

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: Prof^ª. Dra. Carolina Beltrame Del Debbio

Versão Original

São Paulo
2019

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.

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 predisõem 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.

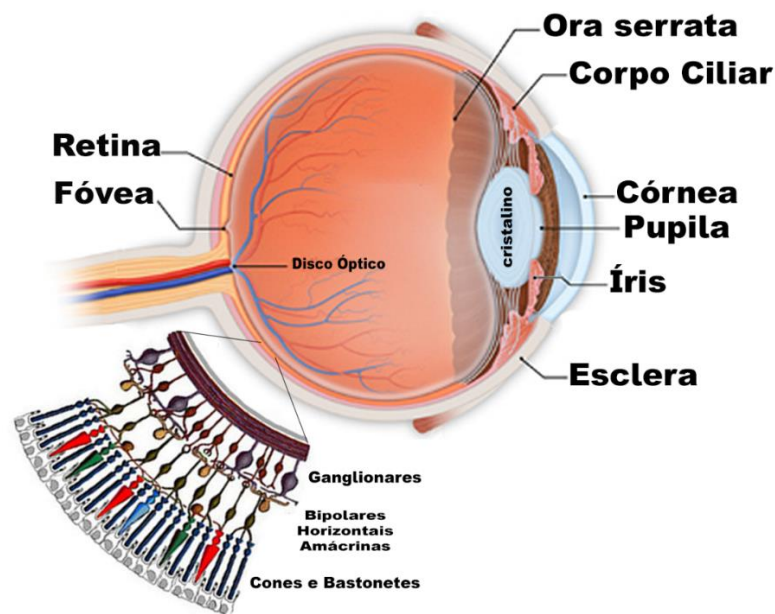


Figura 1 – Desenho esquemático de um corte transversal do olho humano com destaque para um aumento na área da retina. A luz atravessa as estruturas internas do olho até chegar na retina. Os fotorreceptores cones e bastonetes, localizados na Camada Nuclear Externa, irão realizar a fototransdução. O sinal 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.aaopt.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.

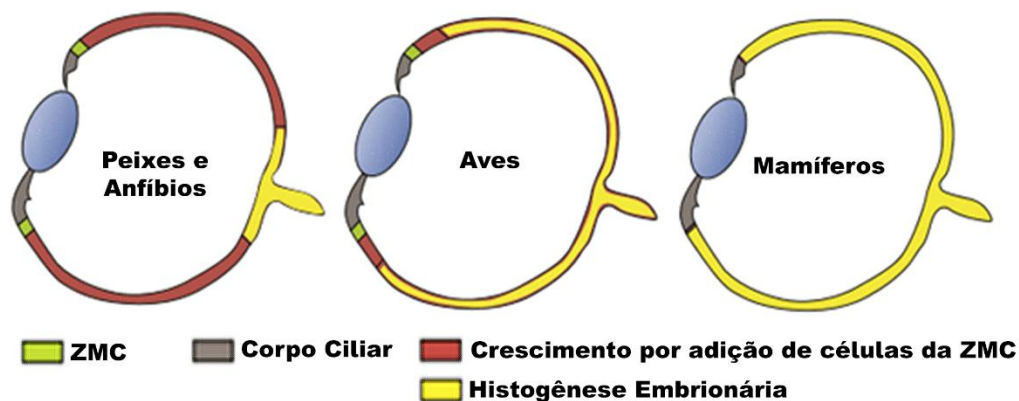


Figura 2 – Participação da Zona Marginal Ciliar (ZMC) na formação retiniana de vertebrados. Em cinza está representado o Corpo Ciliar, que é comum nos diferentes animais, e a ZMC está representada em verde, presente apenas em anfíbios, peixes e aves, não sendo observada nos mamíferos. A porção da retina 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, conseqüentemente, 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*.

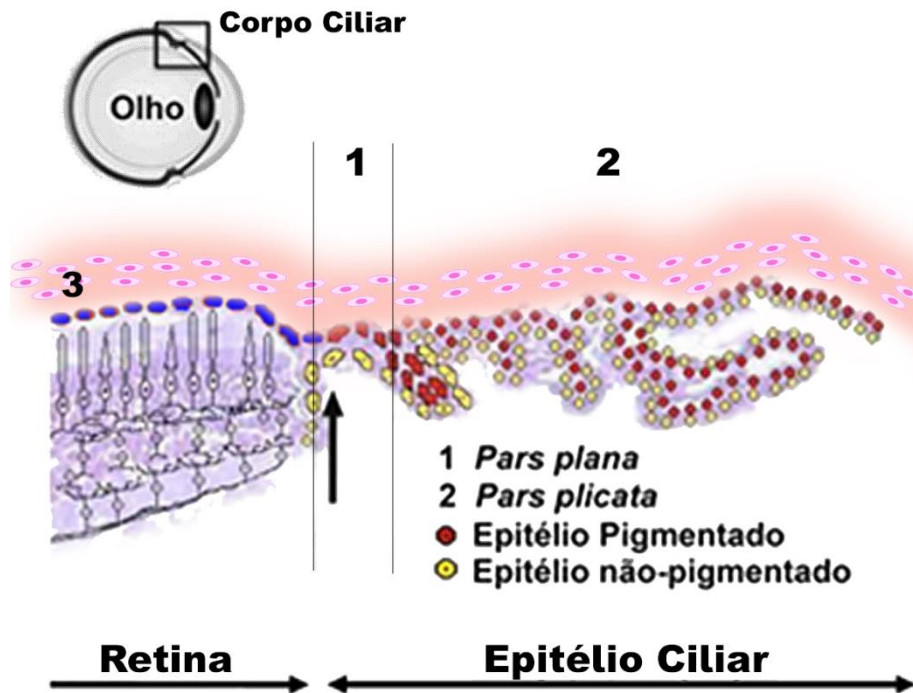


Figura 3. Desenho esquemático do Epitélio Ciliar (EC). O EC se localiza adjacente à retina e é composto por uma bicamada epitelial: Epitélio Pigmentado (EP) e Epitélio Não-Pigmentado (ENP). Anatomicamente é classificado em *pars plana* (1) e *pars plicata* (2). O EC está em contato com os músculos ciliares (não identificados na figura) e a coróide (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 progenitoras 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/progenitoras retinianas.

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, conseqüentemente, 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

Um 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 DFCD8 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.

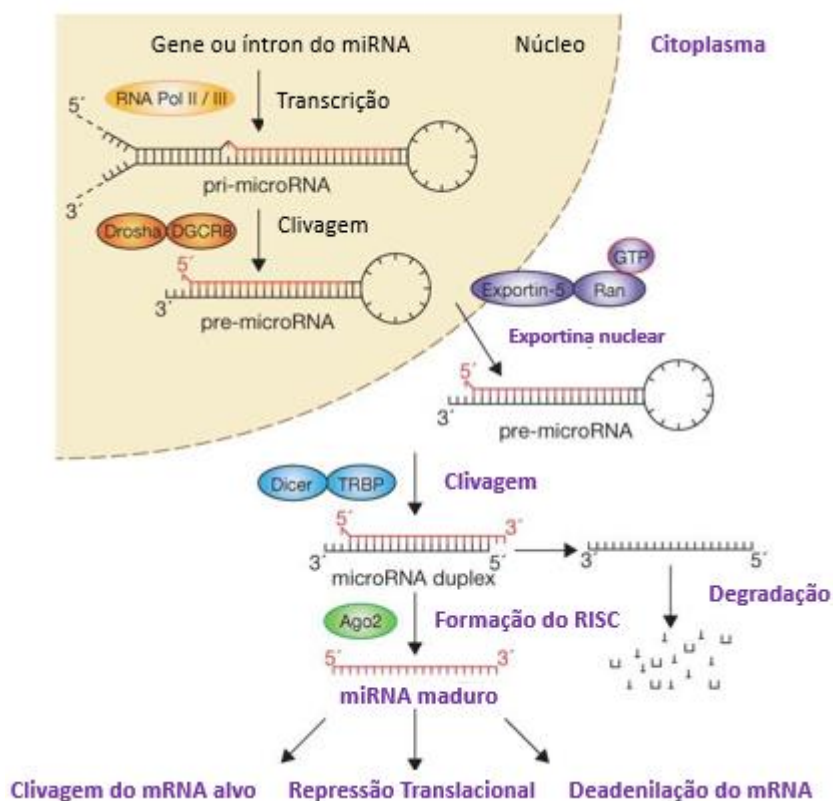


Figura 4. Esquema ilustrativo do mecanismo de biogênese do miRNA. O processo se inicia no núcleo, onde é transcrito pela RNA polimerase I, em seguida o pri-miRNA é clivado pela Drosha e seu cofator DGCR8, resultando no pre-miRNA. O pre-miRNA é exportado para o citoplasma e sofre clivagem pela enzima 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 significativamente 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 delinearão 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 quanto dos domínios *zinc finger* da proteína Lin28a. (PISKOUNOVA et al., 2008). A inibição ocorre após Lin28a recrutar a atividade da terminal uridililtransferase (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 tireoide (HOMBACH-KLONISC et al., 2014; STERENCZAK et al., 2014; WAGNER et al., 2014; EIDE et al., 2016; KAUR et al., 2016) (Figura 5).

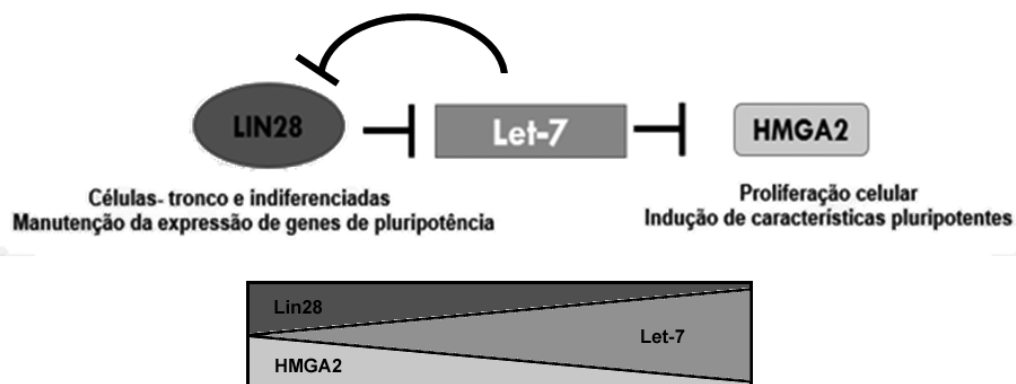


Figura 5. Desenho esquemático do eixo formado por Lin-28, Let-7 e HMGA2. A proteína ligante de RNA LIN-28, que está presente em células-tronco e garante a manutenção da expressão de genes de pluripotência, inibe a formação de Let-7. Let-7 também pode ligar-se ao Lin-28 mRNA regulando-o negativamente (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.

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.

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 Fate in 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 pharmaceuticals**, 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.
- HANSEN, 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-1 Amping 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.

