência de Let-7 foi em câncer de pulmão. O pulmão expressa grande quantidade de Let-7 e observou-se que a expressão reduzida de Let-7 foi fortemente associada com a diminuição da sobrevivência pós-operatória dos pacientes de carcinoma pulmonar. Em contrapartida, o aumento da expressão de Let-7 resultou na inibição do crescimento celular das células cancerígenas (TAKAMIZAWA et al., 2004). Em seguida à essa descoberta inicial, outros estudos foram feitos e delinearam o papel dos miRNAs de acordo com sua ação como supressor de tumor ou oncogene (ZHANG et al., 2007; SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016; ZHOU; LIU; CAO, 2017).

1.8 Let-7 na retina

Na retina, Let-7 está relacionado com a diferenciação de tipos celulares específicos, onde sua expressão coincide com a mudança da histogênese inicial para a tardia em roedores, entre o período de E16 e E18 (DECEMBRINI et al., 2009; LA TORRE; GEORGI; REH, 2013). Essa família de miRNAs apresenta afinidade para genes diretamente relacionados com a pluripotência e progenitores, tendo como alvos genes fundamentais para a regeneração retiniana, como c-Myc, ascl1a, Lin-28, pax6a, pax6b, mps1e hspd1 (FAUSETT; GUMERSON; GOLDMAN, 2008; QIN; BARTHEL; RAYMOND, 2009; THUMMEL et al., 2010).

O aumento gradativo da expressão de Let-7 coincide com a regulação negativa dos genes progenitores retinianos Rx e Pax6 e o regulador de ciclo celular Ki67. Em contrapartida, o aumento de Let-7 está relacionado com a regulação positiva de marcadores de diferenciação retiniana, como Rodopsina, mGluR6 e Glast, transcritos relacionados com fenótipos de bastonetes, bipolares e células gliais de Müller, respectivamente, que surgem na histogênese tardia (MEARS et al., 2001; AHMAD et al., 2004; XIA; AHMAD, 2016).

1.9 Lin-28 e a regulação de Let-7

Lin-28 é uma proteína de aproximadamente 25-kDa, com dois tipos de motifs para ligação de RNA, um domínio CSD (Cold Shock Domain) e um par de domínios *zinc finger* do tipo CCHC (CysCysHisCys) (MOSS; LEE; AMBROS, 1997). O gene Lin-28, assim como o miRNA Let-7, também exerce uma função regulatória no desenvolvimento do nematoide *C. elegans*. Sua expressão aumentada é necessária no primeiro estágio larval, assim como a

diminuição de sua expressão é importante no segundo estágio larval para que o desenvolvimento ocorra da forma correta (MOSS; TANG, 2003). Sua ação regulatória é conhecida por ser pós-transcricional, desta forma, Lin-28 é encontrado predominantemente no citoplasma e nos complexos RNAm-proteína (MOSS; LEE; AMBROS, 1997).

O organismo possui um importante mecanismo de controle da expressão de Let-7 que envolve a proteína ligante de RNA Lin-28 (REHFELD et al., 2014). A super expressão de Lin28 ou a inibição de Let-7 promove a reprogramação de fibroblastos humanos ou de ratos a células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (MARTNEZ; GREGORY, 2010). Diferente dos *C. elegans*, que possuem apenas um único gene Lin28 responsável pela repressão de Let-7, os mamíferos possuem duas formas, Lin-28a e Lin-28b, ambas são proteínas que se ligam ao RNA e compartilham uma grande semelhança nos seus domínios estruturais (GUO et al., 2006).

Lin-28a bloqueia a expressão de Let-7 ao se ligar ao loop terminal dos precursores de Let-7, esse reconhecimento molecular necessita tanto do domínio CSD quando dos domínios *zinc finger* da proteína Lin28a. (PISKOUNOVA et al., 2008). A inibição ocorre após Lin28a recrutar a atividade da terminal uridilliltransferase (TUTase) que inibe o processamento do pre-Let-7 pela Dicer e leva à diminuição rápida dos pre-Let-7 uridilados (HAGAN; PISKOUNOVA; GREGORY, 2009; HEO et al, 2009).

A forma como o Lin-28b realiza sua inibição ao Let-7 ainda é alvo de estudos, e existem várias hipóteses do seu mecanismo de ação. Vale ressaltar que a localização subcelular de Lin-28b ainda não está totalmente clara na literatura e também é alvo de novas pesquisas, portanto, o mecanismo preciso da repressão de Let-7 por Lin-28b ainda permanece incerto. Entretanto, vários trabalhos sugerem que a inibição ocorre através da interferência direta na maturação funcional de Let-7.

Análises de mutações e ensaios de competição revelaram que uma das possíveis formas de inibição é através da ligação do Lin-28b ao pré-Let-7 em uma região denominada de elemento precursor (preE), localizada na região da alça do *hairpin* (NAM, 2011), importante região para a maturação do pre-Let-7 (HEO et al., 2009). Análises estruturais também mostraram que a ligação do Lin-28b ao Let-7 denatura parcialmente a estrutura da alça na região onde a enzima Dicer atua, impedindo que Let-7 atinja a forma madura funcional (MAYR et al., 2012). Outro modelo sugere que Lin-28b se liga ao pri-Let-7 no núcleo, bloqueando a clivagem do microprocessador (NEWMAN; THOMSON; HAMMOND, 2008; VISWANATHAN; DALEY; GREGORY, 2008). E mais recentemente foi proposto que Lin-28b não faz o bloqueio de pre-Let-7, e sim do pri-Let-7 no nucléolo (PISKOUNOVA et al., 2011)

Lin-28a e Lin-28b estão fortemente presentes em células-tronco e células indiferenciadas, desempenhando o papel de manter a expressão de genes específicos de pluripotência (MOSS; TANG, 2003; RAMACHANDRAN; FAUSETT; GOLDMAN, 2010), sendo associadas com a capacidade regenerativa de uma célula ou tecido (SHYH-CHANG et al., 2013). Ao estudar as funções *in vivo* de Lin-28 nos estágios embrionário e de diferenciação, descobriu-se que sua expressão é imprescindível no desenvolvimento embrionário do indivíduo, no entanto, durante a diferenciação, sua expressão diminui consideravelmente. Além disso, observou-se o aumento da expressão de Let-7 concomitante à essa diminuição, evidenciando, mais uma vez, a relação e o papel de ambos no desenvolvimento e diferenciação celular (BALZER; MOSS, 2007).

1.10 HMGA2 como alvo de Let-7

Let-7 possui muitos genes alvos importantes envolvidos nos processos de desenvolvimento do organismo, um deles é a proteína HMGA2.

HMGA (High Mobility Group Protein) é uma família de proteínas que consiste em 2 membros (HMGA1 e HMGA2) que codificam as proteínas HMGA1a, HMGA1b e HMGA2, que são proteínas pequenas, não-histonas, associadas à cromatina. Elas não possuem atividade transcricional intrínseca, mas podem modular a transcrição ao alterar a estrutura da cromatina (SGARRA et al., 2004).

A expressão destas proteínas é alta durante a embriogênese e reduzida em tecidos adultos (CLEYNEN; VAN DE VEN, 2008). Elas participam de vários processos nucleares que influenciam o crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular, sendo observadas elevadas em vários tipos de tumores benignos mesenquimais, como lipomas, leiomioma uterino e hamartoma pulmonar (FEDELE et al., 2002; REEVES, 2001) e diversas neoplasias humanas, como carcinoma de pulmão por exemplo (SARHADI et al., 2006). HMGA2 também está presente nas células-tronco, participando da indução de pluripotência e de auto renovação (RESAR; CHIA; XIAN, 2018).

A região 3´UTR de HMGA2 tem 7 locais de complementariedade ao Let-7. (MAYR et al, 2007; LEE; DUTTA, 2007). Estudos foram realizados a fim de entender a relação entre ambos, e descobriu-se que podem ocorrer translocações cromossômicas que levem à deleção da região 3´UTR ativando HMGA2 devido à não repressão por Let-7 (LEE; DUTTA, 2007). Desta forma, a perda da repressão de HMGA2 por Let-7 leva à uma transformação oncogênica que deve ser considerada quando são estudadas mutações associadas ao câncer.

Em câncer de pulmão, por exemplo, HMGA2 é encontrado super expresso enquanto o Let-7 possui baixa expressão. Se houver a expressão ectópica de Let-7, uma quantidade significativa de fragmentos de mRNA de HMGA2 passam a ser detectados nas linhagens tumorais, juntamente com a inibição da proliferação celular e involução do tumor. Ao induzir as células a expressarem a proteína HMGA2 sem o sítio 3′UTR responsivo ao Let-7, o tumor volta a crescer, mesmo na presença de Let-7 (LEE; DUTTA, 2007).

Além de estar super expresso em vários tipos de tumores, a expressão de HMGA2 também se relaciona com um prognóstico clínico pobre, sugerindo que a perda da expressão de Let-7 e o consequente aumento da expressão de HMGA2 são indicadores de tumores mais agressivos e menos diferenciados (SHELL et al., 2007).

1.11 O eixo regulatório Lin-28-Let-7-HMGA2

O eixo regulatório formado por Lin-28-Let-7-HMGA está presente em diversos tipos celulares e regula a progressão de células progenitoras para a diferenciação durante vários estágios na histogênese. Sabe-se que este eixo está presente em células progenitoras retinianas, carcinoma escamoso, câncer de próstata, câncer intestinal, células-tronco intestinais, glioblastomas, câncer de pulmão e de tiroide (HOMBACH-KLONISC et al., 2014; STERENCZAK et al., 2014; WAGNER et al., 2014; EIDE et al., 2016; KAUR et al., 2016) (Figura 5).

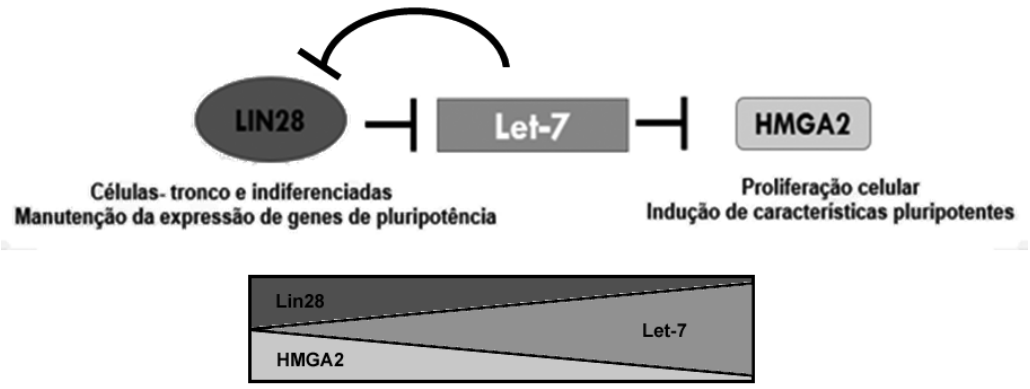

Figura 5. Desenho esquemático do eixo formado por Lin-28, Let-7 e HMGA2. A proteína ligante de RNA LIN-28, que está presente em células-tronco e garante a manutenção da expressão de genes de pluripotência, inibe a formação de Let-7. Let-7 também pode ligar-se ao Lin-28 mRNA regulando-o negativamente (duplo feedback negativo). HMGA2, proteína envolvida na proliferação celular e na indução de características pluripotentes, é um importante alvo de Let-7, que mantém sua expressão regulada negativamente nos tecidos diferenciados.

No SNC, pouco se sabe sobre a influência deste eixo na formação de neurônios (neurogênese) ou de células gliais (gliogênese). Na retina, sabe-se que a diminuição de Lin-28 e o aumento de Let-7 durante o desenvolvimento está relacionado com ambos os processos de diferenciação celular, sem favorecer a neurogênese ou a gliogênese. Essa diferenciação celular foi diretamente relacionada com a inibição da expressão de HMGA2 (XIA; AHMAD, 2016). O papel deste eixo, assim como seus componentes ainda é desconhecido nas células do EC de mamíferos, por isso, estudar a expressão de miRNAs da família Let-7, Lin-28 e HMGA nas células-tronco /progenitoras do EC é fundamental para esclarecer seu possível papel na regulação do potencial regenerativo da retina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar a presença dos componentes do eixo Lin-28- Let-7-HMGA nas células do EC de mamíferos.

2.2 Objetivos específicos

i. Investigar a expressão global dos miRNAs maduros nas células do EC, com ênfase na expressão dos miRNAs da família Let-7

ii. Avaliar a expressão transcricional e proteica de Lin-28a, Lin-28b e HMGA2 no EC de animais neonatos e adultos;

iii. Estudar o perfil de expressão de Lin-28a, Lin-28b, HMGA2 e a família Let-7 nas células-tronco progenitoras retinianas (neuroesferas) provenientes do EC;

iv. Avaliar o efeito da Ativação e Inibição de Let-7e em cultura de células-tronco do Epitélio Ciliar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Uso de animais e princípios éticos

Todos os procedimentos realizados nesse estudo seguiram os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo ICB-USP 75134-3). Foram utilizados, neste estudo, ratos Wistar adultos em idade pós-natal (30 a 60 dias) e ratos Wistar Neonatos em idade pós-natal de 1 a 3 dias. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação localizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sendo mantidos em temperatura controlada de 23º C, em regime de fotoperíodo 12h claro: 12h escuro, e recebendo ração comercial e água ad libitum. Os animais adultos foram eutanaziados em câmara de CO_2 e os neonatos foram eutanaziados por decapitação.

3.2 Coleta das amostras

Após a eutanásia, os olhos foram enucleados e mantidos em HBSS, posteriormente a córnea, o cristalino, o humor vítreo e aquoso, e a íris foram removidos. Uma tira de tecido ocular contendo o epitélio ciliar foi obtido, e o epitélio pigmentado (EP) foi separado manualmente do epitélio não-pigmentado (ENP). As amostras obtidas foram utilizadas imediatamente ou mantidas em freezer -80 °C até o posterior uso.

3.3 PCR Array

Células do EP e ENP foram dissecadas como descrito anteriormente. A extração do RNA foi realizada com o miRNeasy Mini kit (Qiagen), segundo especificações do fabricante. A análise da integridade das amostras de RNA foi realizada pelo equipamento Agilent Bioanalyzer do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da USP (CEFAP-USP) (Figura 6). Para a Transcriptase Reversa foi utilizado o miScript II RT kit (Qiagen) também de acordo com as especificações do fabricante. Foram utilizados 1µg de RNA por cDNA. As amostras de cDNA foram distribuídas em placas customizadas de 96 wells: miRNome miScript miRNA

PCR Array (Qiagen), para a análise de 653 miRNAs. Os resultados foram analisados em software público específico da empresa (http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna).

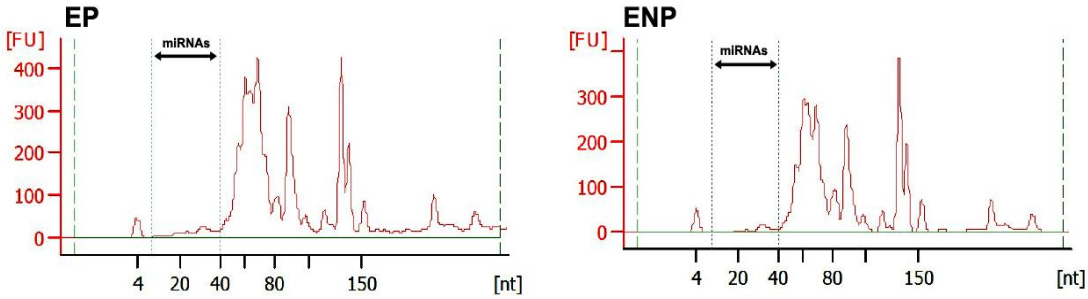

Figura 6 - Análise da qualidade dos pequenos RNAs extraídos para realização de técnica de array. Ambos Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) apresentaram miRNAs íntegros, indicados pela presença de picos inferiores aos observados pelo marcador (4nt) e por outros pequenos RNAs (40-150nt). Análise realizada pelo Agilent Bioanalyzer, chip para pequenos RNAs, CEFAP, USP.

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para quantificação de RNAs

Para a quantificação de RNAs, o RNA total foi isolado através da utilização de kit específico RNeasy Kit (Qiagen) seguindo orientação do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada por leitura de absorbância em 260nm e 280nm em espectrofotômetro Biomate 3S (Thermo Fisher). O cDNA foi sintetizado como descrito anteriormente (Ahmad et al., 1999; Bhattacharya et al., 2003). Após a confecção do cDNA o material foi amplificado em placa de reação MicroAmp™ Optical 96-Well (Thermo Fisher) com primers específicos *foward* e *reverse* (Quadro 1) no equipamento da Applied Biosystems 7300 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), para análise de PCR em tempo real quantitativo (q-PCR). A concentração ideal dos primers foi testada com o objetivo de eliminar a possibilidade de formação de dímero. As medidas foram feitas utilizando triplicatas e controle negativo sem amostra (branco). O resultado foi calculado com base nos valores de CT e normalizados pela expressão do gene controle interno GAPDH.

Quadro 1 – Lista de primers utilizados para RT-qPCR

Gene	Sequência do Primer	Nº de Acesso	T º	Pares de base
HMGA2	F: CTGGACGTCCGGTGTTGGT R: AACACCTTTCGGGAGACGGG	NM_032070.1	60	131
Lin-28A	F: CTTTTGCCAAAGCATCAGCCA R:GGTAGGGCTGTGGATCTCTT	XM_006239062.1	60	121
Lin-28b	F: TGCCATTACTGCCAGAGCAT R: TCACCTCCTGAGGAAACGGT	XM_006256601.1	60	178
Gapdh	F: ACAGTCCATGCCATCACTGCC R:GCCTGCTTCACCACCTTCTTG	NM_017008	60	266

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para quantificação de microRNAs

Para a quantificação de microRNAs, foi utilizado o kit específico miRNeasy (Qiagen) seguindo orientação do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada por leitura de absorbância em 260nm e 280nm em espectrofotômetro Biomate 3S (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizados 10ng do RNA extraído para a reação de transcrição reversa utilizando o kit Taqman MicroRNA Reverse Transcription com os primers específicos, conforme as instruções do fabricante. A análise quantitativa dos miRNAs da família Let-7 foi determinada em placa MicroAmp™ Optical 96-Well (Thermo Fisher) utilizando o Applied Biosystems 7300 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) e o kit Taqman MicroRNA Expression Assay (Applied Biosystems) para os microRNAs Let-7a (assay ID 000377), Let-7b (assay ID 002619), Let-7c (assay ID 000379), Let-7d (assay ID 002283), Let-7e (assay ID 002406), Let-7f (assay ID 000382), Let-7i (assay ID 002221) e snoRNA (assay ID 001718), utilizado como controle endógeno. A reação de PCR em tempo real seguiu a 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 60s. As amostras foram analisadas em triplicatas. O resultado foi calculado com base nos valores de CT e normalizados pela expressão do *sno* controle.

3.6 Western Blotting

Para detectar os níveis da proteína Lin-28A e HMGA2 foram realizados ensaios com o método de Western Blot. A proteína GAPDH foi utilizada como controle. Amostras de 30 μg foram extraídas das células, do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não Pigmentado (ENP) de ratos neonatos e adultos, utilizando tampão de extração de proteínas (RIPA). A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford utilizando a proteína albumina como padrão, sendo as respectivas absorbâncias determinadas por espectrofotômetro. Em seguida, as amostras foram desnaturadas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Após a separação foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com uma solução de TBS-T (25mm Tris-HCL, pH 8.2, 144 mm NaCl, 01% Tween-20) com 5% de leite desnatado por 2 horas em temperatura ambiente, seguido de incubação com anticorpos primários (Lin 28ª e HMGA2, 1:1000), em 1% de leite desnatado overnight, a 4°C sob agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas diversas vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário (Gt a Rb peroxidase 1:2000) em 1% de leite desnatado por 2 horas em temperatura ambiente. A revelação foi feita com ECL (ECL Western Blotting Substrate - Thermo Scientific) em câmara escura.

3.7 Imunofluorescência

Os olhos fixados e crioprotegidos foram submetidos a imunohistoquímica pelo método da imunofluorescência indireta. Após incubação com uma solução de bloqueio dos sítios inespecíficos (albumina bovina 1%, soro não imune do animal utilizado para obtenção do anticorpo secundário 10% em PB/Triton X-100 0,3%) durante 60 minutos, os cortes foram incubados *overnight* à temperatura ambiente com os anticorpos primários contra Lin-28A e HMGA2 (1:100), diluídos em PB/Triton X-100 0,3%. No dia seguinte, após lavagens em PB, foram realizadas as incubações com os respectivos anticorpos secundários conjugados com Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes) durante 2 horas à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Os controles para cada uma das proteínas utilizadas foram realizados com a omissão dos anticorpos primários. As lâminas foram cobertas com o meio de montagem Vectashield (Vector Labs) para posterior análise e captura de imagem em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss 700 em Axio Observer invertido (Carl Zeiss). Seu processamento esteve restrito somente a alterações de contraste e brilho.

3.8 Cultura celular para obtenção de neuroesferas derivadas do epitélio ciliar

A cultura para obtenção de neuroesferas foi feita como descrito anteriormente (Ahmad et al., 2000; Das et al., 2004). Brevemente, os olhos foram enucleados e mantidos em HBSS enquanto a córnea, cristalino e a íris foram removidos. Uma tira de tecido ocular contendo o EC foi separada do resto do olho a partir da porção final da retina, coletando o início da *pars plana* e *plicata*. As porções do Epitélio Pigmentado (EP) e do Epitélio Não-Pigmentado (ENP) foram separadas manualmente. O material foi incubado em HBSS sem cálcio (pH 7.0) contendo DNAse (1mg/ml), EDTA (100mM) e Tripsina (0,25%) por 35 min a 37 °C. As células foram então cultivadas em meio contendo DMEM/F12, 1X N2 suplemento (GIBCO), 2 mM l-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina. Para a ativação das propriedades progenitoras, a cultura foi suplementada com FGF2 (10 ng/ml) (Sigma) e EGF (20 ng/ml) (Sigma) numa densidade de 10^5cells/cm^2 por 7 dias.

3.9 Transfecção de células com agente Mimic e Inibidor de Let-7e

As células foram dissecadas e cultivadas como descrito anteriormente por 24 horas. Em seguida foram expostas aos agentes customizados com pequenas cadeias de RNAs sintéticos confeccionados para inibir a atividade endógena de Let-7e (Inibidor, 10, 50 e 100nM, Custom *mir*Vana™ miRNA inhibitors, Ambion) ou o seu mimetizador, responsável por aumentar os níveis endógenos de Let-7e (Mimic, 5, 10 e 30nM, Custom *mir*Vana™ miRNA inhibitors, Ambion), por 6 horas, em meio Opti-MEM e Lipofectamina (1 µg/ml). Após 6 horas, as células foram centrifugadas a 22.000 rpm, o sobrenadante foi retirado e em seguida o meio DMEM-F12 enriquecido com fatores de crescimento foram acrescentados novamente. As células foram cultivadas por mais 5 dias. Após este período, as células foram fixadas ou coletadas para a extração de RNA.

3.10 Análise estatística dos tratamentos

Para os experimentos de PCR e WB, pools das amostras de 7-10 animais diferentes foram coletados, sendo analisados 3 pools diferentes por idade (N=3). Os dados foram representados em unidades arbitrárias (U.A.), sendo o valor estimado relativo ao valor da curva padrão ou valores de CT (PCR), com o uso dos genes *GAPDH* ou *Sno* como controles endógenos. Nos experimentos de WB, os pixels foram quantificados pelo software ImageJ, com base na expressão de GAPDH como controle endógeno. As diferenças estatísticas entre os tratamentos foram avaliadas pelo test-T de Student ou ANOVA, em Software GraphpadPrism. Em todos os

casos o critério de significância foi dado pelo valor de $P < 0,05$ e os resultados apresentados pela Média ±SEM.

4 RESULTADOS

4.1 Presença de miRNAs maduros nas células do Epitélio Ciliar pela técnica de PCR array

Para verificar a presença e distribuição dos miRNAs nas células do EC, avaliamos o perfil de expressão de 650 miRNAs maduros nas células do Epitélio Pigmentado (EP) em comparação com as células do Epitélio Não Pigmentado (ENP) pela técnica de PCR *array*. Nossos resultados indicaram que as células do ENP apresentaram mais miRNAs maduros super-expressos (198) que as células do EP (57) (Figura 7). Em contrapartida, as células do EP apresentaram maior quantidade de miRNAs menos expressos em comparação com as células do ENP (círculos verdes). Esses resultados indicaram que, entre os 2 tipos celulares do EC, as células do ENP expressam mais miRNAs que as células do EP.

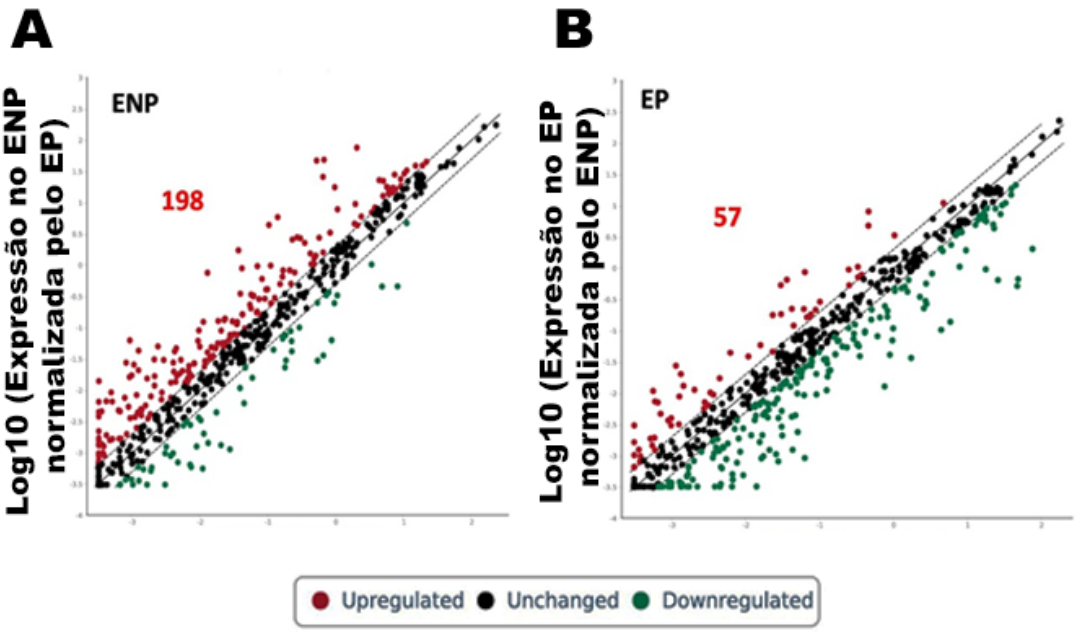

Figura 7 - Análise por PCR *Array* da expressão de miRNAs maduros pelas células do Epitélio Pigmentado e Epitélio Não-Pigmentado. (A) Análise da expressão de miRNAs no ENP em comparação com o EP, indicando 198 miRNAs significativamente mais expressos nestas células (círculos vermelhos- 2 vezes mais expressos). (B) Expressão de miRNAs maduros no EP em comparação com o ENP, indicando 57 miRNAs significativamente mais expressos (2 vezes mais expressos). Os círculos verdes são relacionados aos miRNAs menos expressos (2 vezes menos expressos) e os círculos pretos representam os miRNAs sem diferenças na expressão.

4.2 Expressão de miRNAs da família Let-7 nas células do Epitélio Ciliar

Ao investigar a distribuição dos miRNAs da família Let-7 pela técnica de PCR *array*, identificamos a maioria dos componentes desta família sendo mais expressos nas células do

ENP em comparação com a expressão detectada no EP (Figura 8). Dentre os Let-7 detectados mais expressos no ENP, estavam Let-7a (-3p e -5p), Let-7b-5p, Let-7c (-2-3p e -5p), Let-7d (-3p e -5p), Let-7e (-3p e -5p) e Let-7f (-3p e -5p). Os miRNAs da família Let-7 que não apresentaram diferenças de expressão entre EP e ENP foram Let-7b-3p, Let-7c-1-3p, Let-7f-2-3p e Let-7i (-1-3p e -2-3p). Nesta análise, nenhum miRNA da família Let-7 foi observado mais expresso no EP em relação ao ENP.

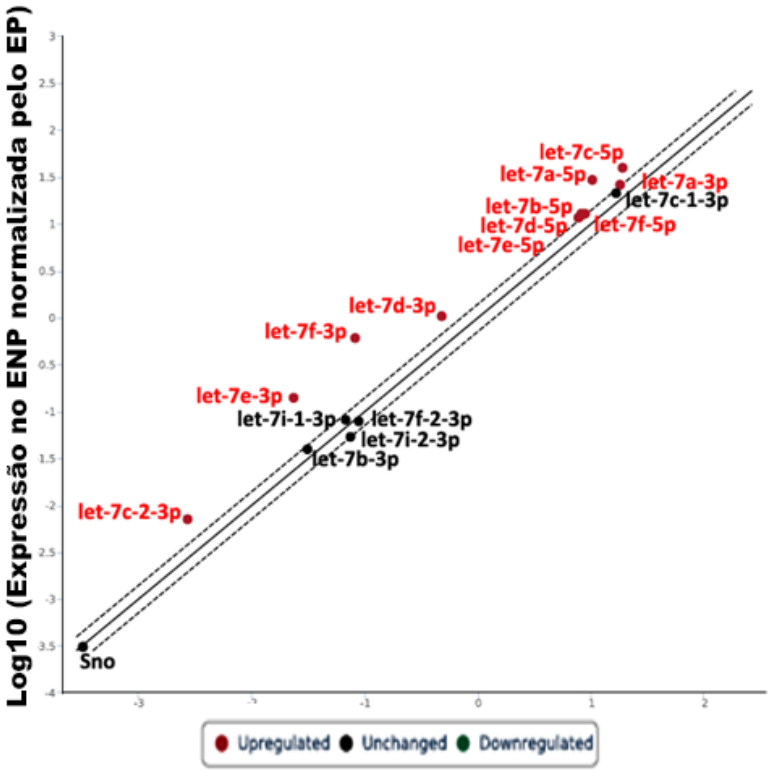

Figura 8 - Análise por PCR Array da expressão de miRNAs maduros nas células do Epitélio Ciliar, com foco nos miRNAs da família Let-7. Os círculos vermelhos representam os miRNAs detectados nas células do ENP com expressão superior a 2 vezes em comparação com a expressão detectada no EP. Os círculos pretos representam os miRNAs sem diferenças na expressão. Sno = controle endógeno.

Para validar os resultados obtidos pelo PCR array, realizamos experimentos de PCR em tempo real para os miRNAs da família Let-7, em amostras de EP e ENP de ratos adultos (Figura 9). Confirmamos a presença de maior expressão dos membros desta família nas células do ENP em comparação com as células do EP nos animais adultos, com destaque para a expressão relevante dos Let-7b, Let-7c e Let-7e, que se apresentaram mais expressos em ambos os tipos celulares em comparação com os demais componentes da família Let-7.

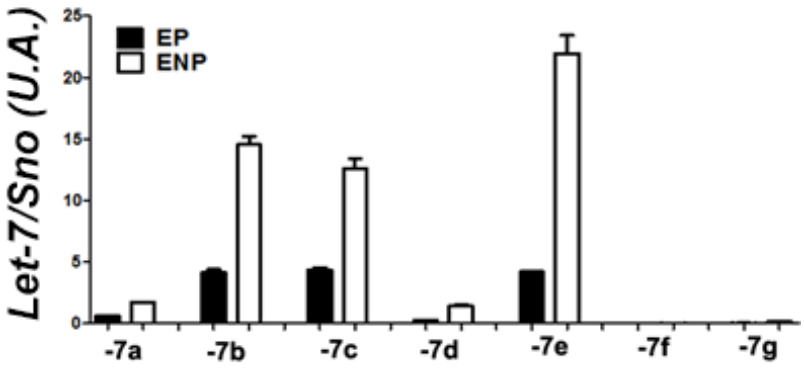

Figura 9 - Análise por PCR em tempo real (quantitativo) da expressão dos miRNAs da família Let-7 no Epitélio Ciliar de animais Adultos. Os miRNAs da família Let-7 estudados apresentaram expressão significativamente maior nas células do ENP em comparação com as células do EP. EP = Epitélio Pigmentado, ENP = Epitélio Não-Pigmentado, U.A. = Unidade Arbitrária. $p < 0,05$.

Sabe-se que os miRNAs da família Let-7 apresentam expressão aumentada durante a diferenciação tecidual, sendo pouco expressos nos tecidos embrionários e em desenvolvimento. Ao avaliarmos a expressão de Let-7 nas células do EC dos animais neonatos em comparação com os animais adultos, detectamos o mesmo padrão de aumento de expressão, sendo menos expressos de forma geral nos tecidos de animais neonatos em relação aos adultos (Figura 10). A exceção observada foi relacionada à expressão de Let-7d no EP, sendo menos expresso no tecido de animais adultos comparado com os neonatos.

Um aumento significativo de expressão em ambos os epitélios (EP e ENP) foi detectado nos miRNAs Let-7b, Let-7c e Let-7e.

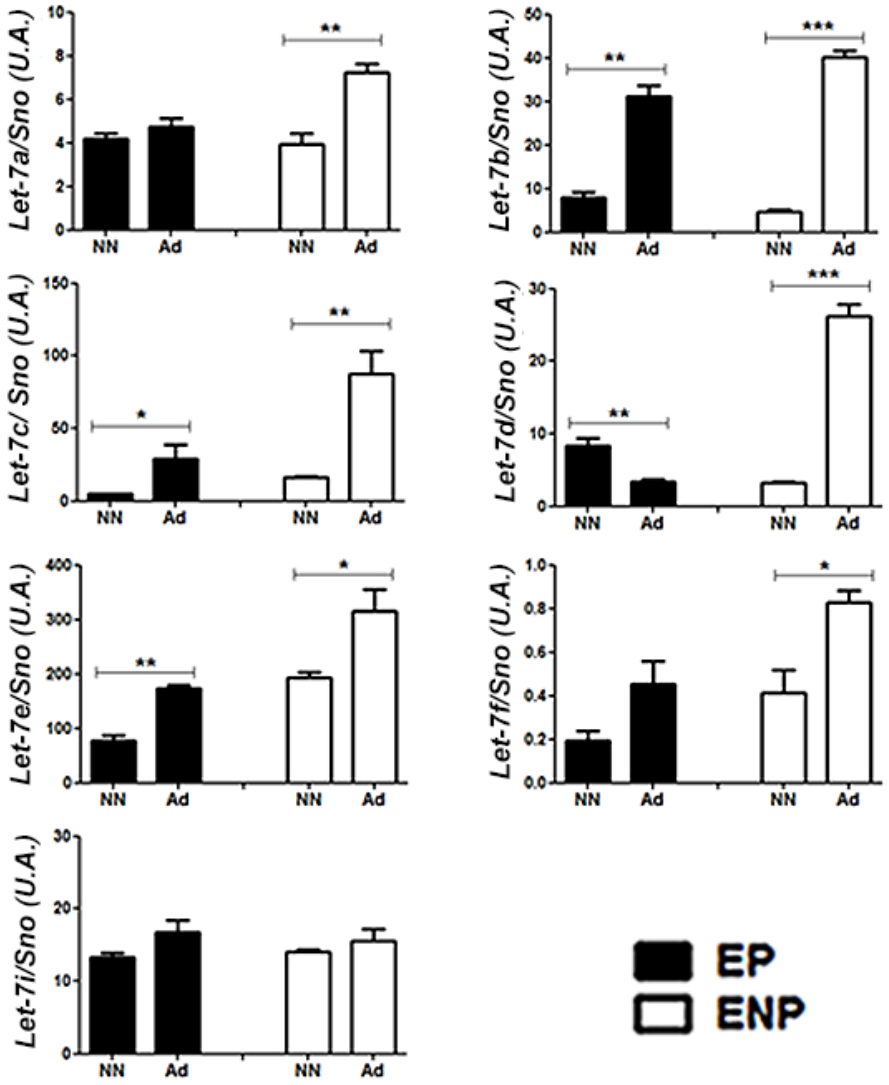

Figura 10 - Análise por PCR em tempo real (quantitativo) da expressão dos miRNAs da família Let-7 no Epitélio Ciliar de animais Neonatos e Adultos. Os miRNAs da família Let-7 estudados apresentaram expressão relativamente maior nas células de animais adultos em comparação com os neonatos. EP = Epitélio Pigmentado, ENP = Epitélio Não-Pigmentado, NN = Neonatos, Ad = Adultos, U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; **p< 0,005; ***p< 0,0005.

4.3 Padrão de expressão de Lin-28a e Lin-28b nas células do Epitélio Ciliar

A análise dos transcritos de Lin-28a indicou maior expressão nas células do EP de animais neonatos em relação ao EP de animais adultos (Figura 11A), sendo aproximadamente 2,5 vezes mais expresso nos neonatos (EP NN = 0,0009708 ± 4,9e-005; EP Ad = 0,0003713 ± 3,4e-005). As células do ENP não apresentaram diferença estatística na expressão de Lin-28a entre as células de animais neonatos e adultos (ENP NN = 0,0003817 ± 4,8e-005; ENP Ad = 0,0005086 ± 4,6e-005).

Os transcritos de Lin-28b também se apresentaram mais expressos no EP de animais neonatos em comparação com a expressão no EP de animais adultos (EP NN = 0,002172 ± 0,0002; EP Ad = 0,001027 ± 0,0001), sendo aproximadamente 2 vezes mais expresso em neonatos (Figura 11B). Diferente de Lin-28a, a expressão dos transcritos de Lin-28b também foi significativamente maior no ENP de animais neonatos em comparação com o ENP de animais adultos (ENP NN = 0,005549 ± 0,0009; ENP Ad = 0,001405 ± 0,0003), sendo aproximadamente 4 vezes mais expresso nos neonatos.

Ao analisar a expressão proteica de Lin-28a nas células do EC por Western Blotting, observou-se maior expressão nas células de neonatos em comparação com os adultos em ambos os epitélios (Figura 12). A quantificação das bandas do WB indicou que a expressão de Lin-28a nas células do EP de neonatos foi aproximadamente o dobro da expressão encontrada nas células do ENP (EP= 175.0 ± 32.7; ENP = 90.67 ± 16.83). Os animais adultos apresentaram baixa expressão de Lin-28 e sem diferenças significativas entre as células do EP e ENP.

A análise proteica de Lin-28b não foi realizada pois não foi encontrado anticorpo comercialmente disponível compatível com a proteína de roedores.

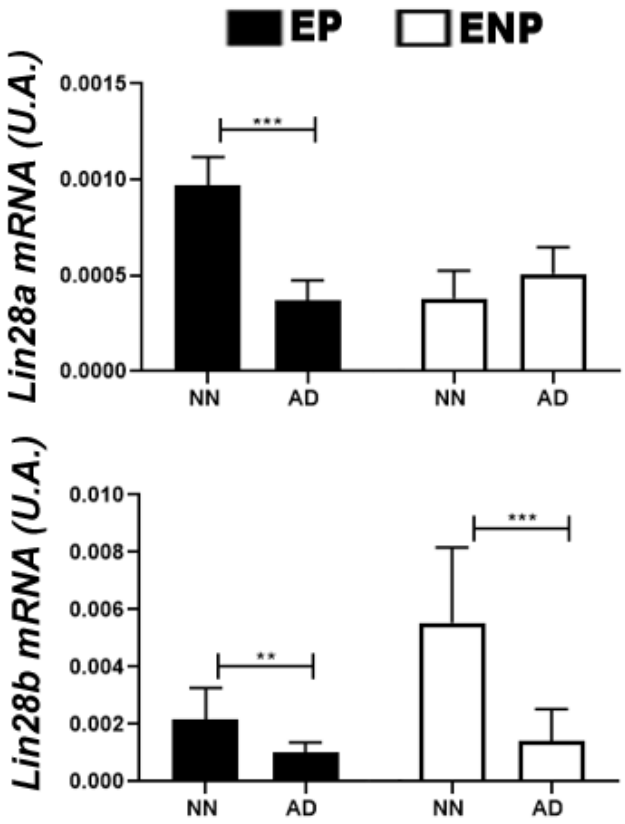

Figura 11 - Expressão transcricional de Lin-28a e Lin-28b nas células do EC de animais neonatos e adultos. Análise por PCR quantitativo da expressão dos transcritos de Lin-28a (A) e Lin-28b (B) nas células do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) de animais neonatos (NN) e adultos (AD). Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; **p< 0,005; ***p< 0,0005.

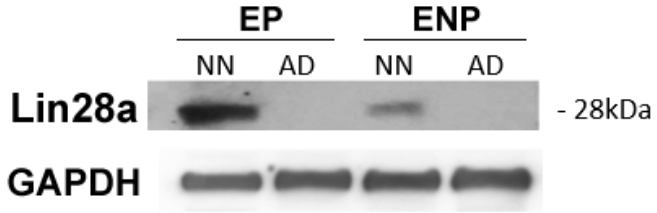

Figura 12 – Expressão proteica de Lin-28 nas células do EC. Análise feita por Western Blotting para a detecção da quantidade de proteína Lin-28b expressa no Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) de animais neonatos (NN) e adultos (AD). kDa = quilo Dalton.

Para estudar a localização da proteína Lin-28a nas células do EC, experimentos de imunofluorescência indireta foram realizados em cortes transversais do olho de animais adultos, neonatos e embriões de 15 dias (Figura 13).

Durante o estágio embrionário, a camada neuroblástica da futura retina é composta por muitos progenitores retinianos que irão se diferenciar em etapas específicas. No olho de embrião de 15 dias (neurogênese precoce – diferenciação de ganglionares, horizontais, amácrinas e cones), Lin-28a foi encontrado expresso na porção mais interna da camada neuroblástica, local da futura Camada Nuclear Interna, e na camada de células ganglionares já diferenciadas. Uma forte marcação também foi observada nas células do Epitélio Pigmentado Retiniano (EPR).

Lin-28a também foi expresso na região da margem retiniana e do Epitélio Ciliar em desenvolvimento, apresentando marcação contínua ao EPR, futuro EP, e porção final da retina neural, futuro ENP (Figura 13, quadro da direita).

A proteína Nestina é um filamento intermediário do citoesqueleto conhecida por ser um indicador de progenitores neurais quando associada a outros marcadores. A expressão de Lin-28a na camada neuroblástica indicou a sobreposição de sua expressão com Nestina. Na margem retiniana, a expressão de Nestina foi menos evidente, com menos sobreposição com Lin-28a.

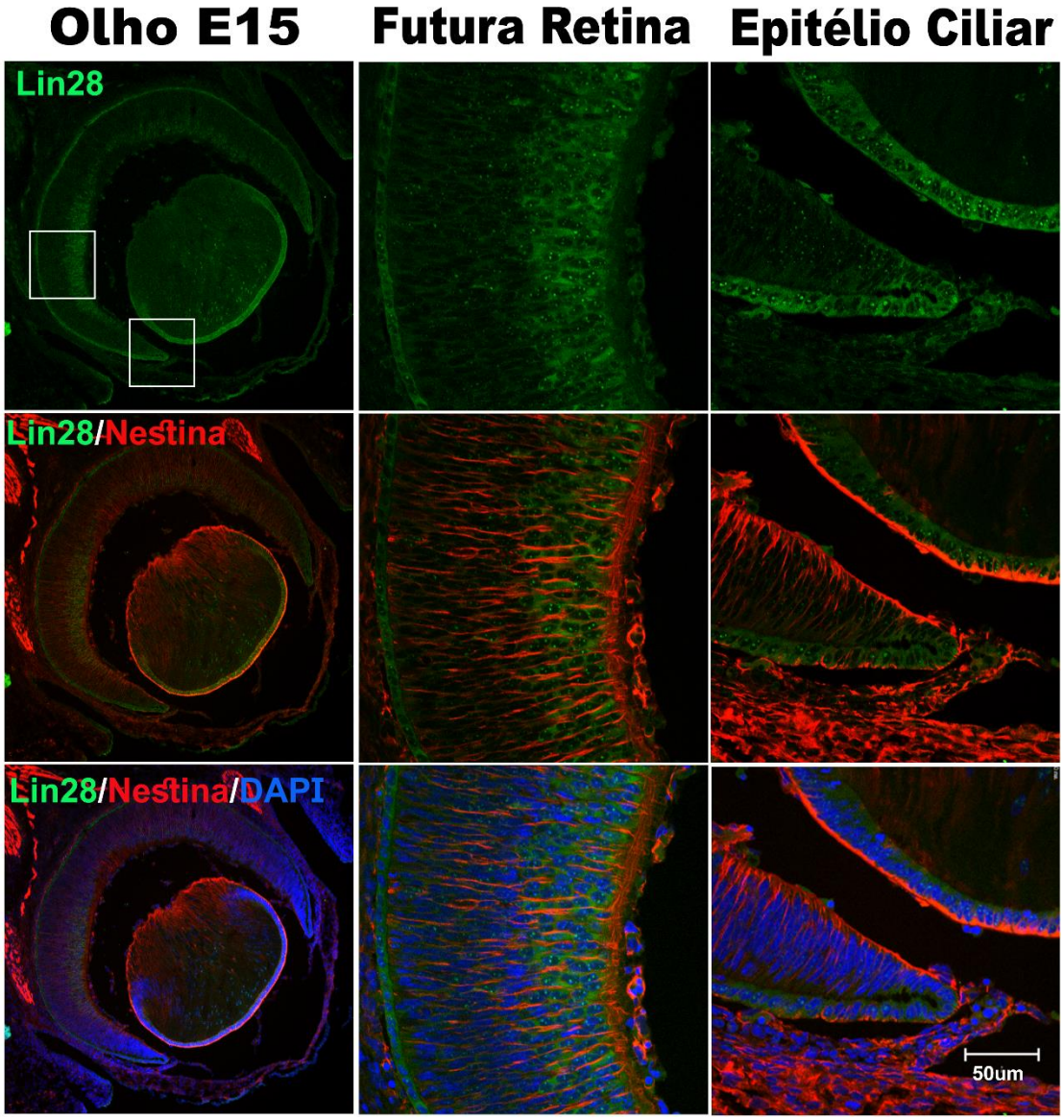

Figura 13 – Expressão de Lin-28a no olho de embrião de 15 dias. Análise imuno-histoquímica em cortes transversais de olhos de animais com 15 dias de desenvolvimento embrionário (E15) feita em microscópio confocal. As imagens da esquerda são referentes ao olho inteiro do embrião, as imagens centrais são detalhes aumentados da região da futura retina (camada neuroblástica) e as imagens da direita são detalhes aumentados do futuro Epitélio Ciliar (margem retiniana). Lin-28 foi marcado em verde, Nestina em vermelho e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Escala = 50µm.

Nos animais neonatos, a proteína Lin-28a foi observada menos expressa na região do EC e retina em relação aos olhos de embriões (Figura 14). A marcação de Lin-28a se apresentou difusa pelo citoplasma.

Animais adultos não apresentaram expressão de Lin-28a na região do EC nem da retina, ficando restrita à coroide (Figura 15).

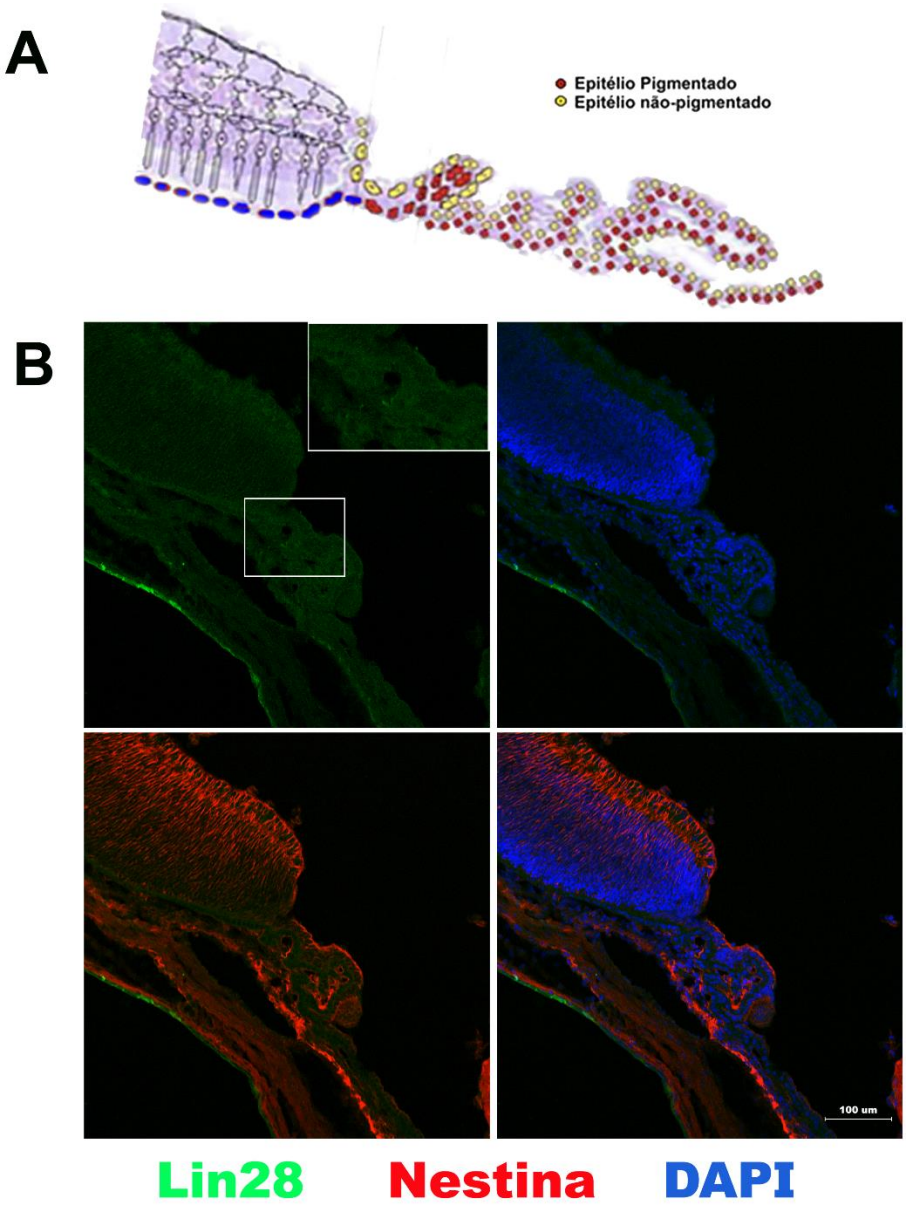

Figura 14 – Expressão de Lin-28 no olho de animais neonatos. (A) Desenho esquemático da região da retina e Epitélio Ciliar. (B) Análise imuno-histoquímica em cortes transversais de olhos de animais neonatos feita em microscópio confocal. Lin-28a foi marcada em verde, Nestina em vermelho e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Na primeira imagem, o quadrado inserido é representativo ao aumento da região destacada. Escala = 100µm.

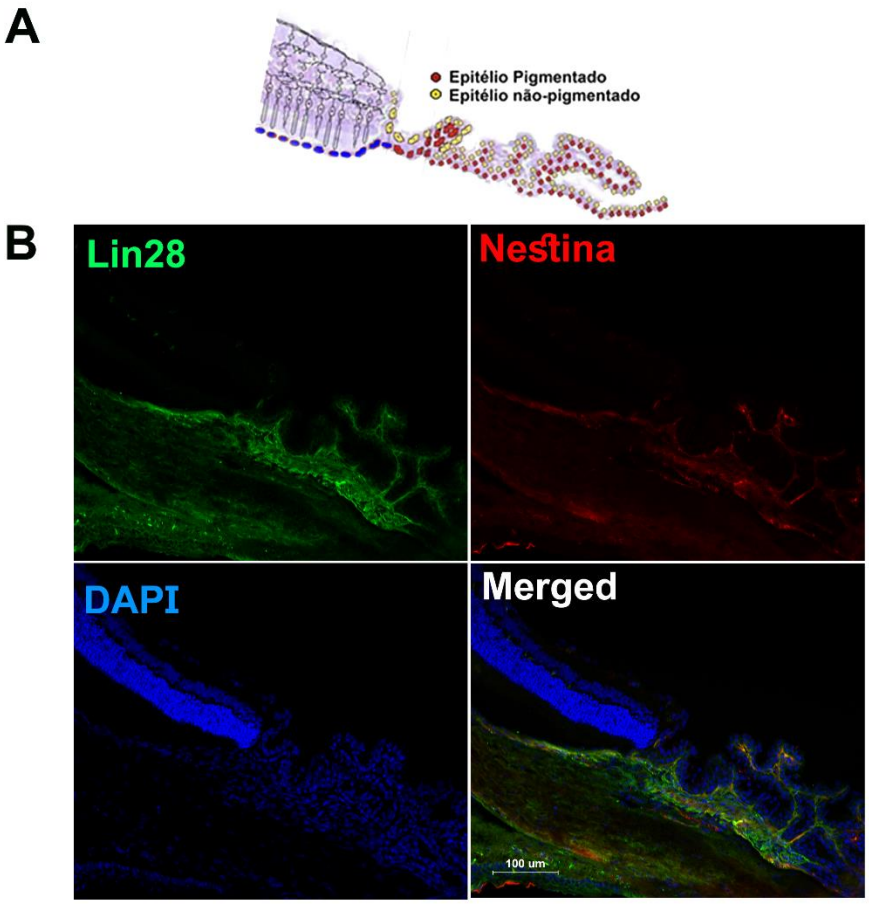

Figura 15 – Expressão de Lin-28a no olho de animais adultos. (A) Desenho esquemático da região da retina e Epitélio Ciliar. (B) Análise imuno-histoquímica em cortes transversais de olhos de animais adultos feita em microscópio confocal. Lin-28a foi marcada em verde, Nestina em vermelho e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Escala = 100µm.

4.4 Padrão de expressão de HMGA2 nas células do Epitélio Ciliar

Um dos alvos mais conhecidos da família Let-7 de miRNA é a proteína HMGA2, responsável pela regulação transcricional de genes de controle da proliferação e diferenciação celular (MAYR et al., 2007).

A análise dos transcritos de HMGA2 indicou maior expressão nas células do EC de animais neonatos em relação aos animais adultos, em ambos EP e ENP (Figura 16). No EP, os neonatos expressaram aproximadamente 10 vezes mais transcritos de HMGA2 em relação aos animais adultos (EP NN = 0,0688 ± 0,005; EP Ad = 0,00609 ± 0,001). No ENP essa diferença foi ainda maior, os neonatos apresentaram expressão aproximadamente 25 vezes maior que as células dos animais adultos (ENP NN = 0,2555 ± 0,07; ENP Ad = 0,01039 ± 0,003).

Ao analisar a expressão proteica de HMGA2 nas células do EC por Western Blotting, observou-se maior expressão nas células de animais neonatos em comparação com os adultos em ambos os epitélios (Figura 17A). A quantificação dos pixels realizada no programa ImageJ sugeriu que o EP de neonatos expressou aproximadamente o dobro de HMGA2 que o EP de animais adultos. Da mesma forma, o ENP de animais neonatos apresentou expressão aproximadamente 3 vezes maior em relação às células de ENP de animais adultos (Figura 17B).

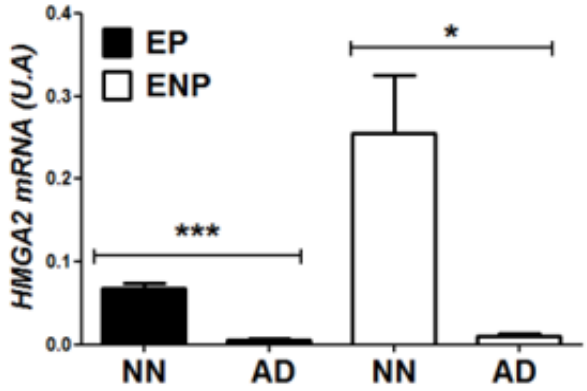

Figura 16 - Expressão transcricional de HMGA2 nas células do EC de animais neonatos e adultos. Análise por PCR quantitativo da expressão dos transcritos de HMGA2 nas células do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) de animais neonatos (NN) e adultos (AD). Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; ***p< 0,0005.

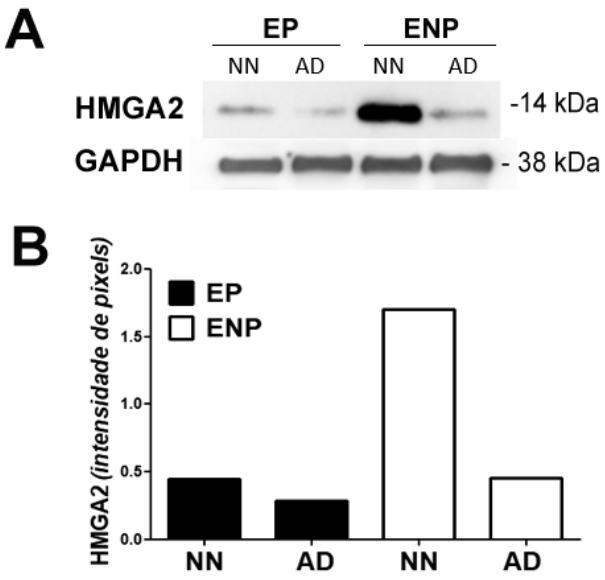

Figura 17 – Expressão proteica de HMGA2 nas células do EC. (A) Análise feita por Western Blotting para a detecção da quantidade de proteína HMGA2 expressa no Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) de animais neonatos (NN) e adultos (AD). (B) Quantificação dos pixels das bandas referentes à figura em A, feita no software Image J. kDa = quilo Dalton.

A expressão da proteína HMGA2 também foi observada em animais no estágio embrionário. HMGA2 apresentou forte marcação nos núcleos das células da margem retiniana, principalmente na região do futuro EC (Figura 18). Algumas células localizadas no EPR da periferia do olho também expressaram HMGA2. Porém, o EPR e a camada neuroblástica da porção central da retina não apresentaram expressão de HMGA2.

Nos animais neonatos, a proteína foi observada com forte marcação nuclear nas células do EC, tanto no EP quanto no ENP (Figura 19). As células HMGA2 positivas também co-expressaram a proteína Nestina na região do EC.

Animais adultos não apresentaram expressão de HMGA2 na região do EC nem da retina (Figura 20).

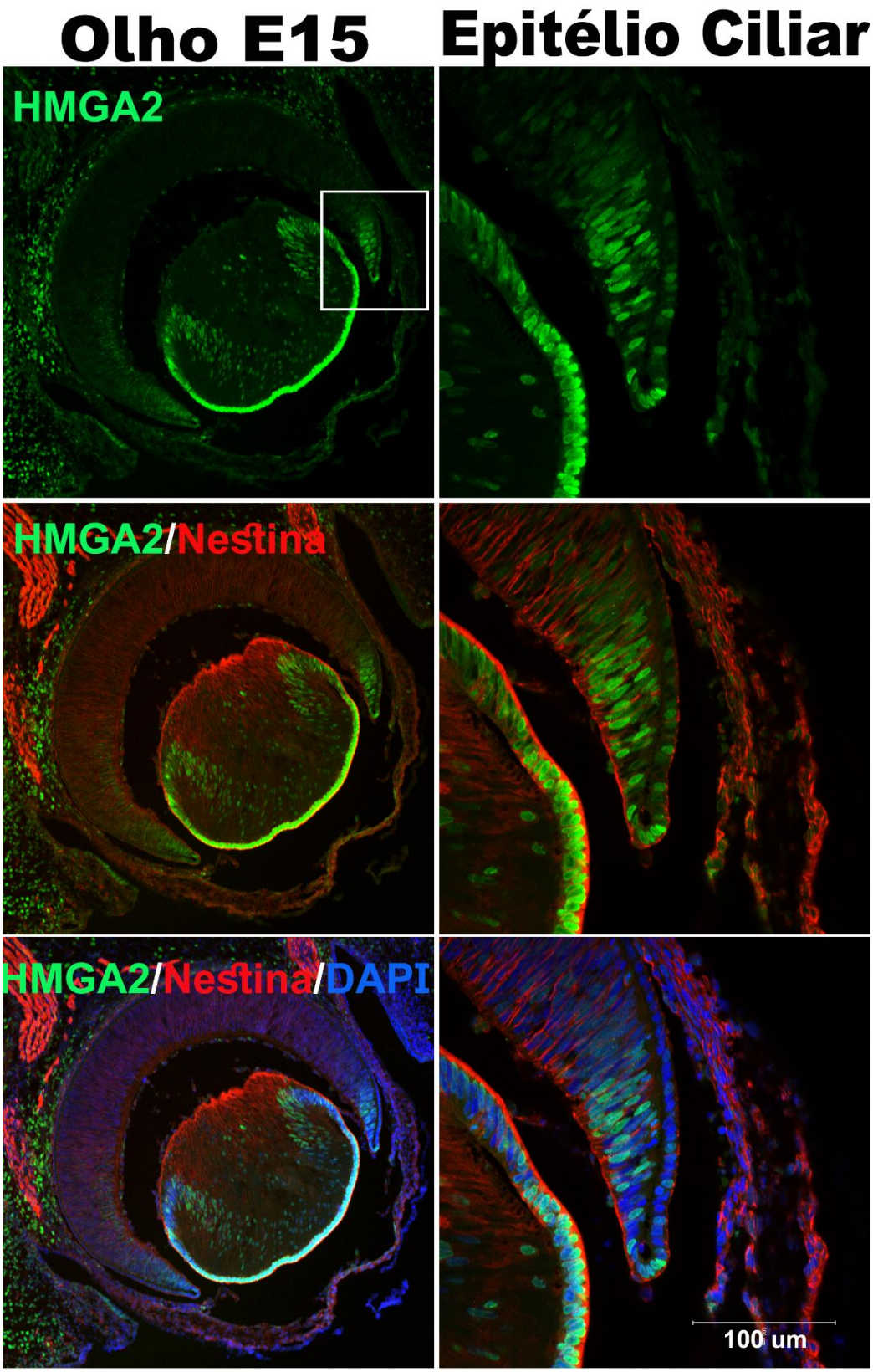

Figura 18 – Expressão de HMGA2 no olho de embrião de 15 dias. Análise imuno-histoquímica em cortes transversais de olhos de animais com 15 dias de desenvolvimento embrionário (E15) feita em microscópio confocal. As imagens da esquerda são referentes ao olho inteiro do embrião e as imagens da direita são detalhes aumentados do futuro Epitélio Ciliar (margem retiniana). HMGA2 foi marcado em verde, Nestina em vermelho e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Escala = 100µm.

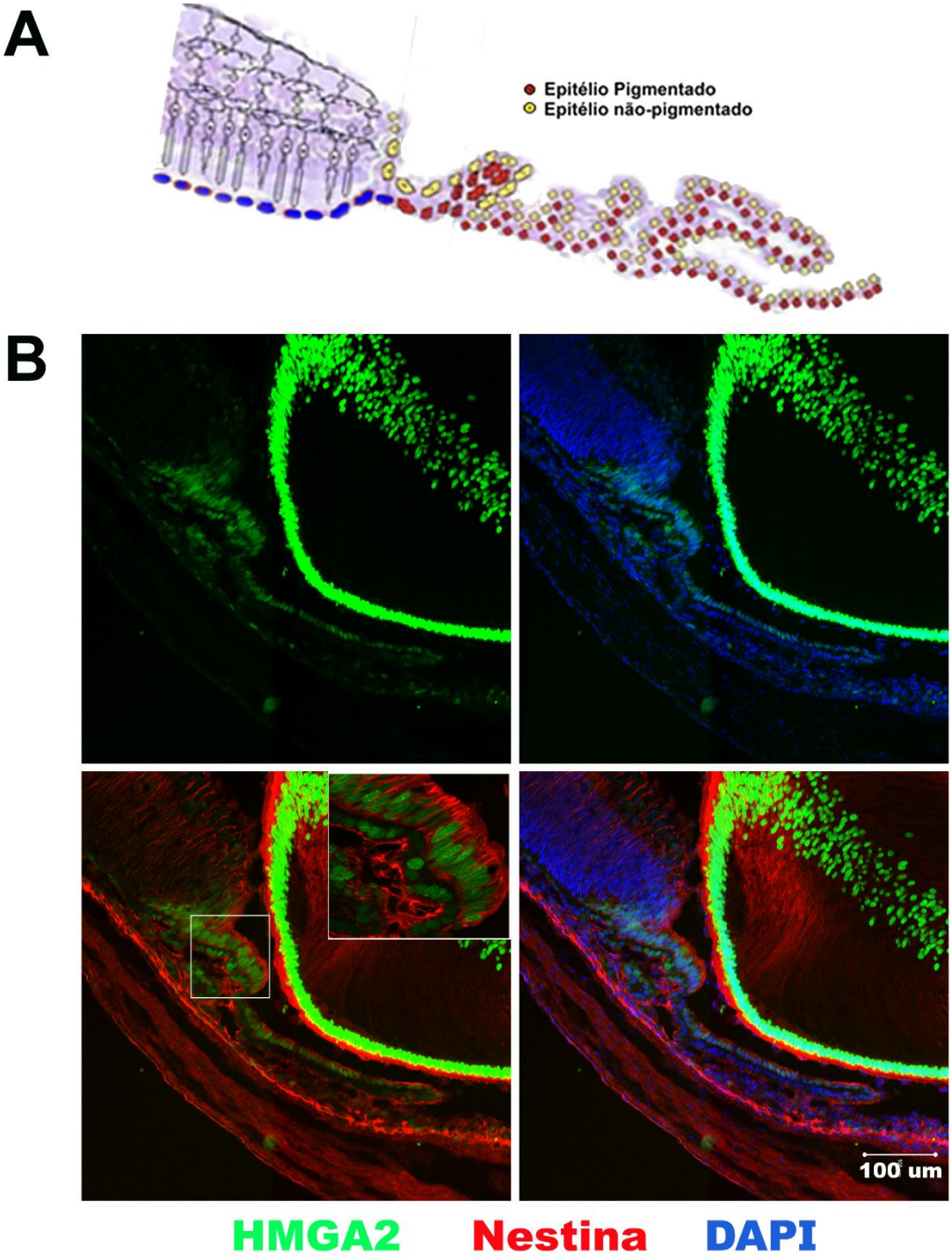

Figura 19 – Expressão de HMGA2 no olho de animais neonatos. (A) Desenho esquemático da região da Retina e Epitélio Ciliar. (B) Análise imuno-histoquímica em cortes transversais de olhos de animais neonatos feita em microscópio confocal. HMGA2 foi marcado em verde, Nestina em vermelho e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Na primeira imagem, o quadrado inserido é representativo ao aumento da região destacada. Escala = 100µm.

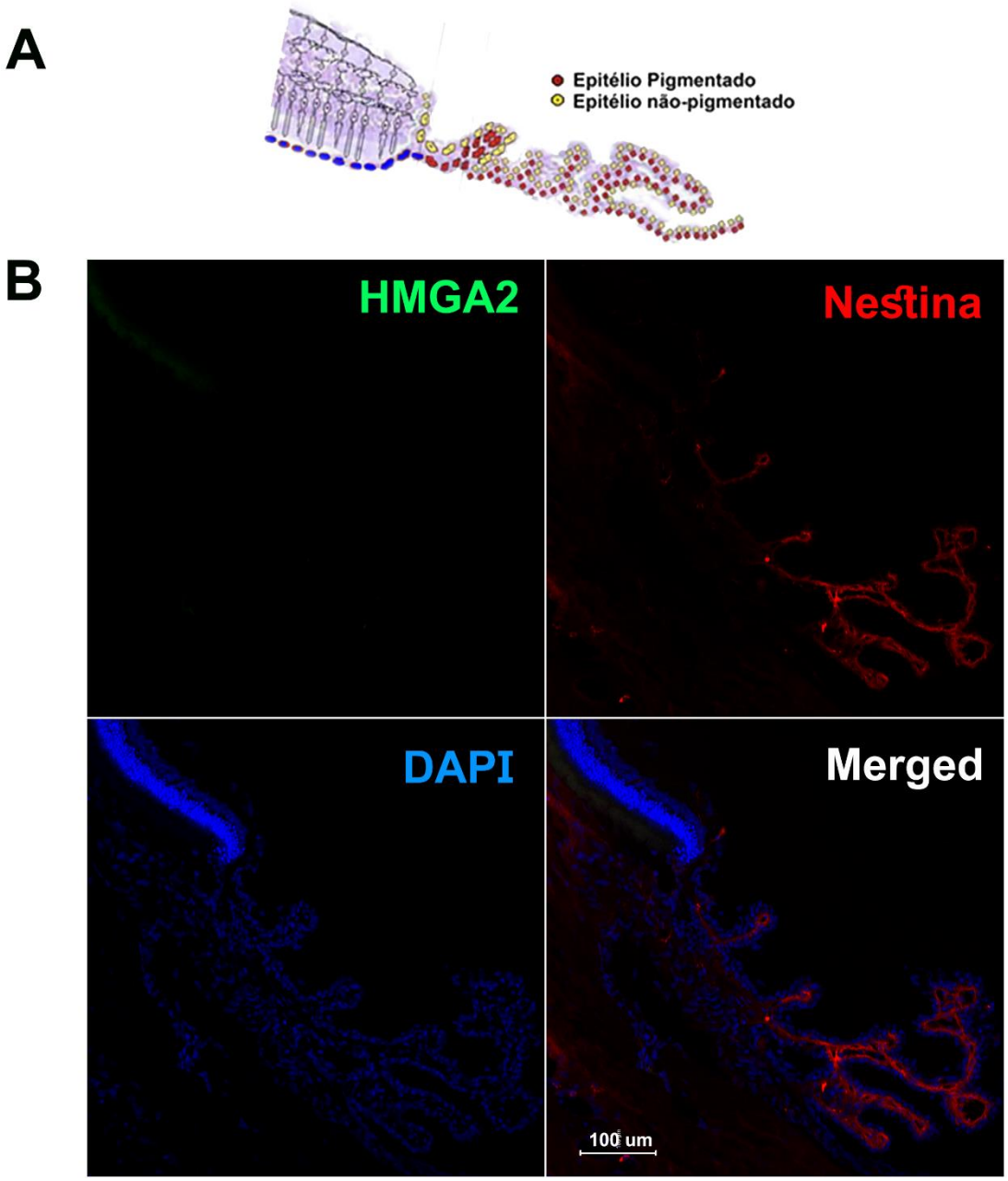

Figura 20 – Expressão de HMGA2 no olho de animais adultos. (A) Desenho esquemático da região da retina e Epitélio Ciliar. (B) Análise imuno-histoquímica em cortes transversais de olhos de animais adultos feita em microscópio confocal. HMGA foi marcado em verde, Nestina em vermelho e os núcleos foram marcados com DAPI (azul). Escala = 100µm.

4.5 Ativação das células-tronco do EC e formação de neuroesferas

Ao expor as células do EC à fatores de crescimento (EGF e FGF), as células pigmentadas (EP) diminuem a expressão de suas características diferenciadas (epiteliais) e aumentam a expressão de indicadores de células-tronco/progenitores retinianos. Com isso, inicia-se a formação de uma estrutura esférica tridimensional e composta por progenitores neurais heterogêneos, denominada Neuroesfera. Importante ressaltar que as células do ENP não são capazes de formar neuroesferas em cultura sob as mesmas condições.

Após a dissecção das células do EP de animais neonatos, as células foram mantidas em meio com fatores de crescimento por 7 dias. Ao final deste período foram identificadas algumas Neuroesferas contendo múltiplas células bem aderidas entre si, sendo cada Neuroesferas formada por clones de uma única célula-tronco original (Figura 21). As células do EP que não foram reprogramadas em células-tronco se mantiveram diferenciadas e aderidas no fundo da placa de cultivo.

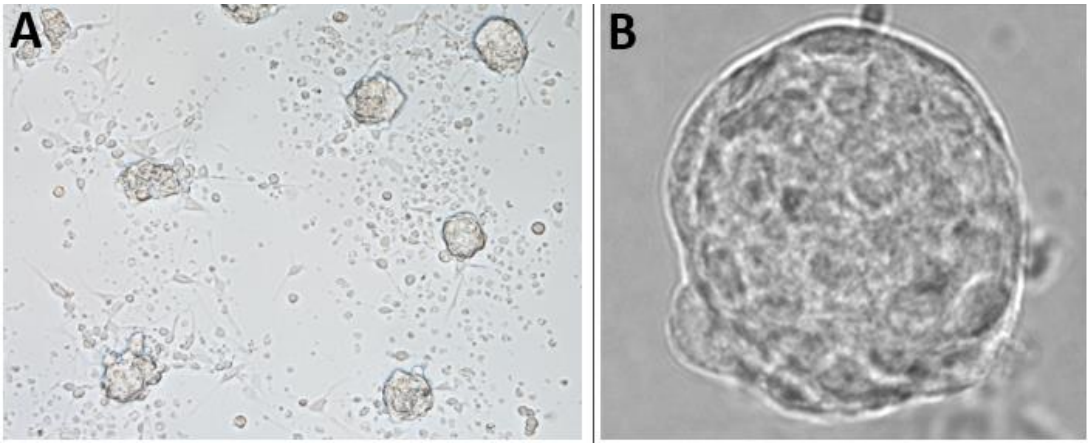

Figura 21 - Neuroesferas derivadas de células de Epitélio Pigmentado. (A) Células do EP de animais neonatos que apresentam potencial de reprogramação entram no ciclo celular na presença de fatores de crescimento (EGF e FGF) e fazem múltiplas mitoses, formando uma estrutura 3D na placa de cultivo, denominada neuroesfera. As células epiteliais que não apresentam potencial de reprogramação permanecem aderidas e diferenciadas no fundo da placa. (B) Detalhe em maior aumento de uma neuroesfera indicando a presença de várias células bem aderidas umas às outras, dificultando a identificação das bordas celulares. Aumento médio de 10x (A) e 40x (B).

4.6 Expressão de Let-7 nas Neuroesferas derivadas do EP de animais neonatos

As neuroesferas derivadas do EC de animais neonatos foram coletadas da placa após 7 dias em cultura e os miRNAs extraídos para análise por PCR em tempo real. Foram

selecionados os miRNAs Let-7b, Let-7c e Let-7e para esta análise, pois se apresentaram mais relevantes dentre os outros (Figura 22).

A expressão de Let-7b nas Neuroesferas foi semelhante à observada no EP dos animais neonatos (Neuroesferas = 5,109 ± 0,5; neonatos = 6,669 ± 0,7) (Figura 22A). Em comparação com a expressão no EP de tecido adulto, as neuroesferas apresentaram expressão significativamente mais baixa, sendo 5 vezes menos expresso (Neuroesferas = 5,109 ± 0,5; adultos = 25,41 ± 3,6).

Da mesma forma, Let-7c também apresentou expressão estatisticamente semelhante entre as células da Neuroesfera e as células do EP de neonatos (Neuroesferas = 6,682 ± 0,6; neonatos = 7,947 ± 1,9), assim como expressão maior nas células de animais adultos (Neuroesferas = 6,682 ± 0,6; adultos = 45,60 ± 8,5) (Figura 22B).

Curiosamente, Let-7e não apresentou o mesmo padrão de expressão, sendo mais expresso nas Neuroesferas e nos adultos em relação aos neonatos (Neuroesferas = 69,87 ± 7,8; neonatos = 34,03 ± 7,9; adultos = 60,40 ± 8) (Figura 22C). Estes dados serão repetidos para confirmação.

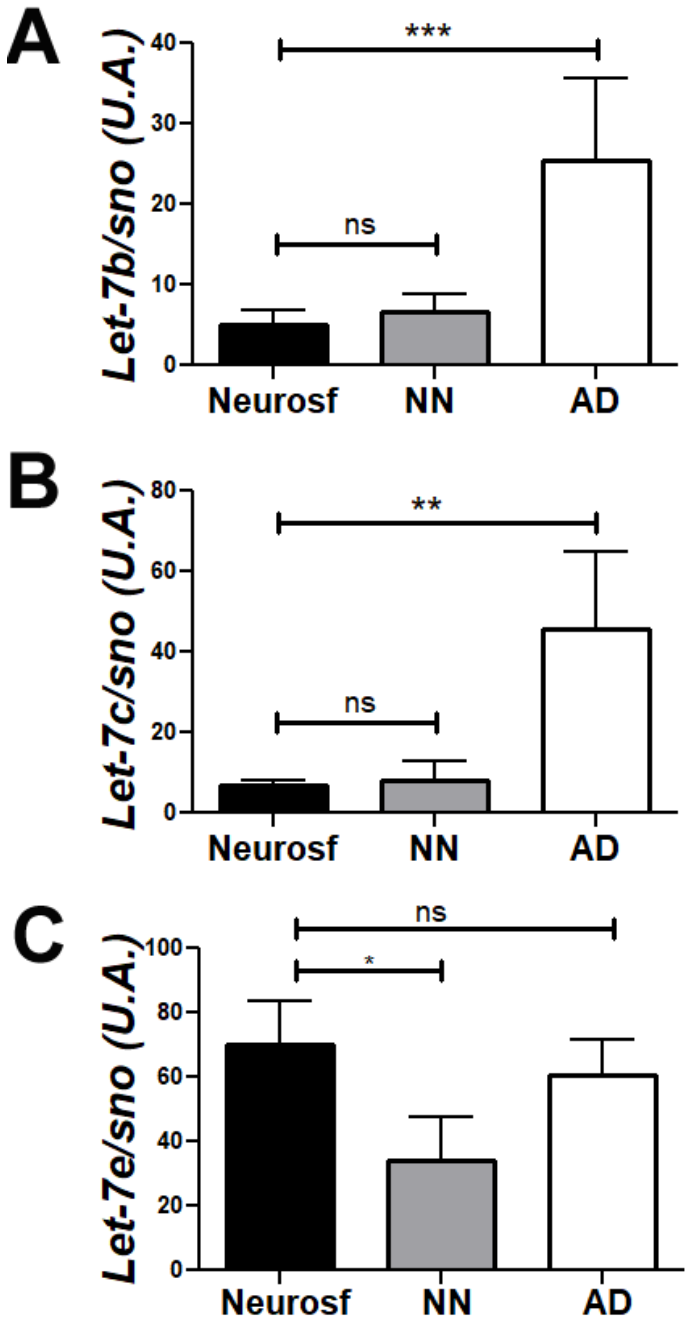

Figura 22 - Expressão dos miRNAs de Let-7b, Let-7c e Let-7e em Neuroesferas. Análise por PCR quantitativo da expressão de Let-7b (A), Let-7c (B) e Let-7e (C) nas células das Neuroesferas derivadas do EP de neonatos (Neurosf), do Epitélio Pigmentado de neonatos (NN) e Epitélio Pigmentado de animais adultos (AD). Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; **p< 0,005; ***p< 0,0005, ns = não significativo.

4.7 Expressão transcricional de Lin-28a, Lin-28b e HMGA2 nas Neuroesferas

A análise por PCR em tempo real indicou que as células das Neuroesferas expressaram mais transcritos de Lin-28a comparadas com as células de neonatos e de adultos (Neuroesferas = 0,004588 ± 0,0009; neonatos = 0,0009708 ± 4,920e-005; adultos = 0,0003713 ± 3,434e-005) (Figura 23A).

Em contrapartida, Lin-28b foi mais expresso nas células dos animais neonatos em comparação com as células que foram reprogramadas em Neuroesferas (Neuroesferas = 0,001785 ± 0,0003; neonatos = 0,002749 ± 0,0002) (Figura 23B).

A expressão de HMGA2 apresentou um padrão similar à expressão de Lin-28a. Observou-se mais HMGA2 nas Neuroesferas provenientes do EP em relação aos neonatos e adultos, sendo a expressão nas Neuroesferas aproximadamente 10 vezes maior em relação aos neonatos (Neuroesfera = 0,001924 ± 0,0001; neonato = 0,0001796 ± 2,301e-005; adulto = 8,350e-007 ± 2,421e-007) (Figura 23C).

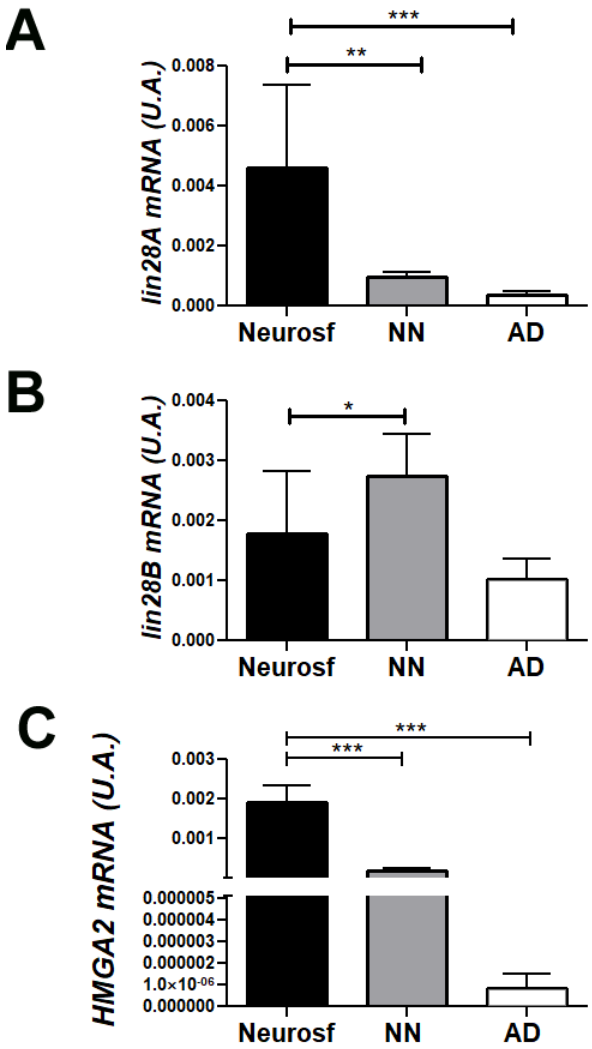

Figura 23 - Expressão transcricional de Lin-28a, Lin-28b e HMGA2. Análise por PCR quantitativo da expressão dos transcritos de Lin-28a (A), Lin-28b (B) e HMGA2 (C) nas células das Neuroesferas derivadas de EP de neonatos (Neurosf), do Epitélio Pigmentado de neonatos (NN) e Epitélio Pigmentado de animais adultos (AD). Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; **p< 0,005; ***p< 0,0005.

4.8 Padronização da transfecção dos agentes miméticos e inibitórios de Let-7

Para compreender a atividade dos miRNAs Let-7b, Let-7c e Let-7e nas células do EC e sua participação na reprogramação das células progenitoras, expusemos as células do EP a pequenas cadeias de RNAs sintéticos confeccionados para mimetizar o precursor endógeno de Let-7b, Let-7c ou Let-7e (Mimic) induzindo sua super-expressão, ou para ligar e inibir a atividade destes miRNAs (inibidor).

Diferentes concentrações dos agentes customizados do inibidor (10, 50 e 100 nM) e do mimetizador (5, 10 e 30 nM) específicos foram testadas por um período de 48 horas para cada miRNA selecionado, de acordo com indicação do fabricante (Figura 24).

Nossos dados indicaram que a concentração mais eficiente do agente mimetizador de Let-7b foi de 5 nM, enquanto a concentração mais eficiente do agente inibidor deste miRNA foi de 10 nM (Figura 24A), reduzindo sua expressão em relação ao controle. Para o Let-7c a melhor concentração do agente mimetizador foi de 30 nM e a melhor do agente inibidor foi de 10 nM (Figura 24B). Por fim, para o Let-7e a melhor concentração de mimetizador foi de 5 nM e de inibidor foi de 30 nM (Figura 24C). Apesar de serem chamados de agentes inibidores, não se obteve a inibição completa da expressão de nenhum miRNA testado, sendo configurado uma diminuição de sua expressão ao invés de uma inibição.

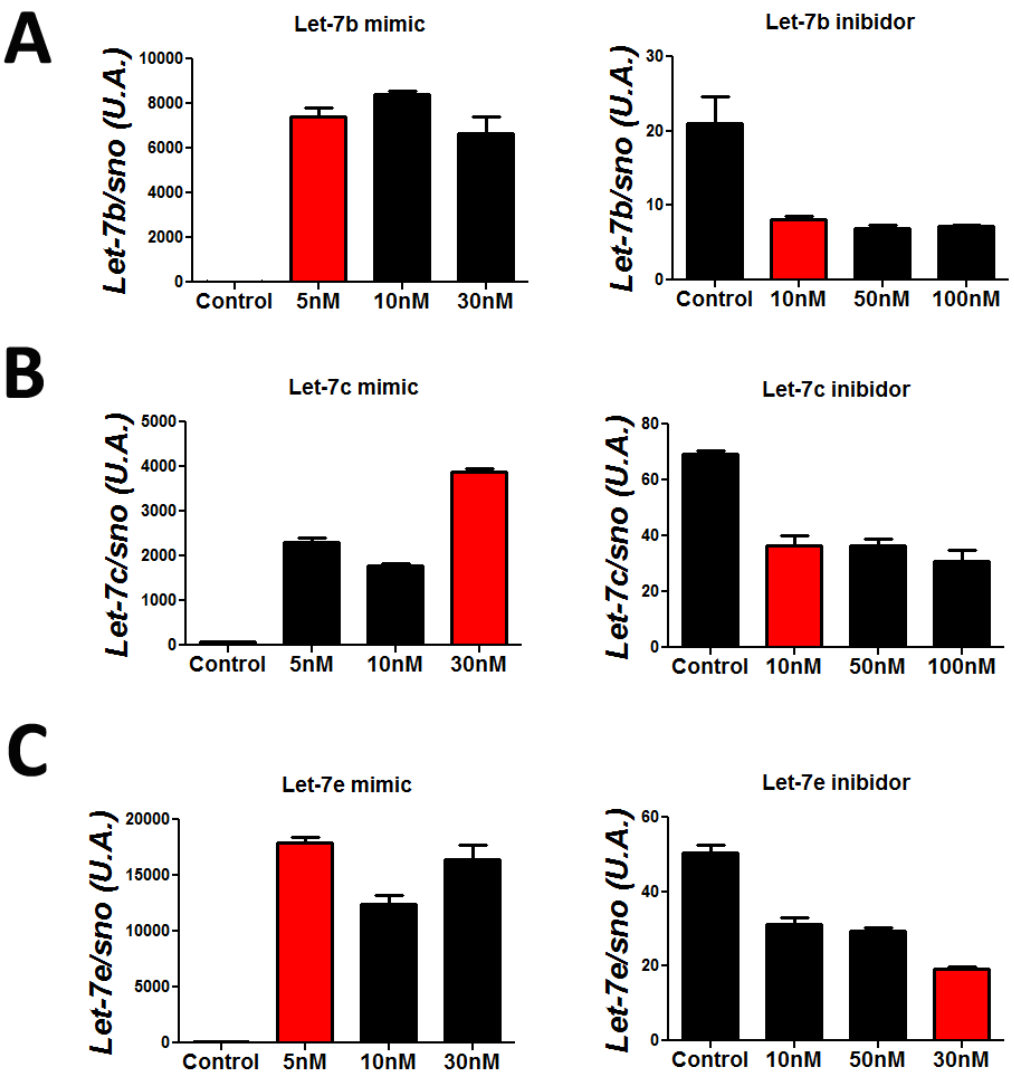

Figura 24 - Padronização das concentrações dos agentes mimetizadores e inibidores de Let-7b (A), Let-7c (B) e Let-7e (C) em cultura de células do EP. As células foram expostas aos agentes e a expressão transcricional de Let-7 em animais adultos foi analisada por PCR quantitativo após 48hs. As concentrações de interesse estão destacadas em vermelho. U.A. = Unidade Arbitrária.

Em seguida, realizamos a padronização da concentração do agente de transfecção Lipofectamina.

Diferentes concentrações de Lipofectamina foram testadas nas células do EP em cultura (1, 2 e 5 µM). Para detectar o efeito deste agente sobre a viabilidade celular, utilizou-se o ensaio de MTT ({brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]} nessas amostras após 7 dias em cultura, onde células não expostas à Lipofectamina foram consideradas como controle (Figura 25). Nesse ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido utilizado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

A concentração de 1 µM apresentou leve redução na viabilidade celular, porém menos que as demais concentrações, sendo escolhida para as próximas análises.

Em seguida, estudamos a expressão dos transcritos de caspase 3 nas células do EP após o tratamento com 1 µM de Lipofectamina, que indicou não induzir alteração na expressão dos transcritos após sua exposição (Figura 26).

Por fim, a eficiência de transfecção foi avaliada pelo método indireto, através da incorporação do oligonucleotídeo fluorescente SiGLO (GFP), que apresentou confirmação visual de incorporação a partir de 48 horas da sua exposição, até 7 dias após o início da cultura (Figura 26).

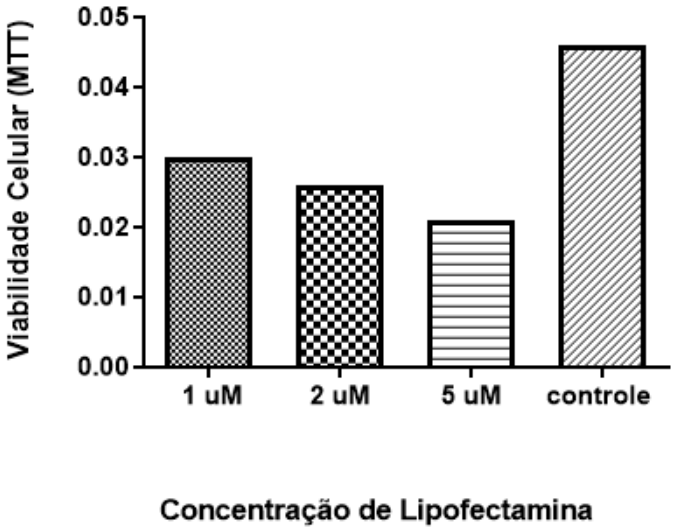

Figura 25 - Ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]) após exposição das células do Epitélio Ciliar a diferentes concentrações do agente de transfecção Lipofectamina. Amostra controle não foi exposta à Lipofectamina. Gráfico representativo de 2 experimentos individuais e independentes.

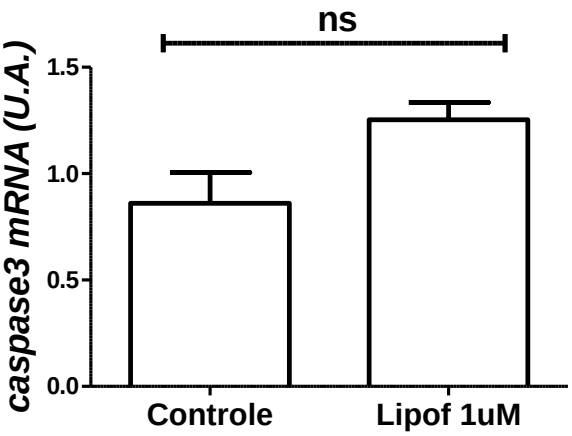

Figura 26 – Expressão de *caspase3* após tratamento com Lipofectamina. PCR quantitativo feito para análise da expressão dos transcritos de caspase3 após tratamento das células do EP com 1 µM de Lipofectamina em cultura.

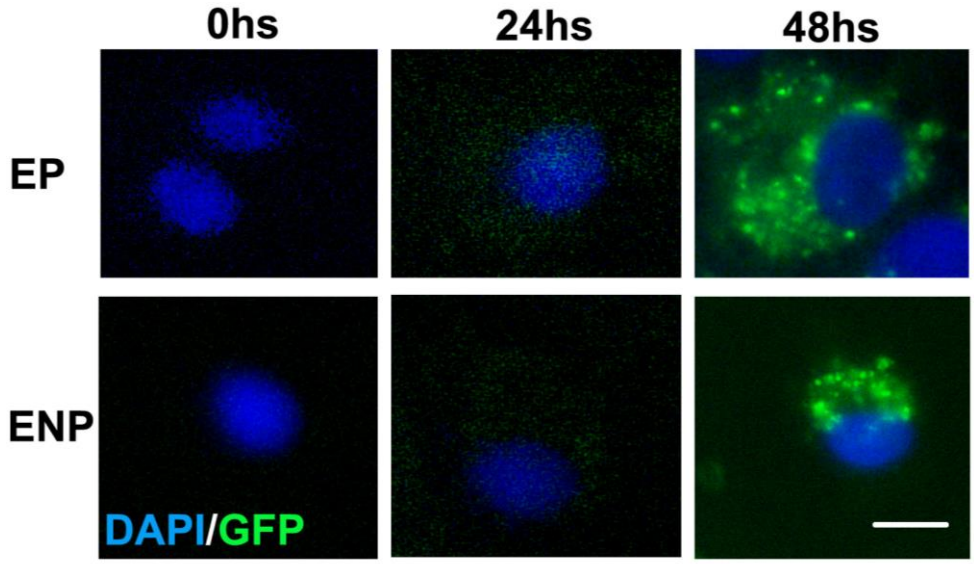

Figura 27 –Análise indireta da eficiência da transfecção por SiGLO. Células do Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP) foram transfectadas com oligonucleotídeo fluorescente SiGLO (GFP) por 6-8 horas e a intensidade de fluorescência observada após 24 e 48hs da transfecção, indicando maior intensidade de expressão de GFP a partir de 48hs. Escala 10µm.

4.9 Expressão de Let-7 após tratamento com mimetizadores e inibidores específicos

Após 7 dias em cultura e da exposição aos agentes mimetizadores e inibidores específicos de Let-7b, Let-7c e Let-7e, fizemos a análise por PCR em tempo real para a expressão destes miRNAs.

Observamos que, mesmo após 7 dias da exposição e a presença dos fatores de crescimento, os 3 miRNAs encontraram-se super expressos nos grupos tratados com os respectivos agentes mimetizadores (Figura 28).

Os grupos tratados com os inibidores de Let-7b e Let-7c apresentaram menor expressão significativa em comparação aos respectivos grupos controles (Figura 28A e B).

Os grupos tratados com o agente inibidor de Let-7e indicaram maior expressão deste miRNA após a exposição ao agente inibidor, sugerindo que, ao final de 7 dias de cultura e após sua inibição inicial eficiente (vide Figura 24C), as células do EP aumentaram sua expressão de Let-7e por algum mecanismo compensatório ou rebote, por exemplo.

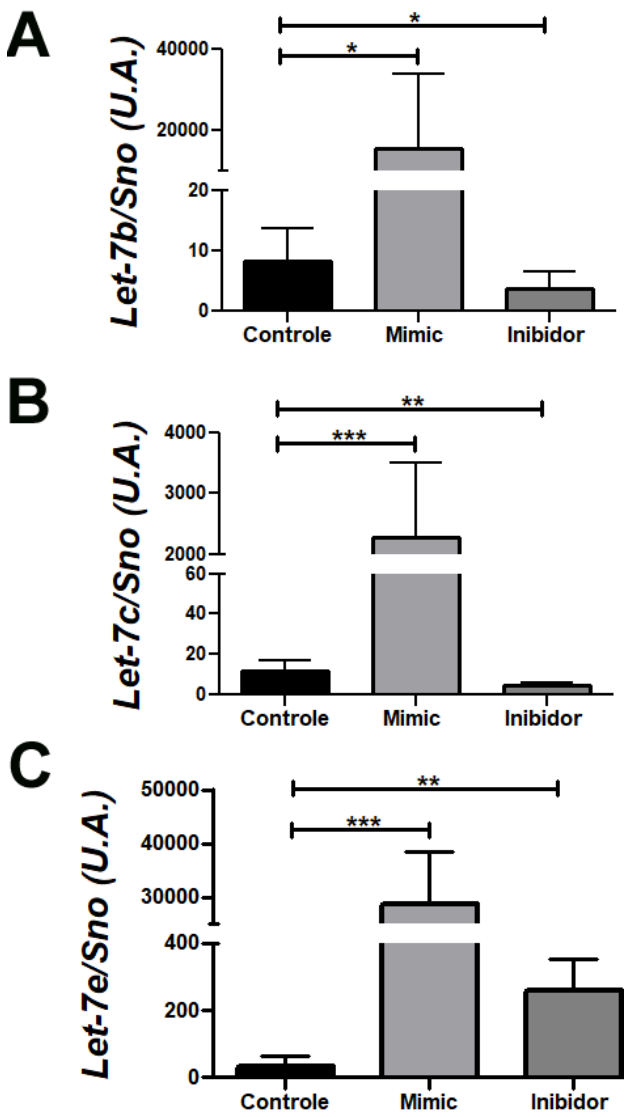

Figura 28 - Expressão dos miRNAs de Let-7b, Let-7c e Let-7e após manipulação. Análise por PCR quantitativo da expressão de Let-7b (A), Let-7c (B) e Let-7e (C) nas células da Neuroesfera derivadas de EP após 7 dias em cultura na presença dos agentes mimetizadores (Mimic) e inibidores dos miRNAs específicos. Os controles foram realizados apenas com o agente de transfecção Lipofectamina. Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; **p< 0,005; ***p< 0,0005.

4.10 Efeito da ativação e inibição de Let-7 na formação de neuroesferas

Os agentes miméticos e inibidores foram aplicados às células do EC no primeiro dia de indução de reprogramação pelos fatores de crescimento. Após 7 dias em cultura, as Neuroesferas foram quantificadas, medidas e separadas em grupos conforme seu tamanho (até 20 µm, 20 µm, 50 µm, 100 µm ou maiores de 100 µm) (Figura 29).

Em todos os grupos e tratamentos estudados, observamos uma predominância de neuroesferas de tamanho menor que 20 µm em comparação com os outros tamanhos. Neste grupo, os tratamentos com os inibidores de Let-7b e Let-7c estimularam a formação de maior quantidade de neuroesferas em comparação com os demais grupos controle e tratados com agente mimetizador.

As neuroesferas de tamanho intermediário (de 20 a 50 µm) também apresentaram maiores quantidades após o tratamento com o inibidor de Let-7e em comparação com os grupos controle e mimetizador de Let-7e. Essa diferença não foi observada após a manipulação dos outros miRNAs.

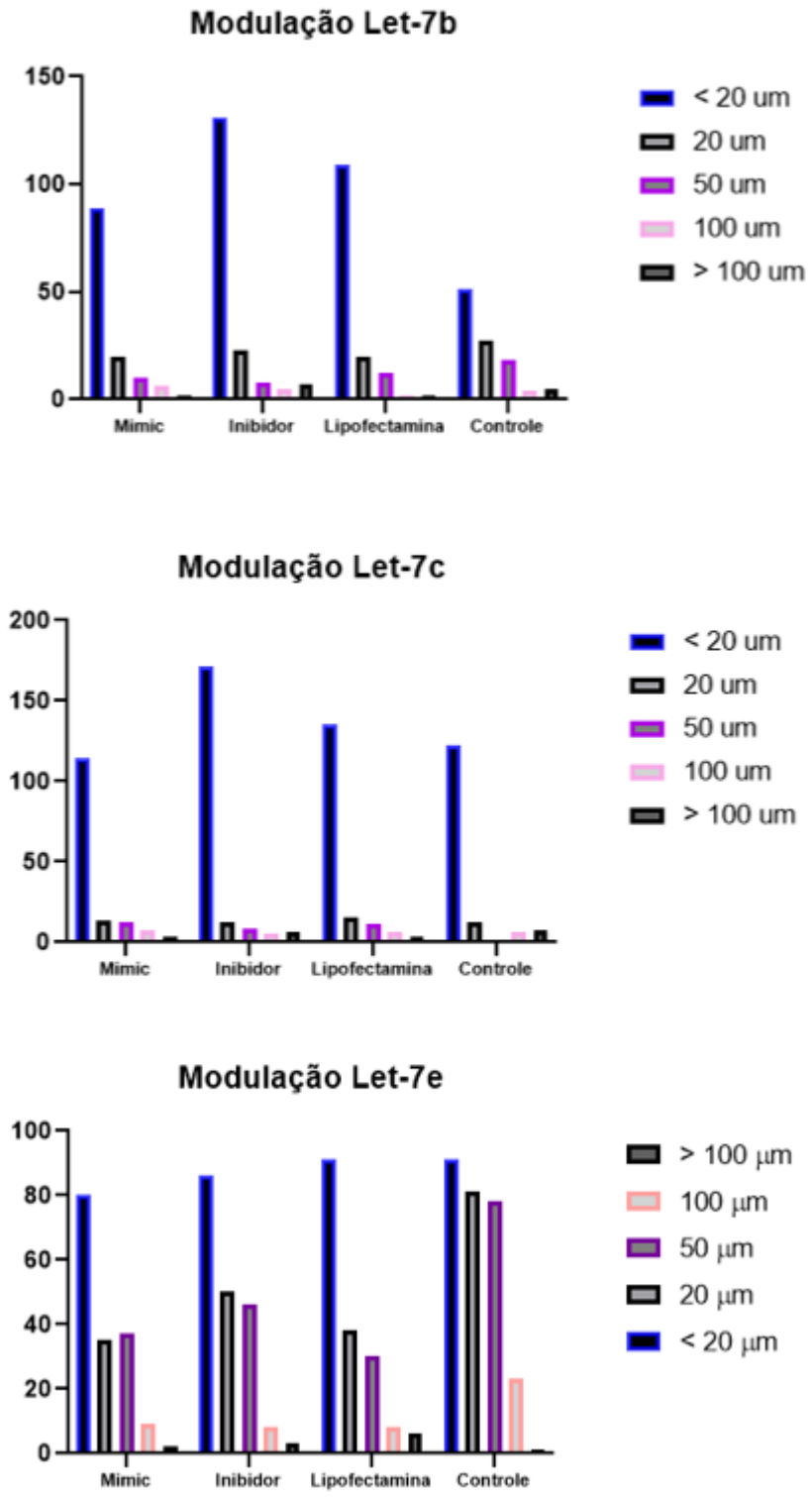

Figura 29 – Efeito da manipulação de Let-7 na formação das neuroesferas. Contagem de Neuroesferas por tamanho em 5 campos aleatórios diferentes após aumento de expressão por agente mimetizador (Mimic) ou inibição dos miRNAs Let-7b, Let-7c e Let-7e. Gráficos representativos a partir de 4 experimentos diferentes e independentes para cada miRNA.

4.11 Manipulação de Let-7 e efeito na expressão de Lin-28 e HMGA2

Nossos últimos experimentos foram focados no estudo das consequências do aumento e da diminuição de Let-7 na expressão transcricional de Lin-28a, Lin-28b e HMGA2 em culturas de Neuroesferas (Figura 30).

Ao manipular Let-7b, observamos um efeito significativo na expressão de HMGA2, que foi mais expresso após a inibição de Let-7b (controle = 0,0953 ± 0,009; Mimic = 0,0704 ± 0,005; inibidor = 0,2233 ± 0,04). Não foram observadas diferenças significativas na expressão de Lin28a e Lin28b após ativação ou inibição de Let-7b.

A super expressão de Let-7c, mas não sua inibição, induziu um aumento significativo na expressão dos transcritos de Lin28a (controle = 0,000188 ± 8,544e-006; Mimic = 0,001047 ± 6,806e-005; inibidor = 0,0002263 ± 2,906e-006). Nenhum efeito foi observado na expressão de Lin28b ou HMGA após a super expressão ou inibição de Let-7c.

Por fim, a inibição de Let-7e foi capaz de diminuir a expressão dos transcritos de Lin28a (controle = 2,697e-005 ± 5,720e-006; Mimic = 1,783e-005 ± 3,125e-006; inibidor = 9,937e-006 ± 1,505e-006), assim como aumentar significativamente a expressão dos transcritos de HMGA2 (controle = 0,02848 ± 0,002; Mimic = 0,0264 ± 0,004; inibidor = 0,05267 ± 0,004). Não foram observadas diferenças estatísticas na expressão dos transcritos dos demais grupos após a manipulação de Let-7e.

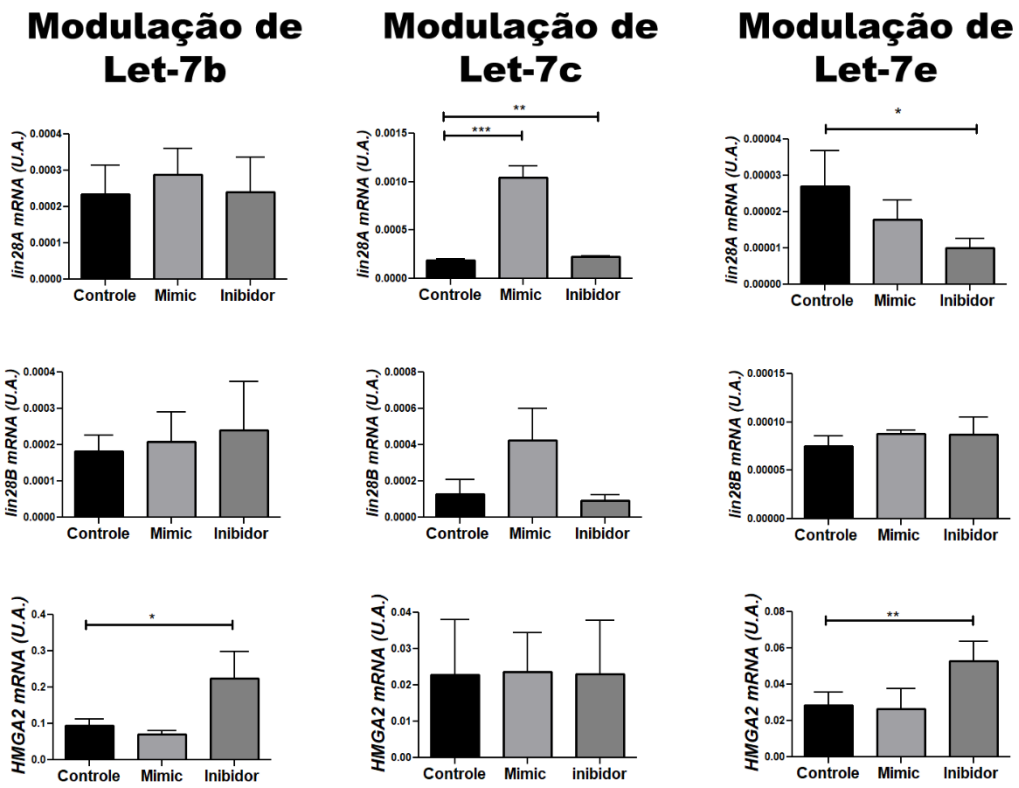

Figura 30 - Expressão de Lin28 e Hmga2 após manipulação de Let-7. Análise por PCR quantitativo da expressão de Lin28a, Lin28b e Hmga2 nas células das Neuroesferas derivadas de EP após a ativação específica de Let-7b, Let-7c e Let-7e (Mimic) ou sua inibição. Os controles foram realizados apenas com o agente de transfecção Lipofectamina. Resultados apresentados em média ± erro padrão. U.A. = Unidade Arbitrária. *p< 0,05; **p< 0,005; ***p< 0,0005. Estatística não apresentada indica ausência de significância.

5. DISCUSSÃO

Fortes evidências indicam os miRNAs da família Let-7 como importantes reguladores de processos envolvidos com diferenciação, envelhecimento e senescência celular (LASER; LEE; WEI, 2010). Diferentes estudos mostraram que a diminuição dos níveis de Let-7 no plasma de pacientes pode ser um indicador de presença de tumores, como de pulmão, gástrico, ovariano e de mama, podendo ser usados como biomarcadores destas patologias (CHIRSHEV et al., 2019). Em contrapartida, a presença destes miRNAs pode ter efeito de supressor tumoral (JOHNSON et al., 2007).

Da mesma forma que Let-7 está diminuído em células tumorais, ele também não é expresso em células-tronco (HOUBAVIY; MURRAY; SHARP, 2003; WULCZIN et al., 2007). Sua expressão induzida em células-tronco foi capaz de suprimir a capacidade de auto-renovação de células-tronco neurais (NISHINO et al., 2008).

Na retina, os miRNAs da família Let-7 estão associados com a diferenciação dos tipos celulares e são responsáveis por manterem as células gliais de Müller diferenciadas após um estímulo de lesão, dificultando sua entrada no ciclo celular e reprogramação (RAMACHANDRAN et al., 2010). Os miRNAs da família Let-7 na retina são conhecidos pela atuação na supressão de genes progenitores e pluripotentes, expressando sítios de ligação para genes fundamentais para a regeneração retiniana, como c-Myc, ascl1a, lin-28, pax6a, pax6b, mps1e hspd1 (FAUSETT; GUMERSON; GOLDMAN, 2008; QIN; BARTHEL; RAYMOND, 2009; THUMMEL et al., 2010).

Aqui, mostramos que as células diferenciadas do Epitélio Ciliar expressam estes miRNAs da família Let-7, em especial, as células do Epitélio Não-Pigmentado, que não apresentam características progenitoras retinianas quando estimuladas com fatores de crescimento. Devido à natureza inibitória destes miRNAs sobre genes relacionados com proliferação e pluripotência, sugerimos que a alta expressão de Let-7 nas células do ENP possa ser o fator de contenção desta capacidade.

No EC de animais neonatos estes miRNAs são pouco expressos, aumentando sua expressão ao longo do amadurecimento celular. Em neonatos, muitas células progenitoras não diferenciadas ainda estão presentes na retina e EC.

A baixa expressão de Let-7 em animais em estágios embrionários e neonatos é observado em diversas espécies de vertebrados e invertebrados, como nos estágios larvais de *C.elegans* e *Drosophila*, e embriões de zebrafish (PASQUINELLI et al., 2000). Em *C.elegans* em estágios larvais, as funções de Let-7 estão relacionadas com a baixa expressão de genes alvos

relacionados com a regulação de estágios específicos do desenvolvimento (ROUGVIE, 2001). Por exemplo, Let-7 começa a acumular na larva destes animais ao final do terceiro estágio larval, o que acarreta na baixa expressão de Lin-41, um conhecido alvo de Let-7 e responsável pela regulação do fator de transcrição pró-diferenciação EGR1 (também conhecido como NGFI-A, KROX-24, ZIF268 ou TIS8). A regulação negativa de Lin-41 por Let-7 libera a atividade de EGR1 e a expressão de genes que estimulam a diferenciação celular (WORRINGER et al., 2014).

Assim como nos invertebrados, a família Let-7 tem um papel importante no período terminal de diferenciação no desenvolvimento de vertebrados (PASQUINELLI et al., 2000). Aqui, observamos que as células do EP apresentaram menor expressão de Let-7 em comparação com o ENP. Essa pequena diferença de expressão pode ser suficiente para impedir completamente a reprogramação das células do ENP em células-tronco e permitir a parcial reprogramação das células do EP.

Ao reprogramar as células do EP em Neuroesferas, as células se desdiferenciam em células-tronco/progenitores retinianos através da indução feita por fatores de crescimento. Nesta condição, observamos que os miRNAs Let-7b e Let-7c também apresentaram baixa expressão em comparação aos tecidos de animais adultos. Em linhagens celulares de células-tronco embrionárias de camundongos, Let-7 regula negativamente os alvos de Pou5f1/Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 e Myc, o que acarreta na diferenciação das células-tronco embrionárias (MELTON; JUDSON; BLELLOCH, 2010).

As células-tronco utilizam mecanismos de proliferação e crescimento celular semelhantes às células tumorais. Diversos tecidos tumorais regulam negativamente a expressão de membros da família Let-7 para reativar os genes pró-proliferativos. Trabalhos que investigaram alguns tipos de câncer de pulmão observaram que os níveis de expressão de Let-7 estavam baixos em relação a indivíduos normais, assim como sua super expressão em linhagens de adenocarcinoma de pulmão mostrou uma inibição do crescimento das células cancerígenas (TAKAMIZAWA et al., 2004), sugerindo Let-7 como agente supressor de tumor. Let-7 também já foi descrito regulado negativamente em linhagens de câncer colorretal, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma gástrico, câncer de pâncreas, câncer de ovário, câncer de próstata, linfoma de Burkitt, carcinoma de célula renal e melanoma (JIANG et al., 2005; WANG et al., 2015).

Por ser um fator importante na diferenciação celular, a expressão dos miRNAs da família Let-7 deve ser regulada e controlada pelo organismo. Nesse aspecto, a proteína Lin28 é conhecida como um importante mecanismo de controle da expressão de Let-7 (REHFELD et al., 2014). Lin28 é uma proteína ligante de RNA e está fortemente presente em células-tronco

e células indiferenciadas, desempenhando o papel de manter a expressão de genes específicos de pluripotência (MOSS; TANG, 2003; RAMACHANDRAN et al., 2010). Desta forma geral, Lin28 está associada com a capacidade regenerativa de uma célula ou tecido (SHYH-CHANG et al., 2013).

Essa proteína desempenha esse papel através da interferência direta na maturação funcional de Let-7. Análises de mutações e ensaios de competição revelaram que Lin28 se liga ao pré-Let-7 em uma região denominada de elemento precursor (preE), localizada na região da alça do *hairpin* (HEO et al., 2008; NEWMAN; THOMSON; HAMMOND, 2008; NAM, 2011), importante região para a maturação do pre-Let-7 (HEO et al., 2009). Análises estruturais também mostraram que a ligação de Lin28 ao Let-7 denatura parcialmente a estrutura da alça na região onde a enzima *Dicer* atua, impedindo que Let-7 atinja a forma madura funcional (HUTVÁGNER et al., 2001; ZHANG et al., 2002; HEO et al., 2008; RYBAK et al., 2008; NAM, 2011; MAYR et al., 2012).

Sabe-se que Lin28a e Lin28b apresentam sua expressão reduzida ao longo do desenvolvimento retiniano (XIA; TEOTIA; AHMAD, 2018). Nossos dados também mostraram que Lin28b diminuiu significativamente no EC durante o desenvolvimento tecidual, sendo mais expressos nos primeiros dias de vida do animal e diminuindo até chegar nos estágios adultos. Lin28a apresentou padrão semelhante nas células do EP, mas não nas células do ENP.

Lin28 a e Lin28b podem facilitar a proliferação das células progenitoras retinianas e sua deleção durante a os estágios precoces da histogênese pode levar ao amadurecimento prematuro das células de Müller (XIA; TEOTIA; AHMAD, 2018). Sua expressão ectópica também pode converter as células de Müller para um fenótipo neural, indicando sua importante função na regulação das células progenitoras retinianas (XIA; TEOTIA; AHMAD, 2018).

Assim como nos progenitores retinianos, Lin28a foi observado mais expresso nas neuroesferas em relação às células de animais neonatos e Lin28b apresentou expressão semelhante à encontrada nos neonatos. Nossos dados sugerem que Lin28a possa participar da regulação dos progenitores retinianos mais precoces e que Lin28b esteja envolvido na regulação dos progenitores tardios.

Um dos alvos mais conhecidos da família Let-7 de miRNA é a proteína HMGA2, uma proteína responsável pela regulação transcricional de genes de controle da proliferação e diferenciação celular. Em diversos tipos celulares, a expressão de Let-7 é inversamente proporcional à expressão de HMGA2 e a expressão ectópica dessa proteína promove a proliferação celular, mesmo na presença de Let-7 (LEE; DUTTA, 2007). Animais knockout para HMGA2 apresentam o desenvolvimento muscular e a proliferação de mioblastos

reduzidos, enquanto a sua super expressão promove o crescimento dos mioblastos e previne sua diferenciação (LI et al., 2012). Em células progenitoras neurais, knockouts de HMGA1 e HMGA2 apresentam a condensação da cromatina e diferenciação astrocitária precoce (KISHI et al., 2012).

Neste trabalho, observamos que a expressão de HMGA nas células do EC também foi inversamente proporcional à expressão de Let-7, sendo aumentada em animais neonatos e diminuída nas idades adultas. HMGA2 apresenta expressão diminuída em diversos tecidos em diferenciação (CHIAPETTA et al., 1996; ROGALLA et al., 1996). Essa diminuição é importante para o controle de neoplasias, onde sua expressão se observou aumentada, como por exemplo, em câncer de tireoide, mama e pulmão (CHIAPETTA et al., 1998; FLOHR et al., 2003; SARHADI et al., 2006)

Nas neuroesferas derivadas de EP, observamos que HMGA2 está altamente expresso, em maior quantidade comparado às células de neonatos, o que sugere que este fator esteja envolvido na regulação da função de células-tronco destas células. Em células-tronco embrionárias, a expressão de HMGA é associada à condição de pluripotência, como NANOG, Oct4 e Sox2, sendo considerada um agente regulador chave de pluripotência (SHAH et al., 2012). Essa proteína é observada nas células-tronco hematopoiéticas, células-tronco intestinais, em mioblastos esqueléticos, essenciais para a proliferação e ativação das células satélite, além de outros tipos de células-tronco (CHAU et al., 2003; CHOU et al., 2011; XIAN et al., 2017).

Nossos resultados sobre o efeito da ativação e inibição de Let-7 nas culturas de neuroesferas foram interessantes. Como o esperado, a inibição de Let-7b e Let-7e aumentaram a expressão dos transcritos de HMGA2, seu importante alvo. Esse efeito não foi observado após a inibição de Let-7c, sugerindo que, no nosso modelo, esse miRNA não atue primariamente sobre HMGA2.

Em contrapartida, Lin28b não foi modulado na presença ou ausência de nenhum dos miRNAs estudados. Estes resultados sugerem que a regulação *downstream* de Let-7 não interfere com sua expressão.

Lin28a apresentou resultados controversos. A super expressão de Let-7c induziu aumento na expressão dos transcritos de Lin28a. Em contrapartida, a diminuição na expressão de Let-7e também diminuiu a expressão de Lin28a. Estes resultados sugerem a possível presença de um mecanismo compensatório, sendo a expressão desses dois fatores diretamente relacionados entre si, onde o balanço de expressão deva ser ajustado para manter uma expressão equilibrada entre Lin28a e Let-7. Porém, mais experimentos são necessários para a análise dessa hipótese.

Os efeitos da modulação de Let-7 sobre HMGA2 podem ter influência direta sobre os resultados obtidos quanto à quantidade e tamanho das neuroesferas. Na presença dos inibidores, maior quantidade de neuroesferas de tamanhos específicos foram observadas, sugerindo que estes agentes regularam positivamente o ciclo celular das células-tronco progenitoras retinianas.

Em modelo experimental de células de câncer de bexiga observou-se um padrão semelhante ao observado nas Neuroesferas do EC, em que após a super-expressão de Let-7i houve uma supressão da proliferação e migração celular (QIN et al, 2019). Da mesma forma, a inibição de Let-7e em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço demonstrou um aumento na proliferação e migração celular (WANG et al, 2019). Estudos mostraram que, durante a diferenciação celular, Let-7a1, Let-7a2, Let-7d, Let-7f2 e Let-7i foram ativos em vários tipos celulares e transcritos constitutivamente, enquanto Let-7a3, Let-7b, Let-7c, Let-7e e Let-7g demonstram uma transcrição mais dinâmica (GAETA et al., 2017), reforçando a ação combinada destes miRNAs e efeitos diferentes sobre o comportamento celular.

Aqui, acreditamos ser possível que a inibição combinada dos 3 miRNAs estudados possa oferecer um efeito mais significativo sobre a proliferação das células-tronco/ progenitoras retinianas, assim como sobre a expressão de Lin28 e HMGA2.

6 CONCLUSÃO

Uma vez que os miRNAs da família Let-7 apresentam importante funções relacionadas ao controle de diferenciação e das funções de células-tronco retinianas, seu estudo nas células do EC se torna fundamental, pois estas células são conhecidas por serem potenciais fontes de células-tronco retinianas.

Neste trabalho mostramos que as células do EC expressam baixas concentrações de Let-7 nos animais neonatos e que essa expressão se torna aumentada ao longo do desenvolvimento do animal. Em contrapartida, observamos expressão inversa dos agentes controladores (Lin28) e de seu alvo direto (HMGA2), importantes mecanismos regulatórios das funções das células-tronco.

A manipulação experimental de Let-7 nas células das Neuroesfera indicou que estes miRNAs, apesar de semelhantes, desempenham funções individuais e específicas sobre as células progenitoras retinianas.

O controle da expressão de Let-7 é uma ferramenta que está sendo preparada para ser usada como adjuvante aos tratamentos quimioterápicos atuais em diversos tipos de câncer. Seu uso também pode trazer grandes benefícios se associado de forma correta às terapias que envolvem tratamentos celulares, como as células-tronco retinianas para os tratamentos de doenças degenerativas da retina.

7 REFERÊNCIAS

ABDOUH, M.; BERNIER, G. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. **Experimental eye research**, v. 83, n. 1, p. 153-164, 2006.

AHMAD, I. et al. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 15, n. 3, p. 53-62, 2004.

AHMAD, I. et al. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. **Brain research**, v. 831, n. 1-2, p. 1-10, 1999.

AHMAD, I.; TANG, L.; PHAM, H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. **Biochemical biophysical research communications**, v. 270, n. 2, p. 517-21, 2000.

AKAGI, T. et al. Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 45, n. 12, p. 4570-4575, 2004.

AMEMIYA, K. Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons. **Biochemical biophysical research communications**, v. 316, n. 1, p. 1-5, 2004.

BALZEAU, J. et al. The LIN-28/Let-7 pathway in cancer. **Frontiers in genetics**, v. 8, p. 31, 2017.

BALZER, E.; MOSS, E. G. Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. **RNA biology**, v. 4, n. 1, p. 16-25, 2007.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, 2009.

BHATTACHARYA, S. et al. Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 44, n. 6, p. 2764-73, 2003.

BISHOP, A. E.; BUTTERY, L. D. K.; POLAK, J. M. Embryonic stem cells. **The journal of pathology**, v. 197, n. 4, p. 424-429, 2002.

BRESSLER, N. M. Age-Related Macular Degeneration Is the Leading Cause of Blindness. **Jama**, v. 291, n. 15, p. 1900-1901, 2004.

BRINGMANN, A. et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in retinal and eye research,** v. 25, n. 4, p. 397-424, 2006.

CAI, Z.; FENG, G.; ZHANG, X. Temporal Requirement of the Protein Tyrosine Phosphatase Shp2 in Establishing the Neuronal Fatein Early Retinal Development. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 11, p. 4110-4119, 2010.

CENTANIN, L.; HOECKENDORF, B.; WITTBRODT, J. Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. **Cell stem cell**, v. 9, n. 6, p. 553-562, 2011.

CHACKO, D. M. et al. Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. **Vision research**, v. 43, n. 8, p. 937-46, 2003.

CHAU, K. Y. et al. Derepression of HMGA2 gene expression in retinoblastoma is associated with cell proliferation. **Molecular medicine**, v.9, n. 5-8, p. 154-65, 2003.

CHIAPPETTA, G. et al. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. **Oncogene**, v. 13, n. 11, p. 2439-46, 1996.

CHIAPPETTA, G. et al. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. **Cancer research**, v. 58, n. 18, p. 4193-8, 1998.

CHIRSHEV, E. et al. Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. **Clinical and translational medicine**, v. 8, n. 1, p. 24, 2019.

CHOU, B. K. et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 518-29, 2011.

CLEYNEN, I.; VAN DE VEN, W. J. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). **International journal of oncology**, *v.* 32, n. 2, p. 289-305, 2008.

COCA-PRADOS, M.; ESCRIBANO, J.; ORTEGO, J. Differential gene expression in the human ciliary epithelium. **Progress in retinal and eye research**, v. 18, n. 3, p. 403-429, 1999.

COLES, B. L. K. et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15772-15777, 2004.

DAI, X. et al. Combined delivery of Let-7b microRNA and Paclitaxel via biodegradable nanoassemblies for the treatment of KRAS mutant cancer. **Molecular pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 520-533, 2015.

DAS, A. V. et al. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. **Developmental biology**, v. 273, n. 1, p. 87-105, 2004.

DAS, A. V. et al. Membrane properties of retinal stem cells/progenitors. **Progress in retinal and eye research**, v. 24, n. 6, p. 663-81, 2005.

DAS, A. V. et al. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. **Developmental biology**, v. 299, n. 1, p. 283-302, 2006.

DECEMBRINI, S. et al. MicroRNAs couple cell fate and developmental timing in retina. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 106, n. 50, p. 21179-84, 2009.

DELAMERE, N. A. Ciliary Body and Ciliary Epithelium. **Advances in organ biology**, v. 10, p. 127-148, 2005.

DEL DEBBIO, C. B. et al. Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Muller Cells in adult mammalian retina. **Plos one**, v. 5, n. 8, p. e12425, 2010.

DEL DEBBIO, C. B. et al. Adult ciliary epithelial stem cells generate functional neurons and differentiate into both early and late born retinal neurons under non-cell autonomous influences. BMC neuroscience, v. 14, n. 1, p. 130, 2013.

DEL DEBBIO, C. B. et al. Rho GTPases control ciliary epithelium cells proliferation and progenitor profile induction in vivo. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 55, n. 4, p. 2631-2641, 2014.

EIDE, H. A. et al. The MYCN-HMGA2-CDKN2A pathway in non-small cell lung carcinoma--differences in histological subtypes. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 71, 2016.

ELIAS, F. T. S. et al. Treatment options for age-related macular degeneration: a budget impact analysis from the perspective of the Brazilian public health system. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139556, 2015.

FAUSETT, B. V.; GUMERSON, J. D.; GOLDMAN, D. The proneural basic helix-loop-helix gene ascl1a is required for retina regeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 5, p. 1109-17, 2008.

FEDELE, M. et al. Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. **Oncogene**, v. 21, p. 3190–3198, 2002.

FLOHR, A. M. et al. High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade. **Histology and histopathology**, v. 18, n. 4, p. 999-1004, 2003.

GAETA, X. et al. Defining transcriptional regulatory mechanisms for primary Let-7 miRNAs. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169237, 2017.

GRAW, J. Eye Development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 90, p. 343-386, 2010.

GUAN, H. et al. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting EYA1 in breast cancer. **International journal of molecular medicine**, v. 37, n. 6, p. 1643-1651, 2016.

GUO, Y. et al. Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. **Gene**, v. 384, p. 51-61, 2006.

HAGAN, J. P.; PISKOUNOVA, E.; GREGORY, R. I. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit Let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, n. 10, p. 1021, 2009.

HANSSEN, E.; FRANC, S.; GARRONE, R. Synthesis and structural organization of zonular fibers during development and aging. **Matrix Biology**, v. 20, n. 2, p. 77-85, 2001.

HARUTA, M. et al. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. **Nature neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1163-4, 2001.

HE, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 828, 2005.

HEO, I. et al. Lin-28 mediates the terminal uridylation of Let-7 precursor MicroRNA. **Molecular cell**, v. 32, n. 2, p. 276-84, 2008.

HEO, I. et al. TUT4 in concert with Lin-28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 696-708, 2009.

HEO, I. et al. Mechanisms of therapeutic resistance in cancer (stem) cells with emphasis on thyroid cancer cells. **Frontiers in endocrinology (Lausanne)**, v. 5, p. 37, 2014.

HOMBACH-KLONISCH, S. et al. Mechanisms of therapeutic resistance in cancer (stem) cells with emphasis on thyroid cancer cells. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 37, 2014.

HOUBAVIY, H. B.; MURRAY, M. F.; SHARP, P. A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. **Developmental cell**, v. 5, n. 2, p. 351-8, 2003.

HUTVÁGNER, G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the Let-7 small temporal RNA. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 834-8, 2001.

INOUE, T. et al. Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 3, p. 489-500, 2010.

IORIO, M. V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7065-7070, 2005.

JIANG, J. et al. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 17, p. 5394-403, 2005.

JOHNSON, C. D. et al. The Let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. **Cancer research**, v. 67, n. 16, p. 7713-22, 2007.

KAUR, H. et al. The transcriptional modulator HMGA2 promotes stemness and tumorigenicity in glioblastoma. **Cancer letters**, v. 377, n. 1, p. 55-64, 2016.

KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 10 n. 2, p. 126-39, 2009.

KISHI, Y. et al. HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1127-33, 2012.

LA TORRE, A.; GEORGI, S.; REH, T. A. Conserved microRNA pathway regulates developmental timing of retinal neurogenesis. **Proceedings of the national academy of sciences**. v. 110, n. 26, p. E2362-70, 2013.

LASER, J.; LEE, P.; WEI, J. J. Cellular senescence in usual type uterine leiomyoma. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 6, p. 2020-6, 2010.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. The tumor suppressor microRNA Let-7 represses the HMGA2 oncogene. **Genes & developments**, v. 21, n. 9, p. 1025-30, 2007.

LI, Z. et al. An HMGA2-IGF2BP2 Axis Regulates Myoblast Proliferation and Myogenesis. **Developmental cell**, v. 23, n. 6, p. 1176-88, 2012.

LOCKER, M. et al. A decade of mammalian retinal stem cell research. **Archives italiennes de biologie**, v. 148, n. 2, p. 59-72, 2010.

MARTINEZ, N. J.; GREGORY, R. I. MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. **Cell stem cell**, v. 7, n. 1, p. 31-35, 2010.

MAYR, C.; HEMANN, M. T.; BARTEL, D. P. Disrupting the pairing between Let-7 and HMGA2 enhances oncogenic transformation. **Science**, v. 315, n. 5818, p. 1576-9, 2007.

MAYR, F. et al. The Lin-28 cold-shock domain remodels pre-Let-7 microRNA. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. 7492-506, 2012.

MAYR, F.; HEINEMANN, U. Mechanisms of Lin-28-mediated miRNA and mRNA regulation—a structural and functional perspective. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 8, p. 16532-16553, 2013.

MEARS, A. J. et al. Nrl is required for rod photoreceptor development. **Nature genetics**, v. 29, n. 4, p. 447-52, 2001.

MELTON, C.; JUDSON, R. L.; BLELLOCH, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. **Nature**, v. 463, n.7281, p. 621-6, 2010.

MOSHIRI, A.; CLOSE, J.; REH, T. A. Retinal stem cells and regeneration. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 8-9, p. 1003-1014, 2004.

MOSS, E. G.; LEE, R. C.; AMBROS, V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 637-646, 1997.

MOSS, E. G.; TANG, L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. **Developmental biology**, v. 258, n. 2, p. 432-42, 2003.

NAM, Y. Molecular basis for interaction of Let-7 microRNAs with Lin-28. **Cell**, v. 147, n.5, p. 1080-91, 2011.

NEWMAN, M. A.; THOMSON, J. M.; HAMMOND, S. M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. **RNA**, v. 14, n. 8, p. 1539-49, 2008.

NISHINO, J. et al. HMGA2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. **Cell**, v. 135, n. 2, p. 227-39, 2008.

OTTAIANO, J. A. A. et al. As condições de saúde ocular no Brasil. **Conselho Brasileiro de Oftalmologia**, v. 1. Disponível em: http://www.cbo.com.br/novo/publicacoes/condicoes_saude_ocular_brasil2019.pdf. Acesso em: 24 out. 2019.

PARAMESWARAN S. et al. Nucleic Acid and non-nucleic Acid-based reprogramming of adult limbal progenitors to pluripotency. **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. e46734, 2012.

PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of Let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 86-9, 2000.

PERRON, M.; HARRIS, W. A. Retinal stem cells in vertebrates. **Bioessays**, v. 22, n. 8, p. 685-688, 2000.

PISKOUNOVA, E. et al. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 31, p. 21310-21314, 2008.

PISKOUNOVA, E. et al. Lin-28A and Lin-28B inhibit Let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 1066-1079, 2011.

QIN, Z.; BARTHEL, L. K.; RAYMOND P. A. Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 23, p. 9310-5, 2009.

QIN, C. et al. A novel, noncoding-RNA-mediated, post-transcriptional mechanism of anti-Mullerian hormone regulation by the H19/let-7 axis. **Biology of reproduction**, v. 100, n. 1, p. 101-111, 2018.

RAMACHANDRAN, R.; FAUSETT, B. V.; GOLDMAN, D. Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, Let-7 microRNA signalling pathway. **Nature cell biology**, v. 12, n. 11, p. 1101-7, 2010.

RAVIOLA, G. The fine structure of the ciliary zonule and ciliary epithelium: with special regard to the organization and insertion of the zonular fibrils. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 10, n. 11, p. 851-869, 1971.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide Let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-6, 2000.

REHFELD, F. et al. Lin-28 and Let-7: ancient milestones on the road from pluripotency to neurogenesis. **Cell tissue research**, v. 359, n. 1, p. 145-60, 2014.

RESAR, L.; CHIA, L.; XIAN, L. Lessons from the Crypt: HMGA-1Amping up Wnt for Stem Cells and Tumor Progression. **Cancer research**, v. 78, n. 8, p. 1890-1897, 2018.

REEVES, R. Molecular Biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. **Gene**, v. 277, n. 1-2, p. 63-81, 2001.

RODRIGUES, M. L. V. et al. Perfil epidemiológico das principais causas de cegueira no Brasil. **Cultura Médica**, p. 250, 2012.

ROGALLA, P. et al. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. **The American journal of Pathology**, v. 149, n. 3, p. 775-9, 1996.

ROUGVIE, A. E. Control of developmental timing in animals. **Nature Review Genetics**, v. 2, n. 9, p. 690-701, 2001.

RYBAK, A. et al. A feedback loop comprising Lin-28 and Let-7 controls pre-Let-7 maturation during neural stem-cell commitment', **Nature Cell Biology**. v. 10, n. 8, p. 987-93, 2008.

SALOMÃO, S. R.; MITSUHIRO, M. R.; BELFORT, J. Visual impairment and blindness: an overview of prevalence and causes in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 81, n. 3, p. 539-49. 2009.

SANTOS, L. P. F. et al. Age-related macular degeneration: analysis in two ophthalmological centers in Pernambuco-Brazil. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 68, n. 2, p. 229-233, 2005.

SARHADI, V. K. et al. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 209, n. 2, p. 206-12, 2006.

SCHELLINI, S. A. et al. Prevalence of diabetes and diabetic retinopathy in a Brazilian population. **Ophthalmic epidemiology**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2014.

SGARRA, R. et al. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. **FEBS letters**, v. 574, n. 1-3, p. 1-8, 2004.

SHAH, S. N. et al. HMGA1 reprograms somatic cells into pluripotent stem cells by inducing stem cell transcriptional networks. **PLoS one** v. 7, n. 11. p. e48533, 2012.

SHELL, S. et al. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 27, p. 11400-11405, 2007.

SHYH-CHANG, N. et al. Lin-28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. **Cell**, v. 155, n. 4, p. 778-92, 2013.

SOLOMON, S. D. et al. Intravitreal Bevacizumab versus ranibizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: findings from a Cochrane systematic review. **Ophthalmology**, v. 123, n. 1, p. 70-77. e1, 2016.

SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. **Cancer research**, v. 76, n. 13, p. 3666-3670, 2016.

STERENCZAK, K. A. et al. HMGA1 and HMGA2 expression and comparative analyses of HMGA2, Lin-28 and Let-7 miRNAs in oral squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 694, 2014.

TAKAMIZAWA, J. et al. Reduced expression of the Let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer research**, v. 64, n. 11, p. 3753-6, 2004.

THUMMEL, R. et al. Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. **Experimental eye research**, v. 90, n. 5, p. 572-82, 2010.

TROPEPE, V. et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 2032-6, 2000.

VISWANATHAN, S. R.; DALEY, G. Q.; GREGORY, R. I. Selective blockade of microRNA processing by Lin-28. **Science**, v. 320, n. 5872, p. 97-100, 2008.

WAGNER, S. et al. Role of miRNA Let-7 and its major targets in prostate cancer. **Biomed research international**, v. 2014 p. 376326, 2014.

WANG, S. et al. Hsa-let-7e-5p Inhibits the Proliferation and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells by Targeting Chemokine Receptor 7. **Journal of Cancer,** v. 10, n. 8, p. 1941, 2019.

WANG, T. et al. Aberrant regulation of the LIN-28A/LIN-28B and Let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. **Molecular cancer**, v. 14, n. 1, p. 125, 2015.

WANG, Y. et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. **Nature Genetics**, v. 39, p. 380–385, 2007.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228, 2009.

WORRINGER, K. A. et al. The Let-7/LIN-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. **Cell stem cell** v. 14, n. 1, p. 40-52, 2014.

WULCYN, F. G. et al. Post-transcriptional regulation of the Let-7 microRNA during neural cell specification. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 2, p. 415-26, 2007.

XIA, X.; AHMAD, I. Let-7 microRNA regulates neurogliogenesis in the mammalian retina through HMGA2. **Developmental biology**, v. 410, n. 1, p. 70-85, 2016.

XIAN, L. et al. HMGA1 amplifies Wnt signalling and expands the intestinal stem cell compartment and Paneth cell niche. **Nature communications**, v. 8, p. 15008, 2017.

XIA, X.; TEOTIA, P.; AHMAD, I. Lin28a regulates neurogliogenesis in mammalian retina through the Igf signaling. **Developmental biology**, v. 440, n. 2, p. 113-128, 2018.

XU, H. et al. Characteristics of progenitor cells derived from adult ciliary body in mouse, rat, and human eyes. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 48, n. 4, p. 1674-82, 2007.

YANG, J. et al. Nestin expression during mouse eye and lens development. **Mechanisms of development**, v. 94, n. 1-2, p. 287-291, 2000.

ZHANG, H. et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. **EMBO journal**, v. 21, n. 21, p. 5875-85, 2002.

ZHANG, B. et al. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental biology**, v. 302, n. 1, p. 1-12, 2007.

ZHAO, X.; LIU, J.; AHMAD, I. Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons. **Biochemical and biophysical research community**, v. 297, n. 2, p. 177-84, 2002.

ZHOU, K.; LIU, M.; CAO, Y. New insight into microRNA functions in cancer: oncogene–microRNA–tumor suppressor gene network. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 4, p. 46, 2017.