

## Micro-RNAs: Perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos

### MicroRNAs: current perspectives of gene expression regulation in eukaryotes

*Everton de Brito Oliveira Costa, Cristiane Pacheco*

Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Centro Universitário da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul

#### Endereço para correspondência

Everton de Brito Oliveira Costa

Laboratório de Biologia Celular – Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto

Rua Tenente Catão Roxo, 2501 - Cidade Universitária, Ribeirão Preto - SP, Brasil.

CEP: 14051-140

E-mail: evertoncosta\_biomedicina@yahoo.com.br

#### Resumo

Os micro-RNAs (miRNAs) constituem uma família de pequenos RNAs endógenos não-codificadores de proteínas, de aproximadamente 21-24 nucleotídeos de comprimento, que regulam a expressão gênica através da repressão traducional ou degradação dos seus mRNAs complementares. São oriundos de pequenas estruturas precursoras endógenas do tipo *stem-loop* e funcionam como reguladores de diversos processos dos eucariotos como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, imunidade, interação entre vírus e célula hospedeira, metabolismo, conformação cromossômica, oncogênese, entre outros. Diversos estudos demonstram que a expressão dos miRNAs é tecido e estágio-específica, ou seja, os miRNAs são expressos de forma temporal dependendo do estágio de desenvolvimento celular e/ou tissular, além de serem expressos também de forma bem particular nos mais variados tecidos. Ainda, muitas doenças humanas mostram-se associadas à superexpressão ou à deficiência na expressão de determinados miRNAs. Desse modo, essa revisão de literatura tem por objetivo elucidar os mecanismos envolvidos na biogênese e funcionalismo destas pequenas moléculas, suas implicações em estados fisiológicos normais e anômalos, e discutir suas possíveis utilidades clínicas como ferramentas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas de muitas doenças nas quais os mesmos estão envolvidos, uma vez que pouco se conhece ainda sobre esse novo universo da regulação gênica.

**Palavras-chaves:** RNAs não-codificadores; expressão gênica; regulação gênica.

#### Abstract

The microRNAs (miRNAs) are a family of small endogenous non-coding RNAs, with approximately 21-24 nucleotides in length, which regulate the gene expression through repression traducional or degradation of their complementary mRNAs. They arise of small structures precursors *stem-loop* and act as regulators of several processes of eukaryotes as proliferation, differentiation, development and death cell, immunity, interaction between virus and host cell, metabolism, chromosome conformation, oncogenesis, among others. Several studies demonstrate that the miRNA expression is tissue and stage-specific, ie miRNAs are

*Biossaúde*, Londrina, v. 14, n. 2, 2012

expressed in time depending on the stage of cell and/or tissue development and are also expressed in a well particular manner in several tissues. Still, many human diseases appear associated with overexpression or deficiency in the expression of certain miRNAs. Thus this literature review aims to elucidate the mechanisms involved in the biogenesis and function of these small molecules, its implications in normal and anomalous physiological states, and to discuss the possible clinical utilities of these elements as diagnostic, prognostic and therapeutic tools of many diseases in which are involved, whereas a few is known about this new universe of gene regulation.

**Keywords:** non-coding RNAs, gene expression, gene regulation.

## INTRODUÇÃO

Os micro-RNAs (miRNAs ou miRs) constituem uma família de pequenos RNAs endógenos não-codificadores de proteínas, de aproximadamente 21 a 24 nucleotídeos de comprimento, que se anelam a seqüências complementares na região 3' não-traduzida (3' UTR – 3' *untranslated region*) dos RNAs mensageiros (mRNAs) mediando a repressão da tradução ou a clivagem do mRNA<sup>(1,2,3,4)</sup>. São oriundos de pequenas estruturas precursoras endógenas *stem-loop* e, usualmente, são direcionados a loci com seqüências similares, mas não idênticas. Esses RNAs funcionam como reguladores de diversos processos dos eucariotos como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, interação entre vírus e célula hospedeira, metabolismo, conformação cromossômica, oncogênese entre outros<sup>(5,6,7,8,9)</sup>.

Desde a descoberta do primeiro gene miRNA, *lin-4*, estudos com organismos modelos (como *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Arabidopsis thaliana*) têm identificado a função biológica de diversos miRNAs<sup>(2,10)</sup>. Mais de 800 miRNAs já foram experimentalmente descobertos em animais (1) e alguns deles são altamente conservados entre vertebrados e invertebrados, tais como nematóides, peixes e mamíferos<sup>(11)</sup>.

Diversas evidências indicam que os miRNAs maduros exibem padrões distintos de expressão entre tecidos e células em diferentes estágios de diferenciação (4). Poy *et al.* (2004)<sup>(12)</sup> verificaram que células pancreáticas glicose-responsivas de camundongos têm sua secreção insulínica suprimida por um miRNA evolutivamente conservado, miR-375, o qual reprime a expressão do gene *miotrofina*. Adicionalmente, deletando o miRNA miR-1-2, Zhao *et al.* (2007)<sup>(13)</sup>, observaram defeitos na morfogênese e na formação do potencial elétrico cardíaco.

### Biogênese

Os miRNAs são transcritos de diferentes regiões genômicas como longos transcritos primários (pri-miRNA) pela RNA polimerase II<sup>(11)</sup>, apesar de algumas evidências observadas por Borchert *et al.* (2007) (14) sugerirem que diversos miRNAs possam ser transcritos por uma RNA polimerase III, sendo que esses miRNAs encontram-se interpostos entre seqüências repetidas *Alu*, que são seqüências de material genético de elementos transponíveis que encontram-se inseridos no genoma humano. Após a transcrição, os pri-miRNAs são processados por uma RNase III chamada Drosha e uma proteína de ligação ao RNA dupla-fita DGCR8/Pasha<sup>(3,15)</sup>, em precursores dupla-fita de aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento, os chamados pré-micro-RNAs (pré-miRNAs), os quais possuem a forma de grampo de cabelo, ou haste-alça<sup>(4)</sup>.

Após este processamento, os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma pela proteína Exportina 5-Ran-GTP<sup>(11)</sup>. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela proteína Dicer, gerando uma molécula intermediária dupla-fita de aproximadamente 20 pares de base (pb)<sup>(16,17)</sup>. O miRNA maduro que corresponde a uma das fitas do dúplice de 20pb é, então, incorporado em um grande complexo protéico chamado Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – *RNA Induced Silencing Complex*)<sup>(11)</sup>.

O RISC é constituído em parte por enzimas helicases e proteínas Argonautas, as quais promovem o desenovelamento do dúplice miRNA:miRNA e a quebra das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas. Desse modo, uma das fitas do dúplice pode então, ser incorporada ao RISC, como miRNA maduro enquanto a outra fita do dúplice é degradada<sup>(3,4)</sup>. E aparentemente, a escolha de qual fita servirá como miRNA maduro, parece ser determinada pela estabilidade termodinâmica do dúplice, dando-se preferência à fita cuja extremidade 5' possui menor estabilidade termodinâmica. Dessa forma, o miRNA maduro incorporado ao RISC pode conduzir o complexo protéico ao mRNA complementar para promover a repressão da expressão gênica (5). Assim, seria plausível que o processamento dos miRNAs pela enzima Dicer fosse realizada já no interior do Complexo de Silenciamento, tendo como fundamento as observações de Gregory e Shiekhattar (2005)<sup>(3)</sup> de que a enzima RNase III Dicer pode ser encontrada constituindo o RISC.

Contudo, as recentes descobertas de miRNAs derivados de íntrons em *C. elegans*, camundongos e humanos têm levado à proposição de vias alternativas para a biogênese dessas moléculas, vias estas que dependeriam da interação entre a transcrição de um pré-mRNA por uma polimerase II e a excisão intrônica. Sendo assim, a transcrição do DNA genômico para pré-mRNA poderia resultar no *splicing* dos éxons para a tradução protéica e múltiplos miRNAs intrônicos. Cerca de 50% dos miRNAs humanos parecem ser oriundos de regiões intrônicas de transcritos de genes codificadores de proteínas<sup>(10)</sup>.

#### *Mecanismo de Ação*

Os miRNAs são capazes de promover a repressão da tradução ou a degradação do mRNA dependendo do grau de complementariedade e homologia com seus genes-alvo<sup>(18)</sup>. A escolha do mecanismo de silenciamento gênico mediado por miRNAs pode ser inteiramente determinada pelo grau de complementariedade deles com seus mRNAs-alvos<sup>(3,15)</sup>.

Quando o miRNA (incorporado ao complexo protéico) pareia com o seu mRNA cognato, e passa a compor o RISC, cujo componente central é uma proteína da família Argonauta que funciona como uma endonuclease, induz o RISC a clivar o mRNA entre o 10° e o 11° par de base pareado com o miRNA (11). Estudos recentes revelaram que o RISC é composto por, no mínimo, uma enzima RNase III (Dicer), helicases, Ago2 e a proteína TRBP de ligação ao RNA dupla-fita (dsRNA)<sup>(3)</sup>.

As proteínas Argonautas são fatores centrais dentro do RISC, pois interagem com as moléculas de RNAs pequenos e estruturam o complexo protéico. Em humanos, foi observado que a Argonauta 2 possui atividade “*slicer*”, clivando a molécula de mRNA cognato (19). Entretanto, homólogos de proteínas Argonauta são amplamente encontradas em diversos organismos como *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Schizosaccharomyces pombe* e *C. elegans*<sup>(18)</sup>.

Em plantas, a grande maioria dos miRNAs possuem um perfeito pareamento de base (ou quase perfeito) com seus mRNAs-alvos. Desse modo, o RISC funciona como endonuclease, clivando o mRNA cognato. Em animais, alguns miRNAs também induzem a atividade endonucleotídica do RISC, não obstante, a quase totalidade possui

seu pareamento restrito a alguns pares de base com a região-alvo do mRNA, e induzem o bloqueio da tradução<sup>(20)</sup>. No entanto, ainda são um pouco obscuros os mecanismos envolvidos nos diferentes modos de atuação dos miRNAs em plantas e animais, ou seja, não se sabe ainda porque causa os miRNAs em plantas possuem um alto grau de complementariedade de bases com seus mRNAs cognatos em comparação com os miRNAs em animais.

Em um trabalho recente, Wu *et al.* (2006)<sup>(21)</sup> propuseram que os miRNAs regulam a expressão gênica por dois mecanismos distintos: reduzindo a eficiência da tradução do mRNA pelo incompleto pareamento de bases com a 3'-UTR do mesmo; e, permitindo a deadenilação do mRNA, o que conduziria a sua degradação por exonucleases. Em células de mamíferos, eles verificaram que, utilizando os miRNAs miR-125b e let-7, a redução na abundância de mRNAs foi verificada como consequência de uma deadenilação e degradação acelerada dos mesmos, de forma semelhante aos resultados obtidos nos estudos de Giraldez *et al.* (2006)<sup>(22)</sup>, que observaram a deadenilação dos mRNAs, seguida pelo decapeamento e degradação dos mesmos por exonucleases. E, diferentemente do bloqueio traducional, o mecanismo de deadenilação e degradação do mRNA parece ser um fenômeno irreversível<sup>(21)</sup>.

Outra importante descoberta é a de que proteínas Argonautas, os miRNAs e seus mRNAs cognatos acumulam-se em sítios citoplasmáticos conhecidos como *P-bodies*<sup>(22)</sup>. Esses compartimentos intracelulares, em eucariotos superiores, são constituídos por enzimas decapeadoras Dcp1/Dcp2, exonuclease Zrn1 5'-3'; Dhh1p (com atividade helicase) e Pat1p. Outros prováveis constituintes compreendem a GW 182 (uma proteína de ligação a RNA); 4E-T e outras proteínas de ligação a EIF4E; e a própria proteína EIF4E, no entanto, fatores transcricionais como PABP e ribossomos estão ausentes<sup>(17)</sup>. Esses *P-bodies* são altamente móveis no citoplasma da célula e variam bastante em número e tamanho<sup>(21)</sup>.

Alguns achados evidenciam que a repressão mediada por miRNAs e a localização do mRNA em *P-bodies* são processos reversíveis. Dessa forma, os *P-bodies* são responsáveis pela estocagem dos mRNAs reprimidos, alguns dos quais são subsequentemente degradados, ao passo que outros podem ser recuperados para tradução<sup>(17)</sup>.

#### *Regulação da expressão dos micro-RNAs*

Obernosterer *et al.* (2006)<sup>(23)</sup> observaram que os miRNAs de mamíferos podem ser regulados em nível pós-transcricional, uma vez que a análise para detecção do miRNA maduro miR-138 foi observado em tecidos específicos, enquanto o seu precursor, o pré-miRNA miR-138, pôde ser detectado em quase todos os tipos celulares. Ainda, os pré-miRNAs, inclusive o miR-138, são exportados do núcleo para o citoplasma para serem processados, indicando que a próxima etapa de processamento dos pré-miRNAs pela Dicer, é restrita a tecidos e células específicas.

Assim, a expressão de miRNAs maduros nos tecidos, mostra-se bem específica, e com um alto nível de regulação, visto que os miRNAs podem ter seu processo de biogênese regulado de modo a permitir a expressão miRNA tecido-específica. No entanto, os mecanismos envolvidos na regulação da expressão dos miRNAs, ou seja, na regulação dos reguladores gênicos ainda são muito pouco compreendidos, carecendo de maiores e mais detalhados estudos, dada a alta complexidade do fenômeno.

Entretanto, apesar de todos os miRNAs maduros apresentarem comprimentos de aproximadamente 22 nucleotídeos e das estruturas secundárias dos pré-miRNAs serem extremamente parecidas, as seqüências de bases dos miRNAs e dos pré-miRNAs são muito diversificadas e as estruturas secundárias dos pré-miRNAs podem diferir em

detalhes. As regiões de haste dos pré-miRNAs, por exemplo, podem conter resíduos variáveis em quantidade e tipos de bases não-pareadas em diferentes locais, e a extremidade *overhang* pode estender-se de 3 a mais de 10 nucleotídeos em comprimento<sup>(1,11,16)</sup>.

Isso pode explicar como os pré-miRNAs são reconhecidos pelas mesmas enzimas e processados de forma tão precisa para produzir os miRNAs maduros. O processamento resulta em um pré-miRNA com extremidades 5'-fosfato e 3'-hidroxil terminais e com 2 ou 3 nucleotídeos sobressalentes na extremidade 3', o que é uma característica da clivagem de RNAs dupla-fita por RNases III<sup>(15,19)</sup>.

Entretanto, apesar de começarmos a compreender como a enzima Dicer reconhece o miRNA na estrutura do pré-miRNA, pouco se sabe ainda como a Droscha reconhece a estrutura do miRNA e/ou de seu precursor e dita a sua clivagem, sendo, portanto, implicada como fator chave na biogênese dos miRNAs, uma vez que ela possui a habilidade de reconhecer e processar seus precursores. Ainda, apesar do rápido progresso e da riqueza de informações, o estudo dos mecanismos de regulação gênica através de miRNAs está apenas começando. É provável que existam mecanismos distintos corroborando e talvez estes se sobreponham.

A enzima Droscha, por sua vez, tem emergido como um fator fundamental na determinação de qual parte do pré-miRNA originará o miRNA maduro (16). A Droscha possui uma função crítica, decidindo a sequência e a abundância dos miRNAs, pois os sítios de clivagem escolhidos por essa enzima dita onde ocorrerá a clivagem pela Dicer e, portanto, qual miRNA será incorporado ao RISC<sup>(17)</sup>.

Uma característica marcante dos miRNAs em animais é que seus genes, freqüentemente, estão agrupados no genoma, ou, organizados em *tandem*. Nestes casos, provavelmente, os miRNAs maduros são processados a partir de transcritos precursores policistrônicos, ou seja, em regiões genômicas que abrigam diversos genes miRNAs<sup>(2)</sup>. Esse arranjo, em especial, pode ter uma significância particular no controle da expressão gênica, pois quando os genes miRNAs em *tandem* apresentam sequências similares, os produtos gênicos podem regular sincronicamente um grupo de mRNAs-alvos. Em contrapartida, agrupamentos gênicos de miRNAs com sequências distintas, produzem miRNAs que são dirigidos a mRNAs específicos<sup>(1,23)</sup>.

Grande parte dos genes codificadores de miRNAs em humanos existem individualmente, apesar de alguns miRNAs serem encontrados em agrupamentos policistrônicos, o que permite a expressão coordenada desses genes<sup>(24,25)</sup>. Análises de 186 genes de miRNAs mostraram uma distribuição não-randômica desses genes no genoma humano, onde 90 estão localizados em 36 agrupamentos, normalmente com 2 ou 3 genes por agrupamento, sendo que o maior agrupamento policistrônico é composto de 7 genes codificadores de miRNAs<sup>(25)</sup>.

### *Micro-RNAs e Câncer*

O câncer resulta do crescimento celular anormal e perda da capacidade de apoptose. Adicionalmente, muitos estudos demonstram que os miRNAs regulam o crescimento celular e a apoptose<sup>(26,27,28)</sup>. O silenciamento ou a superexpressão de miRNAs específicos parecem ser fenômenos essenciais na iniciação e desenvolvimento do câncer<sup>(29)</sup>. No entanto, uma incógnita quanto à expressão alterada de miRNAs no câncer é se esse fenômeno é a causa ou uma consequência da patologia<sup>(30)</sup>.

Genes miRNAs que comumente aparecem em níveis elevados em tecidos neoplásicos podem ser considerados oncogenes – “*oncomirs*”, e geralmente promovem o desenvolvimento tumoral inibindo genes supressores tumorais e/ou genes que controlam a diferenciação celular e a apoptose<sup>(8,24)</sup>. Em contrapartida, os genes

miRNAs que apresentam expressão diminuída em tecidos tumorais, são considerados genes supressores tumorais, e usualmente previnem o desenvolvimento tumoral inibindo negativamente a expressão de oncogenes e/ou genes que controlam a diferenciação celular e a apoptose<sup>(29)</sup>. O padrão de expressão dos miRNAs parece ser tecido-específico, assim tipos diferentes de tumores mostram padrões de expressão de miRNAs distintos, estando associados a características clinicopatológicas bem específicas<sup>(26)</sup>.

Assim, os diferentes perfis de expressão dos miRNAs em cânceres poderão ser usados futuramente como biomarcadores e poderosa ferramenta diagnóstica no câncer. Dessa forma, por causa de suas prováveis funções de oncogenes ou genes supressores tumorais, seria possível bloquear a expressão de miRNAs oncogênicos por meio de moléculas sintetizadas artificialmente, ou promover a expressão de miRNAs supressores tumorais silenciados no câncer através de medicamentos.

Estudos mostram que cerca de 50% dos genes miRNAs encontram-se em regiões genômicas associadas ao câncer ou em sítios frágeis, e a expressão desregulada de certos miRNAs têm sido ligada a várias doenças proliferativas como a leucemia linfocítica crônica de célula B e câncer colorretal<sup>(1,31,32)</sup>. Estes genes estão freqüentemente localizados em sítios frágeis e em regiões sujeitas a perda de heterozigose, amplificação ou pontos de quebra, alterações comumente observadas no câncer<sup>(31)</sup>.

Além disso, Cimmino *et al.* (2005)<sup>(33)</sup> demonstraram um possível alvo para miR-15a e miR-16-1, presentes em 13q14, quando eles desvendaram que ambos os miRNAs regulam negativamente a proteína antiapoptótica BCL2 em nível pós-transcricional e que seus níveis de expressão estão inversamente relacionados ao grau de expressão da BCL2 em LLC. Assim, a desregulação da BCL2 em células de LLC parece ser o evento chave nessa carcinogênese. Adicionalmente, a superexpressão de miR-15 e miR-16 induz a apoptose em células MEG-01<sup>(25)</sup>.

A expressão alterada de miRNAs pôde ser verificada também em diversos cânceres de câncer de tireóide<sup>(25)</sup>, pulmão<sup>(26)</sup>, mama<sup>(27)</sup>, carcinoma hepatocelular<sup>(28)</sup>, e linfoma de Burkitt (34). Em câncer de tireóide papilar, He *et al.* (2005)<sup>(25)</sup> verificaram a superexpressão dos miRNAs miR-221, miR-222 e miR-146, contrapondo-se à redução nos níveis de proteína KIT e do seu mRNA, sugerindo que esses miRNAs regulam negativamente a expressão dessa proteína.

Em um experimento *in vitro*, Takamizawa *et al.* (2004)<sup>(26)</sup> demonstraram que a superexpressão do gene *let-7* resulta na inibição do crescimento celular em câncer de pulmão. A expressão deste miRNA é menor em tumores pulmonares que em tecidos pulmonares normais, enquanto a expressão da proteína RAS é significativamente maior nesses tumores, sugerindo um possível mecanismo para *let-7* como um regulador negativo do oncogene *ras*. Inversamente, um agrupamento policistrônico de miRNAs, miR-17-92, apresenta-se aumentado em CLL de células B<sup>(25)</sup>. Ainda, a expressão de seis miRNAs deste agrupamento é regulado positivamente pelo gene *c-myc*, cuja expressão e/ou função é uma das anormalidades mais comuns em tumores humanos, sendo que os miRNAs miR-17-5p e miR-20a, presentes neste agrupamento, regulam negativamente a expressão do fator transcricional E2F1<sup>(6)</sup>.

Em câncer de mama, Iorio *et al.* (2005)<sup>(25)</sup> verificaram que os miRNAs miR-125b, miR-145, miR-21 e miR-155 foram significativamente reduzidos em tecidos cancerosos quando comparados a tecidos normais. Ainda, eles observaram que a expressão de miRNAs correlacionavam-se com características estágio-específicas do câncer de mama.

Michael *et al.* (2003)<sup>(32)</sup>, observaram que a expressão de dois miRNAs maduros miR-143 e miR-145, foi consideravelmente reduzida em câncer colorretal. Contudo, os autores não observaram nenhuma redução nos níveis dos precursores desses miRNAs, evidenciando que o padrão de expressão alterado desses miRNAs não procede em nível transcricional.

Analisando amostras humanas de câncer colorretal para avaliar a expressão de 10 miRNAs possivelmente regulados pelo gene *p53*, Xi *et al.* (2006)<sup>(35)</sup> observaram que quatro miRNAs: mir-15b, miR181b, miR-191 e miR-200c foram significativamente superexpressos. Em particular, pacientes com expressão de miR-200c não muito elevada apresentavam uma sobrevida maior (em média 38 meses) que pacientes com altos níveis de miR-200c (26 meses).

A superexpressão do miRNA miR-155 tem sido relatada em doenças linfoproliferativas<sup>(34)</sup>. Ainda, segundo He *et al.* (2005)<sup>(25)</sup>, o miRNA policistrônico mir-17-19b é sintetizado em altas concentrações em linfomas que apresentam amplificação da região 13q31. E, segundo Hayashita *et al.* (2005)<sup>(36)</sup>, o mesmo miRNA policistrônico apresenta-se superexpresso em câncer de pulmão. Ainda, o gene miR-155 foi encontrado superexpresso em uma gama de linfomas derivados de células B, em diferentes estágios de desenvolvimento, mas principalmente nos tipos mais agressivos de linfoma<sup>(37)</sup>.

Em estudos mais recentes, Voorhoeve *et al.* (2006)<sup>(38)</sup> observaram a superexpressão dos miRNAs miR-372 e miR-373 em tumores de testículo, indicando uma possível função oncogênica para esses miRNAs. Em amostras de glioblastomas, Ciafre *et al.* (2005)<sup>(39)</sup> verificaram a superexpressão do miRNA miR-221 e redução nos níveis de miR-181a, miR-181b e miR-181c, quando comparados a tecidos normais de cérebro.

Ainda, investigando amostras de carcinoma hepatocelular, Murakami *et al.* (2006)<sup>(28)</sup> observaram que os miRNAs miR-18 e miR-224 foram significativamente superexpressos, ao passo que os miRNAs miR-199a, miR-195, miR-200 e miR-125 apareceram em níveis de diminuídos.

Desse modo, o perfil de expressão de diversos miRNAs parece correlacionar-se com o prognóstico do paciente com câncer, podendo este apresentar uma sobrevida maior ou menor, considerando-se o seu estado clínico e os miRNAs que aparecem diferencialmente expressos. Assim, o reconhecimento de miRNAs que são diferencialmente expressos entre tecidos normais e tumorais poderá proporcionar a identificação de miRNAs que estão envolvidos no câncer e elucidar mais precisamente como eles participam no desenvolvimento da patologia.

#### *Micro-RNAs e a diferenciação das células-tronco*

Recentemente foi relatado que os miRNAs possuem papéis críticos na diferenciação de linhagens hematopoiéticas em mamíferos. O miRNA miR-181a, por exemplo, é preferencialmente expresso no timo e em linfócitos B da medula óssea de camundongos e promove a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em células B quando superexpressos, enquanto os miRNAs miR-146 e miR-223 parecem estar envolvidos na diferenciação de linfócitos T<sup>(40)</sup>.

Sabe-se atualmente, que muitos miRNAs funcionam como reguladores da expressão gênica em células-tronco durante o desenvolvimento<sup>(9,41)</sup>. Analisando a expressão de diferentes miRNAs durante a diferenciação de células progenitoras eritróides humanas em sistema de cultura, Masaki *et al.* (2007)<sup>(42)</sup> verificaram uma superexpressão significativa de miR-155 e miR-451, sugerindo que esses miRNAs participam na diferenciação eritróide. Adicionalmente, Georgantas III *et al.* (2007)<sup>(43)</sup>

validaram experimentalmente o miRNA miR-155 como um potente controlador da mielóide e eritropoiese humana normais.

Alguns outros miRNAs descobertos recentemente são músculo-específicos e parecem exibir importantes funções na miogênese: miR-135b, miR-338<sup>(44)</sup>; miR-181<sup>(45)</sup>; miR-1, miR-133<sup>(46)</sup>; miR-206<sup>(47)</sup>.

No sistema nervoso, os miRNAs têm sido implicados em seu funcionamento e morfogênese em vermes e peixes<sup>(22)</sup>, e seus diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento do sistema nervoso têm sugerido importantes funções na neurogênese e gliogênese em mamíferos<sup>(48)</sup>. Pouco ainda tem sido descrito sobre a participação dos miRNAs na neurogênese em mamíferos. Em estudo recente, Krichevsky *et al.* (2006)<sup>(48)</sup> encontraram que os miRNAs cérebro-específicos miR-9 e miR-124a exibem importante participação na neurogênese e diferenciação de células-tronco embrionárias neurais e neurogliais em camundongos.

Outros estudos recentes demonstraram que os miRNAs estão envolvidos nos processos de diferenciação e auto-renovação das células-tronco germinativas em *D. melanogaster*. O silenciamento das proteínas Dicer e Loquacious PB, que constituem, juntamente com outras proteínas, o RISC em *Drosophila*, bloqueou o ciclo celular entre as fases G1 e S, e gerou uma incapacidade de auto-renovação do estoque de células-tronco germinativas, indicando que esses fenômenos ocorreram em consequência à deficiência na maturação de alguns miRNAs envolvidos no controle do ciclo celular e da diferenciação das células germinativas<sup>(49,50)</sup>.

#### *Micro-RNAs e resposta imune*

Nos processos inflamatórios, pouco se conhece ainda sobre as interações existentes entre inflamação, resposta imune inata e a expressão de miRNAs<sup>(51)</sup>.

Avaliando a expressão de 200 miRNAs após a exposição de células THP-1 ao LPS, um elemento antigênico presente na parede celular de bactérias gram-negativas, Taganov *et al.* (2006)<sup>(52)</sup> observaram que vários dos miRNAs analisados (miR-146a/b, miR-132 e miR-155) tiveram suas expressões induzidas pelo agente. Em particular, os autores mostraram, através de análises do promotor do gene miR-146, que esse gene está relacionado com NF- $\kappa$ B, o qual está diretamente ligado à resposta imunológica. Essas observações sugerem que a família de miRNAs miR-146a/b, possa funcionar como um regulador da resposta imune.

Usando a técnica de *microarray* na identificação de miRNAs envolvidos na resposta adaptativa de macrófagos em camundongos, O'Connell *et al.* (2007)<sup>(51)</sup> verificaram que o miRNA miR-155, possivelmente, está diretamente relacionado a uma variedade de mediadores inflamatórios.

Rodriguez *et al.* (2007)<sup>(53)</sup>, deletaram uma sequência do gene miRNA miR-155 e verificaram defeitos severos no sistema imune de camundongos. Mais precisamente, camundongos defectivos em miR-155 tiveram as funções de suas células dendríticas e dos linfócitos B e T prejudicadas. Em estudo semelhante, Thai *et al.* (2007)<sup>(54)</sup>, observaram defeitos na diferenciação dos linfócitos T-helper e também na atuação de células T dependentes de anticorpos. Esses achados sugerem que o miR-155 exibe uma função primordial na ativação do sistema imune.

Assim, considerando-se os achados que o miR-155, miR-146 e diversos outros miRNAs muito evidentemente, possuem função oncogênica, a implicação dessas moléculas na resposta inflamatória pode sugerir um possível elo de união entre a inflamação e o câncer.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os miRNAs constituem uma complexa rede de interações moleculares composta por RNAs endógenos não-codificadores de proteínas que funcionam como reguladores de diversos processos celulares, tais como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte da célula, interação entre vírus e célula hospedeira, metabolismo celular, conformação cromossômica, oncogênese, entre outros. E, quando incorporados a um complexo protéico de silenciamento induzido por RNA, são capazes de promover a repressão traducional, ou induzir a degradação do mRNA ou seu armazenamento em sítios citoplasmáticos para que possam ser traduzidos posteriormente.

Pouco ainda se sabe sobre a regulação da expressão dessas pequenas moléculas, todavia, evidências indicam que mecanismos complexos encontram-se envolvidos, de forma que as mesmas enzimas capazes de processar as estruturas primárias em uma ampla variedade de moléculas maduras. Sabe-se, entretanto, que os miRNAs são expressos de forma temporal dependendo do estágio de desenvolvimento celular e em níveis muito variados entre os diferentes tecidos. Dessa maneira, a expressão dos miRNAs mostra-se extremamente específica e com um alto nível de regulação.

Nos eucariotos, os miRNAs encontram-se implicados em diversos processos fisiológicos e patológicos. Evidências demonstram que os miRNAs exercem funções de oncogenes ou genes supressores tumorais, regulando direta ou indiretamente a expressão de moléculas responsáveis pelo desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular. Além disso, por apresentarem expressão tecido e estágio-específica, parecem correlacionar-se com o estado clinicopatológico do paciente e com o prognóstico da doença. Da mesma forma, a superexpressão ou a deficiência na expressão de determinados miRNAs, mostram-se associadas a uma grande variedade de patologias. Ainda, os relatos implicando os mesmos miRNAs nos processos inflamatórios e no câncer, possivelmente demonstram uma estreita ligação entre os dois fenômenos e uma possível ligação entre ambos.

Dessa forma, uma maior elucidação dessa camada de regulação da expressão gênica, apenas recentemente descoberta, e o reconhecimento de miRNAs diferencialmente expressos em tecidos normais e patológicos poderão proporcionar o entendimento de como essas moléculas participam no desenvolvimento nas mais variadas patologias, abrindo uma nova e ampla perspectiva nas áreas diagnóstica, prognóstica e terapêutica das doenças a nível molecular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lagos-Quintana, M; Rauhut, R; Lendeckel, W; Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294:853-858, 2001.
  2. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431:350-355, 2004.
  3. Gregory, RI; Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.*, 65:3509-3512, 2005.
  4. Avnit-Sagi, T; Kantorovich, L; Kredon-Russo, S; Hornstein, E; Walker, MD. The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. *PLoS ONE*, 4(4):1-9, 2009.
- Biosáude*, Londrina, v. 14, n. 2, 2012

5. Schwarz, DS; Hutvágner, G; Du, T; Xu, Z; Aronin, N; Zamore, PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115:199-208, 2003.
6. O'Donnell, KA; Wentzel, EA; Zeller, KI; Dang, CV; Mendell, JT. c-Myc-regulated micro-RNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435:839-843, 2005.
7. Cai, X.; Cullen, B. R. Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus micro-RNAs. *J. Virol.*, 80:2234-2242, 2006.
8. Iorio, MV; Visone, R; Di Leva, G; Donati, V; Petrocca, F; Casalini, P; Taccioli, C; Volinia, S; Liu, C; Alder, H; Calin, GA; Menard, S; Croce, CM. MicroRNAs signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.*, 67:8699-8707, 2007.
9. Campbell, MJ. Myeloid differentiation continues to reveal the complexity of nuclear receptor signaling. *Cell Cycle*, 8(5):675-676, 2009.
10. Ying, S; Lin, S. Intron-derived microRNAs – fine tuning of gene functions. *Gene*, 342(1):25-28, 2004.
11. Lee, RC; Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294:862-864, 2001.
12. Poy, MN; Eliasson, L; Krutzfeldt, J; Kuwajima, S; Ma, X; Macdonald, PE; Pfeffer, S; Tuschl, T; Rajewsky, N; Rorsman, P; Stoffel, M. A pancreatic islet-specific micro-RNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432:226-230, 2004.
13. Zhao, Y; Ransom, JF; Li, A; Vedantham, V; von Drehle, M; Muth, AN; Tsuchihashi, T; McManus, MT; Schwartz, RJ; Srivastava, D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129:303-317, 2007.
14. Borchert, GM; Lanier, W; Davidson, BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct. Mol. Biol.*, 13:1097-1101, 2007.
15. Zeng, Y; Cullen, BR. Structural requirements for pre-microRNAs binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.*, 32:4776-4785, 2004.
16. Zeng, Y; Yi, R; Cullen, BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO J.*, 24:138-148, 2005.
17. Chable-Bessia, C; Meziane, O; Latreille, D; Triboulet, R; Zamborlini, A; Wagschal, A; Jacquet, JM; Reynes, J; Levy, Y; Saib, A; Bennasser, Y; Benkirane, M. Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. *Retrovirology*, 6(26):1-11, 2009.
18. Reinhart, BJ; Weinstein, EG; Rhoades, MW; Bartel, B; Bartel, DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, 16:1616-1626, 2002.

19. Liu, J; Carmell, MA; Rivas, FV; Marsden, CG; Thomson, JM; Song, JJ; Hammond, SM; Joshua-Tor, L; Hannon, GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305:1437-1441, 2004.
20. Pfeffer, S; Zavolan, M; Grässer, FA; Chien, M; Russo, JJ; Ju, J; John, B; Enright, AJ; Marks, D; Sander, C; Tuschl, T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304:734-736, 2004.
21. Wu, L; Fan, J; Belasco, JG.. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103:4034-4039, 2006.
22. Giraldez, AJ; Mishima, Y; Rihel, J; Grocock, RJ; Van Dongen, S; Inoue, K; Enright, AJ; Schier, AF. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312:75-79, 2006.
23. Obernosterer, G; Leuschner, PJ; Alenius, M; Martinez, J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA*, 12:1161-1167, 2006.
24. Calin, GA; Sevignani, C; Dumitru, CD; Hyslop, T; Noch, E; Yendamuri, S; Shimizu, M; Rattan, S; Bullrich, F; Negrini, M; Croce, CM. Human microRNAs genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:2999-3004, 2004.
25. He, H; Jazdzewski, K; Li, W; Liyanarachchi, S; Nagy, R; Volinia, S; Calin, GA; Liu, CG; Franssila, K; Suster, S; Kloos, RT; Croce, CM; De la Chapelle, A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102:19075-19080, 2005.
26. Takamizawa, J; Konishi, H; Yanagisawa, K; Tomida, S; Osada, H; Endoh, H; Harano, T; Yatabe, Y; Nagino, M; Nimura, Y; Mitsudomi, T; Takahashi, T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 64:3753-3756, 2004.
27. Iorio, MV; Ferracin, M; Liu, CG; Veronese, A; Spizzo, R; Sabbioni, S; Magri, E; Pedriali, M; Fabbri, M; Campiglio, M; Ménard, S; Palazzo, JP; Rosenberg, A; Musiani, P; Volinia, S; Nenci, I; Calin, GA; Querzoli, P; Negrini, M; Croce, CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*, 65:7065-7070, 2005.
28. Murakami, Y; Yasuda, T; Saigo, K; Urashima, T; Toyoda, H; Okanoue, T; Shimotohno, K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumors tissues. *Oncogenes*, 25:2537-2545, 2006.
29. Zhang, B; Pan, X; Cobb, GP; Anderson, TA.. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biol.*, 302:1-12, 2007.
30. Sassen, S; Miska, EA; Caldas, C. MicroRNA-implications for cancer. *Virchows Arch.*, 452:1-10, 2008.
31. Calin, GA; Dumitru, CD; Shimizu, M; Bichi, R; Zupo, S; Noch, E; Aldler, H; Rattan, S; Keating, M; Rai, K; Rassenti, L; Kipps, T; Negrini, M; Bullrich, F; Croce, *Biossaúde*, Londrina, v. 14, n. 2, 2012

CM. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:15524-15529, 2002.

32. Michael, MZ; O' Connor, SM; van Holst Pellekaan, NG; Young, GP; James, RJ. Reduced accumulation of specific micro-RNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.*, 1:882-891, 2003.

33. Cimmino, A; Calin, GA; Fabbri, M; Iorio, MV; Ferracin, M; Shimizu, M; Wojcik, SE; Aqeilan, RI; Zupo, S; Dono, M; Rassenti, L; Alder, H; Volinia, S; Liu, CG; Kipps, TJ; Negrini, M; Croce, CM. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102:13944-13949, 2005.

34. Metzler, M; Wilda, M; Busch, K; Viehmann, S; Borkhardt, A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromos. Cancer*, 39:167-169, 2004.

35. Xi, Y; Formentini, A; Chien, M; Weir, DB; Russo, JJ; Ju, J; Kornmann, M; Ju, J. Prognostic values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark. Insights.*, 2:113-121, 2006.

36. Hayashita, Y; Osada, H; Tatematsu, Y; Yamada, H; Yanagisawa, K; Tomida, S; Yatabe, Y; Kawahara, K; Sekido, Y; Takahashi, T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.*, 65:9628-9632, 2005.

37. Eis, PS; Tam, W; Sun, L; Chadburn, A; Li, Z; Gomez, MF; Lund, E; Dahlberg, JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 102:3617-3632, 2005.

38. Voorhoeve, PM; Le Sage, C; Schrier, M; Gillis, AJ; Stoop, H; Nagel, R; Liu, YP; van Duijse, J; Drost, J; Griekspoor, A; Zlotorynski, E; Yabuta, N; De Vita, G; Nojima, H; Looijenga, LH; Agami, R. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124:1169-1181, 2006.

39. Ciafrè, AS; Galardi, S; Mangiola, A; Ferracin, M; Liu, CG; Sabatino, G; Negrini, M; Maira, G; Croce, CM; Farace, MG. Extensive modulation of a set of micro-RNAs in primary glioblastoma. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 334:1351-1358, 2005.

40. Chen, CZ; Li, L; Lodish, HF; Bartel, DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303:83-86, 2004.

41. Ren, J; Jin, P; Wang, E; Marincola, FM; Stroncek, DF. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J. Translational Medicine*, 7(20):1-17, 2009.

42. Masaki, S; Ohtsuka, R; Abe, Y; Muta, K; Umemura, T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 364:509-514, 2007.

43. Georgantas III, RW; Hildreth, R; Morisot, S; Alder, J; Liu, CG; Heimfeld, S; Calin, GA; Croce, CM; Civin, CL. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. PNAS, 104:2750-2755, 2007.
44. Wienholds, E; Kloosterman, WP; Miska, E; Alvarez-Saavedra, E; Berezikov, E; de Bruijn, E; Horvitz, HR; Kauppinen, S; Plasterk, RH. MicroRNA expression in Zebrafish embryonic development. Science, 309:310-311, 2005.
45. Naguibneva, I; Ameyar-Zazoua, M; Polesskaya, A; Ait-Si-Ali, S; Groisman, R; Souidi, M; Cuvellier, S; Harel-Bellan, A. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. Nat. Cell Biol., 8:278-284, 2006.
46. Chen, JF; Mandel, EM; Thomson, JM; Wu, Q; Callis, TE; Hammond, SM; Conlon, FL; Wang, DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat. Genet., 38:228-233, 2006,
47. Kim, HK; Lee, YS; Sivaprasad, U; Malhotra, A; Dutta, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. J. Cell Biol., 174:677-678, 2006.
48. Krichevsky, AM; Sonntag, KC; Isacson, O; Kosik, KS. Specific microRNAs modulates embryonic stem cell-derived neurogenesis. Stem Cells, 24:857-864, 2006.
49. Hatfield, SD; Shcherbata, HR; Fischer, KA; Nakahara, K; Carthew, RW; Ruohola-Baker, H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. Nature, 435:974-978, 2005.
50. Park, JK; Liu, X; Strauss, TJ; McKearin, DM; Liu, Q. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germ line stem cells. Curr. Biol., 17:533-538, 2007.
51. O'Connell, RM; Taganov, KD; Boldin, MP; Cheng, G; Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. PNAS, 104:1604-1609, 2007.
52. Taganov, KD; Boldin, MP; Chang, KJ; Baltimore, D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor target to signaling proteins of innate immune responses. PNAS, 103:12481-12486, 2006.
53. Rodriguez, A; Vigorito, E; Clare, S; Warren, MV; Couttet, P; Soond, DR; van Dongen, S; Grocock, RJ; Das, PP; Miska, EA; Vetrie, D; Okkenhaug, K; Enright, AJ; Dougan, G; Turner, M; Bradley, A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. Science, 316:608-611, 2007.
54. Thai, TH; Calado, DP; Casola, S; Ansel, KM; Xiao, C; Xue, Y; Murphy, A; Friendewey, D; Valenzuela, D; Kutok, JL; Schmidt-Supprian, M; Rajewsky, N; Yancopoulos, G; Rao, A; Rajewsky, K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. Science, 316:604-608, 2007.