



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**GENÔMICA FUNCIONAL DE MICRORNAS NO CORAÇÃO DE
VERTEBRADOS: ZEBRAFISH COMO ORGANISMO MODELO**

Pedro Gabriel Nachtigall

Botucatu - SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**GENÔMICA FUNCIONAL DE MICRORNAS NO CORAÇÃO DE
VERTEBRADOS: ZEBRAFISH COMO ORGANISMO MODELO**

Doutorando: Pedro Gabriel Nachtigall

Orientador: Prof. Dr. Danillo Pinhal

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Genética).**

Botucatu - SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nachtigall, Pedro Gabriel.

Genômica funcional de microRNAs no coração de vertebrados : Zebrafish como organismo modelo / Pedro Gabriel Nachtigall. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danillo Pinhal

Capes: 20204000

1. Peixe-zebra. 2. Vertebrado. 3. Transcriptoma.
4. MicroRNAs. 5. Miocárdio. 6. Coração. 7. Genômica.

Palavras-chave: Músculo cardíaco; RNA; RNA não-codificador; Transcriptoma; Vertebrados.

Dedico este trabalho a todos os brasileiros,
que pagam seus impostos corretamente, de forma justa,
e não são coniventes com nenhum tipo de corrupção!

Agradeço:

À minha mãe, Regina, por ter realizado dois papéis, o de pai e o de mãe, por ser um ótimo exemplo, por sempre me apoiar em todas as decisões, por me auxiliar e sustentar em todos os passos da minha vida, inclusive nos primeiros passos, e por todo o amor incondicional. Você é a melhor mãe do mundo.

À minha avó (Terezinha) e meu falecido avô (Washington), pelo eterno carinho e grande exemplo de vida. Vocês estarão vivos na minha memória para sempre.

À minha família que sempre estiveram ao meu lado e me ajudam a seguir com muita sagacidade por essa vida mais linda de meu Deus.

À Andressa, pelo carinho, felicidade, paciência e apoio incondicional. Te amo muito.

Aos irmãos que a vida me deu: Arthur (Messi), Bruno Augusto (Brunão), Daniel (Fral), Juan (Ruanzito), Leonardo (Lééééééo), Luiz Kohler (Patrão), Marcos (Marcola), Octávio (Oct), Rafael (Espeto), Raphael (Ph), vocês são os babacas da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Danillo Pinhal pela oportunidade e incentivo.

Aos professores Dr. Robson Francisco Carvalho, Dr. Alexandre Rossi Paschoal, Dr. Erick da Cruz Castelli e Dr. Rafael Henrique Nóbrega, que aceitaram participar como membros titulares da banca de defesa, e aos professores Dr.^a Claudia Aparecida Rainho, Dr. Marcos Correa Dias e Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf que aceitaram participar como suplentes.

A todo o pessoal do Laboratório de Genômica e Evolução Molecular, do qual fui parte integrante e realizei o presente doutorado.

Ao Dr. Luiz Augusto Bovolenta por me auxiliar no aprendizado de linguagem de programação para desenvolvimento de algoritmos e na aplicação da mesma para resolver os problemas de bioinformática que surgiram no decorrer das análises.

Ao Prof. Dr. Ney Lemke por permitir a utilização das máquinas de seu laboratório computacional para realização das análises de bioinformática.

Aos professores Dr. Guilherme Targino Valente e Dr. Rafael Henrique Nóbrega por aceitarem participar da banca examinadora do exame de qualificação geral.

Ao Prof. Dr. James G. Patton, da *Vanderbilt University*, pela oportunidade e ensinamentos passados durante o estágio supervisionado realizado no período do doutorado.

Aos professores, Ethan Lee, da *Vanderbilt University*, Alexandre Hilsdorf, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Tiana Kohlsdorf, da Universidade de São Paulo, por ceder amostras para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores, José Xavier Neto e Angela Maria Sousa Costa, do Laboratório Nacional de Biociências, por auxiliarem na realização dos ensaios funcionais do presente trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela estrutura cedida para realização dos ensaios funcionais apresentados na presente tese.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), Prof. Dr. Claudio Oliveira e Prof.^a Dr.^a Claudia Aparecida Rainho, por todo o suporte e investimento na carreira dos alunos deste programa e pela cordialidade com que nos trata.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Genética.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação por todas as dúvidas esclarecidas.

Ao Laboratório de Genômica e Evolução Molecular, ao Departamento de Genética, à Pós-graduação em Genética, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à Universidade Estadual Paulista pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida no período de estudo (Processo 2013/06864-7) e pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho (Processo 2012/15589-7).

A todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização e finalização deste trabalho.

Muito Obrigado!!!

“I’ll stare straight into the sun
And I won’t close my eyes
‘Till I understand or go blind”

Dustin Kensrue

RESUMO

Nos vertebrados, o coração é o primeiro órgão a se formar e adquirir função no embrião e todos os eventos subsequentes na vida do organismo dependem de sua atividade. Ao longo da evolução desses animais, incluindo o *Homo sapiens*, o coração adquiriu traços morfofuncionais distintos, resultando em fenótipos característicos nas mais variadas espécies viventes. Entretanto a base molecular que sustenta a variação fenotípica permanece pouco conhecida. Uma vez que o genoma desses animais é relativamente conservado quanto à estrutura e função, é plausível pensar que as variações morfofuncionais resultem, em grande parte, da expressão diferencial de genes e seus reguladores. MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes com importante função na regulação gênica pós-transcricional. Essas moléculas reconhecidamente atuam nos mais variados processos biológicos, incluindo as vias de biogênese e manutenção cardíaca. Contudo, até o momento, são escassos os dados disponíveis que tratam do impacto da atividade de miRNAs no desenvolvimento e evolução do coração de vertebrados. No presente estudo, com o objetivo de gerar novos conhecimentos acerca da base molecular da variabilidade fenotípica do coração, foi realizada a caracterização e análise comparativa das assinaturas de expressão do conjunto total de miRNAs no coração de espécies representativas dos cinco grandes grupos de vertebrados. Para isso, os transcritos de miRNAs de amostras de tecido cardíaco de 13 espécies distintas foram investigados por RNA-seq e detalhadamente analisados por bioinformática. Como resultado, foi verificada a expressão conservada de 32 miRNAs em todas as 13 espécies analisadas, indicando a atuação de forças seletivas mantenedoras sobre essas moléculas reguladoras, cuja importância biológica se manifesta independentemente do tempo de divergência filogenética que separa esses organismos. Adicionalmente, a análise de ontologia gênica revelou que todos os 32 miRNAs conservados possuem funções relacionadas ao desenvolvimento e ritmo cardíaco, características primordiais para explicar a evolução diferencial da morfologia cardíaca. Além disso, analisou-se o papel do miR-129 na regulação da expressão do gene *Bmp4*, importante para o desenvolvimento cardíaco, verificando-se a potencial interação entre essas moléculas *in vivo* em embriões de zebrafish. Análises funcionais entre o miR-129 e os fatores *Tbx*, que estão em andamento, irão contribuir significativamente para a elucidação da participação desse miRNA no tecido cardíaco no genoma de vertebrados.

ABSTRACT

In vertebrates, heart is the first organ to form in the embryo and all subsequent events in the life of an organism depend on its function. Heart has acquired distinct morphological traits during vertebrate evolution, which led to distinct morphology traits in the living species. However, the molecular mechanisms that drive the differential morphology among these species remain uncharted. Taking into consideration the higher level of conservation of the genome among these species, we can infer that the differential expression of genes and regulators lead to the distinct pattern of heart morphology. MicroRNAs (miRNAs) are small molecules with an important role upon post-transcriptional regulation. These molecules have been shown essential for several cellular processes in vertebrates, including cardiac biology, but little is known about the roles of these small molecules in the development and evolution process of vertebrate's heart. In the present study, we characterized the global expression of miRNAs in the heart of species from the five vertebrate groups, (fish, amphibians, reptiles, birds and mammals) and performed an evolutionary comparative analysis of miRNA expression signatures in order to bring novel insights about the molecular basis of heart phenotypic variability. RNA-seq was used to characterize miRNA expression profiles in the heart of 13 vertebrate species and deeply analyzed using bioinformatics. We found 32 miRNAs with conserved expression to all 13 species analyzed, indicating a conserved pathway of these miRNAs despite of the large divergence times isolating these organisms. GO analysis from 32 miRNAs in the human genome revealed that conserved miRNAs has functions on heart development and contraction rate, traits considered crucial for the differential morphology of the heart observed from fish to mammals. Furthermore, we validate the molecular interaction between miR-129 and Bmp4, important gene for the heart development. Moreover, the functional analysis of interaction between miR-129 and Tbx factors will help elucidate the biological importance of miR-129 along heart development in vertebrates.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	01
1.1. O desenvolvimento cardíaco em vertebrados	01
1.2. Rede regulatória do desenvolvimento cardíaco	04
1.3. Características gerais dos microRNAs.....	06
1.3.1. Biogênese e mecanismo de ação	06
1.3.2. Nomenclatura e organização genômica.....	08
1.4. MicroRNAs do tecido cardíaco.....	10
1.5. Genômica funcional	11
1.6. Validação da interação miRNA-alvo.....	13
1.7. Zebrafish como organismos modelo para estudos cardíacos	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo geral.....	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Extração de RNA do tecido cardíaco	19
3.2. Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA	20
3.3. RNA-seq das amostras de tecido cardíaco.....	21
3.4. Análise dos dados de RNA-seq	22
3.5. Análise comparativa do miRNoma cardíaco de vertebrados.....	25
3.5.1. Análise comparativa	25
3.5.2. Predição de alvos	26
3.5.3. Análise de ontologia funcional	27
3.6. Análise funcional de miRNAs.....	28
3.6.1. Seleção de miRNA e seus alvos	28
3.6.2. Morfolino	29
3.6.3. Amplificação do 3'UTR e síntese do vetor de expressão	30
3.6.4. Validação da interação miRNA-alvo.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Caracterização do miRNoma cardíaco de vertebrados	34
4.2. Análise comparativa.	35
4.3. Predição de alvos.....	42
4.4. Análise de ontologia funcional.....	43
4.5. MicroRNAs e a rede regulatória do desenvolvimento cardíaco de vertebrados.....	45
4.6. Análise funcional de miRNAs.....	48
4.6.1. Alvos preditos para o miR-129	48
4.6.2. Ensaio funcional	49
5. CONCLUSÃO FINAL.....	56
6. ATIVIDADES REALIZADAS	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

8. APÊNDICES 68
Apêndice A 68
Apêndice B 69

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. O desenvolvimento cardíaco em vertebrados

O coração é um órgão que possui a função de bombear o sangue por todo o sistema cardiovascular através de sucessivos movimentos de contração. Esse órgão é constituído por três camadas: o endocárdio, o miocárdio e o epicárdio (Xin et al., 2013; Figura 1). O epicárdio é a camada mais externa do coração e é uma delgada lâmina composta por tecido conjuntivo denso revestido externamente por epitélio pavimetnoso simples. O endocárdio é a camada mais interna do coração sendo composta por célula epitelial pavimentosa simples. O miocárdio é a camada responsável pelo movimento de contração e é constituída por fibras musculares estriadas cardíacas (revisado por Xin et al., 2013).

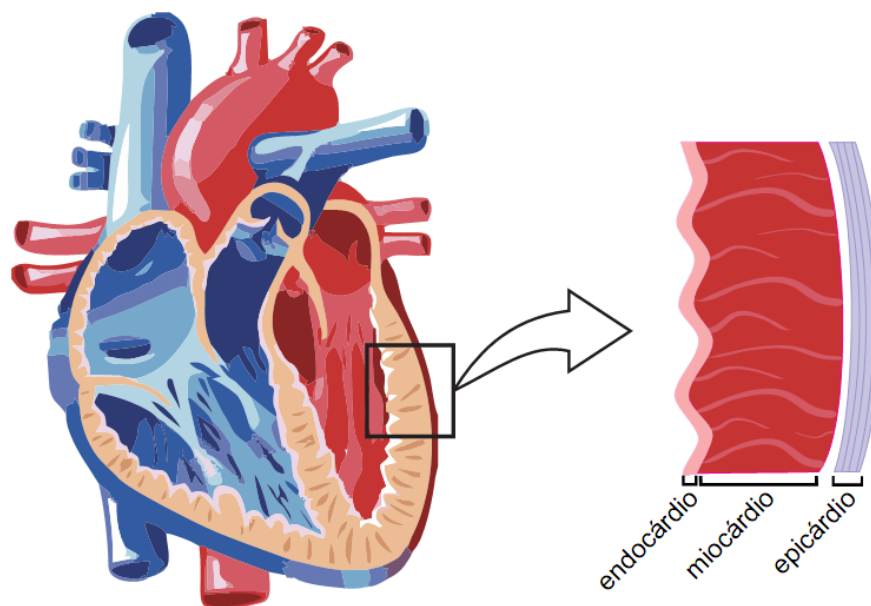


Figura 1. Coração e as três camadas cardíacas.

O coração é o primeiro órgão a se formar e iniciar sua função no embrião, sendo que todos os eventos subsequentes na vida do organismo dependem de seu funcionamento (Olson, 2004). Nesse sentido, qualquer evento que desencadeie

uma má-formação congênita do coração pode resultar em doenças e até na morte do embrião (Olson, 2006).

Evolutivamente, o coração sofreu modificações morfológicas marcantes nos diferentes grupos de vertebrados. Acredita-se na hipótese de que estas modificações sejam decorrentes da adaptação a um estilo de vida mais complexo associado à saída da água para a vida na terra, ao aumento corpóreo, à característica endotérmica e ao aumento da demanda energética (revisado por Olson, 2006; ver Figura 2). Assim, o tecido muscular cardíaco do ancestral comum dos vertebrados, possivelmente representado pelo coração do *Amphioxus*, se assemelhava a uma artéria que com movimentos peristálticos distribuía o sangue através de um fluxo com baixa pressão (Simões-Costa et al., 2005). A partir deste ponto, um coração constituído por um átrio e um ventrículo surgiu posteriormente no grupo dos peixes onde o fluxo sanguíneo percorre as brânquias, para aquisição de oxigênio, e, então, os vasos sistêmicos, para a distribuição de oxigênio (Burggren et al., 2010). Uma circulação pulmonar com uma parcial divisão intracardíaca do sangue pulmonar e do sangue sistêmico surgiu em alguns grupos de peixes (ex., pulmonados; Dipnoi), se desenvolveu nos anfíbios e, principalmente, em répteis, onde se detectam divisões parciais do ventrículo (Jensen et al., 2010). Aves e mamíferos desenvolveram, independentemente, a característica endotérmica e um ventrículo completamente septado. Esse ventrículo completamente septado permitiu um aumento da pressão sanguínea e do batimento cardíaco, o que, acredita-se que tenha propiciado a manutenção da característica endotérmica, devido à alta necessidade energética nesses grupos (Lillywhite et al., 1999).

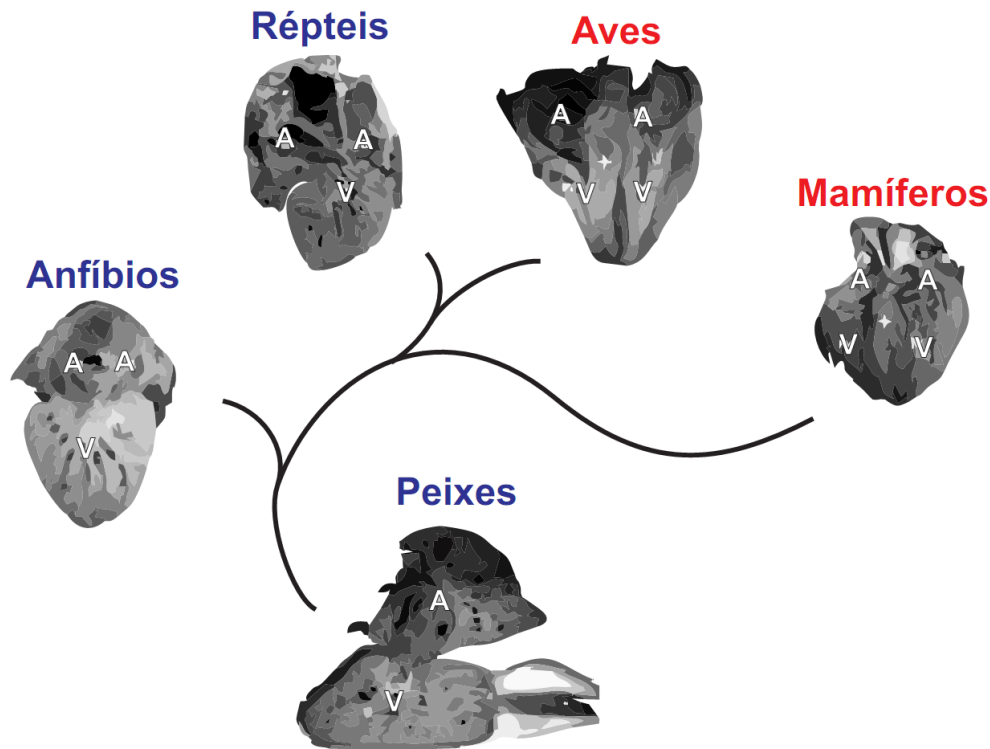


Figura 2. Morfologia cardíaca típica dos vertebrados. Grupos grafados em cor azul são ectotérmicos. Grupos grafados em cor vermelha são endotérmicos. A – átrio; V – ventrículo.

Apesar de o coração apresentar características morfológicas distintas entre os grupos, os eventos iniciais no desenvolvimento cardíaco possuem um padrão ontogenético conservado entre os vertebrados (revisado por Olson, 2006).

O desenvolvimento do coração tem origem a partir do disco embrionário, onde células da mesoderme lateral-anterior migram para a região ventral para formar o tubo cardíaco, o qual inicia um processo de giro formando um coração tubular em “S” (Moore e Persaud, 2004). Após esse processo, tem início a fase de compartimentação cardíaca, onde ocorre a diferenciação entre átrio e ventrículo, cuja morfologia final aumenta em complexidade de acordo com a complexidade da espécie (revisado por Jensen et al., 2013). Ou seja, morfologicamente, o coração de espécies basais se assemelha ao formado durante etapas iniciais do desenvolvimento cardíaco de espécies fisiologicamente mais complexas (Franco et

al., 2002; Icardo, 2006; Kohiba-takeushi et al., 2009). Além disso, padrões ontogenéticos bastante similares quanto à atividade elétrica cardíaca foram observados entre espécies pertencentes a vários grupos de vertebrados (Christoffels et al., 2010).

Adicionalmente, diversos estudos trouxeram evidências de que essa conservação fisiológica se estende aos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento cardíaco (Moorman et al., 2003; Afouda e Hoppler, 2009; Grimes e Kirby, 2009; Bakkers, 2011). Por exemplo, vários genes, tais como *Bmp4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Hand*, *Gata4*, *Pitx2* e os fatores *Tbx*, tiveram sua expressão e funcionalidade detectada em etapas cruciais ao longo do desenvolvimento cardíaco em peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (Bruneau, 2002; Franco e Campione, 2003; Jensen et al., 2013). Estes estudos trouxeram indícios para a formulação de uma rede regulatória conservada e responsável pelo controle do desenvolvimento cardíaco em vertebrados.

1.2. Rede regulatória do desenvolvimento cardíaco

O desenvolvimento e formação de órgãos é resultado de passos específicos de regulação gênica que dirigem o destino celular e organizam tipos celulares especializados em uma unidade tri-dimensional complexa em estrutura e função. Estudos dos elementos genéticos relacionados ao desenvolvimento cardíaco em vertebrados revelaram um padrão evolutivamente conservado nas vias regulatórias, constituindo conexões funcionais entre fatores transcricionais miogênicos, seus alvos e genes de sinalização que dirigem o destino de células cardíacas, diferenciação e morfologia cardíaca (Cripps e Olson, 2002). Análises comparativas dos genes que regulam o desenvolvimento cardíaco e seus elementos cis-

reguladores demonstram a conservação das vias genéticas que dirigem a cardiogênese (Olson, 2006).

O desenvolvimento cardíaco é governado por um conjunto de fatores transcricionais conservados (Nkx, Mef2, Gata, Tbx e Hand) que controlam o destino de células cardíacas, a expressão de genes codificadores de proteína e a morfologia de estruturas cardíacas, sendo, assim, considerados reguladores-chave desse processo (Figura 3). Estes fatores transcricionais também regulam a expressão de genes que servem como estabilizadores da rede regulatória do sistema cardíaco (Cripps e Olson, 2002; Bruneau, 2002; Buckingham et al., 2005). Além disso, sabe-se que outros fatores transcricionais contribuem para o processo de cardiogênese auxiliando esses reguladores-chave (Boogerd et al., 2009).

Nos últimos anos, entretanto, além da análise de fatores transcricionais e interações proteína-proteína, os estudos com RNAs não-codificadores têm adquirido uma importância cada vez maior devido às suas funções regulatórias. Dentre os diversos tipos de RNAs não-codificadores conhecidos, os genes de miRNA têm sido reconhecidos como reguladores em diversos processos do desenvolvimento animal, inclusive do desenvolvimento cardíaco (Giraldez et al., 2005; Wienholds et al., 2005; Darnell et al., 2006; Olson, 2006). Entretanto, estudos integrando os miRNAs nas redes regulatórias da fisiologia cardíaca ainda são escassos.

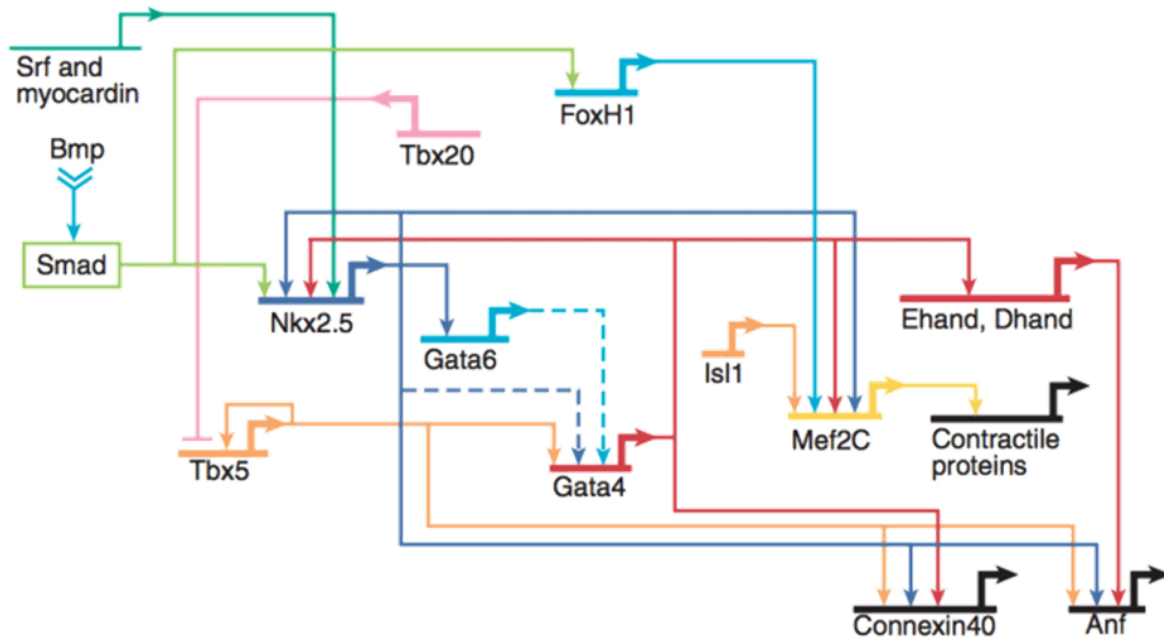


Figura 3. Rede regulatória conservada do desenvolvimento cardíaco. No exemplo estão os reguladores-chave (ex.: Nkx), os reguladores auxiliares (ex.: Smad) e as proteínas funcionais do tecido cardíaco (em preto). Imagem modificada de Erwin e Davidson (2009).

1.3. Características gerais dos microRNAs

1.3.1. Biogênese e mecanismo de ação

A biogênese de um miRNA começa com a síntese de um longo transcrito primário conhecido como pri-miRNA (~110pb). Os pri-miRNAs são transcritos pelas RNAs polimerase II ou III (Lee et al., 2003; Cai et al., 2004; Kim, 2005; Borchert et al., 2006), possuem uma estrutura de *hairpin* (“grampo de cabelo”), que é essencial para o reconhecimento das enzimas de processamento de miRNAs. No núcleo, o pri-miRNA é processado para pré-miRNA (~70pb), pela ação da enzima Drosha (Landthaler et al., 2004; Zeng e Cullen, 2005; Han et al., 2006). A Drosha reconhece e cliva as extremidades de pequenas estruturas de RNA em forma de *hairpin* formadas durante o processo de transcrição (Lee et al., 2006). Após o processamento nuclear, cada pré-miRNA, é exportado para o citoplasma através da

proteína Exportin-5 (Lund et al., 2004), que realiza o transporte de pequenos RNAs em forma de *hairpin* do núcleo para o citoplasma (Yi et al., 2003). O pré-miRNA é reconhecido pela enzima Dicer que cliva a região do loop, resultando em uma molécula de dupla fita de RNA (dsRNA; ~22pb). Esse processo recruta proteínas da família argonauta (Ago) para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (Kim et al., 2009). O RISC se liga a uma das duas fitas do dsRNA para gerar o miRNA maduro (miR canônico ou miR-5p), que atua na regulação de um RNAm alvo (Krutzfeldt et al., 2006), enquanto a outra fita (miR* ou miR-3p) é degradada ou também pode formar outro RISC e realizar a regulação de outro RNAm alvo (Rand et al., 2005; Yang et al., 2011).

Uma via alternativa de processamento de miRNAs independente do processamento pela Droscha foi descrita. Nessa via, o pré-miRNA é, constitutivamente, o intron completo de um gene. O processamento para pré-miRNA ocorre pela maquinaria de *splicing* celular. Esses miRNAs que não necessitam da ação pela enzima Droscha são chamados de miRtrons (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007).

Geralmente, o complexo miRISC (miRNA + RISC) interage com sítios ligantes da região 3'-UTR do RNAm alvo (Lim et al., 2005; Lee e Dutta, 2009), embora alguns poucos miRNAs descritos realizem o pareamento na região 5'-UTR (Bari et al., 2006). A interação entre o RNAm alvo e o complexo miRISC ocorre devido à complementaridade total ou parcial de uma seqüência de 5-7 nucleotídeos (região "seed") do miRNA e do RNAm alvo (Sen e Blau, 2005; Lee e Dutta, 2009). A partir de algoritmos desenvolvidos para predição de alvos de miRNAs, estima-se que cada miRNA possa se ligar a muitos RNAs mensageiros, e que os RNAs

mensageiros podem ter sua estabilidade ou tradução regulada por mais de um miRNA (Doench et al., 2004; Brennecke et al., 2005).

1.3.2. Nomenclatura e organização genômica

Os miRNAs são nomeados como miR- mais números (ex: miR-133), entretanto, existem algumas exceções. Os miRNAs de sequências similares são geralmente distinguidos por uma letra adicional seguida do número (ex: miR-133a). Um miRNA com uma sequência madura idêntica pode aparecer em diferentes locus genômicos com diferentes sequências precursoras. Nesses casos, os diferentes genes de miRNAs são usualmente distinguidos por outro número adicional no final da sequência (ex: miR-133a-1). Além disso, para se determinar de qual espécie aquele miRNA pertence, adiciona-se a primeira letra no gênero seguido das duas primeiras letras da espécie no início da sequência do nome (ex: dre-miR-133a-1). No caso, o nome dre-miR-133a-1 indica que estamos referenciado o gene de miRNA miR-133a presente no locus genômico um da espécie *Danio rerio* (zebrafish).

Estudos iniciais mostraram que o let-7 é um miRNA conservado as entre espécies (Reinhart et al., 2000). Dados subsequentes descreveram a existência de um número variável de cópias parálogas desse miRNA em diversas espécies de metazoários (Pasquinelli et al., 2000; Griffiths-Jones, 2006; Thatcher et al., 2008). O mapeamento da sequência precursora do let-7 e sua localização genômica em múltiplas espécies forneceu um *insight* inicial na descoberta de miRNAs utilizando ferramentas genômicas. Além disso, essas análises demonstraram a conservação da sequência do pré-let-7, auxiliando na compreensão da estrutura secundária de

moléculas de RNA necessárias para o processamento de pré-miRNAs em miRNAs maduros.

Concomitantemente à descoberta dos primeiros miRNAs, houve avanços significativos nas tecnologias de seqüenciamento de última geração e algoritmos de predição de genes, resultando no atual registro de mais de 28141 miRNAs de 193 espécies, sendo aproximadamente 50% de vertebrados (miRBase versão 21 - agosto 2014; Griffiths-Jones et al., 2008).

De modo geral, os miRNAs são abundantes e altamente conservados entre os vertebrados estudados (Heimberg et al., 2008). Diversos exemplos de conservação da composição nucleotídica dos genes de miRNA e de funções dos transcritos gerados foram detectadas entre zebrafish, ratos e humanos, para os quais são conhecidos cerca de 250, 680 e 1900 miRNAs, respectivamente (Mansfield et al., 2004; Pearson et al., 2005; Tanzer et al., 2005; Woltering e Durston, 2008).

A existência de muitos genes de miRNAs conservados compartilhados por diversos grupos de vertebrados sugere sua participação em processos celulares e ontogenéticos vitais comuns a esses organismos (Heimberg et al., 2010). Como consequência, o conhecimento gerado a partir da análise de miRNAs conservados isolados de espécies de peixes, por exemplo, pode ser utilizado em inferências evolutivas e extrapolado para os demais grupos de vertebrados, inclusive humanos.

Em contrapartida, diversos miRNAs não conservados (i.e., "linhagem-específicos") foram também detectados em peixes, aves, répteis e mamíferos. Acredita-se que esses miRNAs evolutivamente divergentes poderiam desempenhar um papel no estabelecimento e manutenção da diversidade fenotípica entre os

diferentes grupos de organismos (Plasterk et al., 2006; Sempere et al., 2006; Xia et al., 2011).

Essas características inerentes aos miRNAs os tornam elementos eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em diversos processos biológicos (Esau et al., 2006).

1.4. MicroRNAs no tecido cardíaco

Alguns miRNAs são especificamente e/ou altamente expressos no tecido muscular estriado (van Rooij et al., 2008). Destes, muitos foram descritos como importantes reguladores do desenvolvimento cardíaco (van Rooij et al., 2007; Callis e Wang, 2008; Small et al., 2010; Cao et al., 2012). Esses miRNAs foram validados por experimentos *in silico* (Lin et al., 2014), *in vitro* em células cardíacas de camundongo e humano (Ivey et al., 2008; Shan et al., 2010; Hosoda et al., 2011; Sluijter et al., 2011; Synnergren et al., 2011), e *in vivo* em camundongo e galinha (Zhao et al., 2005; Darnell et al., 2006; Liu et al., 2008; Qian et al., 2011).

Particularmente, os miRNAs miR-1, -133, -208 e -499 possuem reconhecida função no tecido cardíaco em desenvolvimento e em adultos. Sabe-se que esses miRNAs estão envolvidos na homeostasia, regeneração, diferenciação, apoptose e doenças (van Rooij et al., 2009; Sayed e Abdellatif, 2011). Somado a isso, outros miRNAs expressos (e.g., miR-21, -29, -30, -130 e -199) mas não exclusivos do músculo cardíaco, também estão envolvidos direta ou indiretamente no desenvolvimento e diferenciação desse órgão (Sayed e Abdellatif, 2011; Ketley et al., 2013). Entretanto, a maioria desses estudos foi realizada em aves e mamíferos.

Em peixes, os poucos estudos sobre miRNAs no músculo cardíaco são restritos à zebrafish. Estes estudos realizaram uma análise funcional dos miRNAs

miR-23, -138, -143 e -218 no desenvolvimento cardíaco (Morton et al., 2008; Deacon et al., 2010; Fish et al., 2011; Lagendijk et al., 2011; Chiavacci et al., 2012), enquanto um único estudo investigou o envolvimento do miR-133 na regeneração cardíaca em indivíduos adultos (Yin et al., 2012).

Nesse sentido, a investigação dos miRNAs especificamente ou altamente expressos no músculo cardíaco pode contribuir para a compreensão da base molecular de vias regulatórias evolutivamente conservadas relacionadas à manutenção das características morfofisiológicas particulares do tecido cardíaco em vertebrados. Esses estudos podem também trazer subsídios para investigações direcionadas à análise da desregulação da expressão de miRNAs e doenças cardíacas associadas.

1.5. Genômica funcional

Os recentes avanços nas tecnologias de sequenciamento em larga escala e as novas metodologias de bioinformática para análise dos dados, facilitaram e resolução de genomas inteiros em pouco tempo (Mardis, 2011).

Embora esta abordagem genômica tenha grande potencialidade para estudos comparativos e de anotação gênica, ela não propicia a completa elucidação de vias e processos biológicos (Hass et al., 2008). Isso porque diferentes tecidos e tipos celulares, embora possuam o mesmo genoma, podem apresentar padrões transcricionais completamente distintos. Dessa maneira surgiu a área de estudos de genômica funcional, que têm por definição compreender e elucidar a função dos genes e suas relações para determinação de um fenótipo específico (Hass et al., 2008). Os estudos de genômica funcional são caracterizados por abordagens que geralmente envolvem métodos em larga escala. Assim, o desenvolvimento de

técnicas de sequenciamento dos transcritos de RNA (transcriptoma) em larga escala (RNA-seq) permite uma análise mais fidedigna acerca da parcela do genoma funcionalmente ativo nos mais diversos tecidos e tipos celulares dos diferentes organismos (Schunter et al., 2014; Staiger et al., 2015).

Dentre as metodologias de RNA-seq disponíveis, o sequenciamento de pequenos RNAs surgiu como uma poderosa estratégia para identificar e quantificar miRNAs. Por permitirem análises em larga escala, essas tecnologias facilitaram a descoberta de novos miRNAs, mesmo os espécie-específicos e de reduzida expressão, em diversos organismos pertencentes aos mais diversos táxons (Berezikov, 2011). Assim, esta abordagem propiciou um salto para a caracterização de todo o miRNoma em diferentes tecidos de diferentes espécies (revisado em Berezikov, 2011), auxiliando na compreensão detalhada sobre a estrutura e funcionalidade dos genomas e de suas variadas vias regulatórias em diversos processos biológicos.

Além disso, a comparação direta do conjunto de miRNAs expressos em um mesmo tecido em diferentes espécies permite a identificação de vias regulatórias conservadas em grupos filogeneticamente distintos (Sudmant et al., 2015). A presença de tais vias conservadas, mesmo sob ação da seleção natural, indica a participação dos miRNAs em mecanismos básicos nesses organismos., Essa abordagem comparativa ainda permite extrapolações e demonstra a potencialidade do uso de espécies modelo não-humanas para validação de processos biológicos ontogenéticos comuns aos vertebrados.

1.6. Validação da interação miRNA-alvo

A abordagem de genômica funcional por RNA-seq, representa um importante passo para a identificação do miRNoma de um órgão de uma determinada espécie. Entretanto, esse tipo de análise não é assertivo o suficiente para se identificar e validar a função específica de um miRNA em uma via biológica. Dessa forma, estratégias experimentais de genética reversa foram estabelecidas para a análise da função de miRNAs específicos e seus alvos em variados tecidos e etapas do desenvolvimento.

Uma abordagem amplamente utilizada nos estudos funcionais de miRNAs é o tratamento de amostras com inibidores e mimetizadores de miRNA e a observação das alterações fenotípicas resultantes. Em outras palavras, este tipo de análise funcional permite estabelecer a conexão entre miRNAs e efeitos fenotípicos específicos no organismo.

Juntamente a isso, a validação da interação entre um miRNA e seu alvo tem sido realizada com sucesso a partir da utilização de vetores ou cassetes de expressão contendo genes repórteres fluorescentes (e.g., GFP) e a sequência 3'UTR do RNA mensageiro alvo de interesse (Kloosterman et al., 2007; Thatcher et al., 2008b; Pase et al., 2009; Staton et al., 2011). Essa análise consiste em se verificar a expressão do GFP na presença e ausência do miRNA em questão. Se o miRNA está presente, espera-se não relatar a expressão do GFP, e se o miRNA está ausente espera-se que a expressão de GFP esteja ativa. Assim, essa união de dados, permite confirmar a interação miRNA-alvo.

A combinação de ambas as técnicas nos permitem inferir a funcionalidade de um miRNA e seus alvos em um determinado processo biológico, tanto *in vitro*, utilizando-se cultura de células, quanto *in vivo*, utilizando-se embriões de animais.

Destaca-se a utilização de embriões de zebrafish para realização das análises funcionais de validação da interação miRNA-alvo.

1.7. O zebrafish para estudos funcionais de miRNA

Diversos estudos têm utilizado a espécie *Danio rerio*, conhecido como zebrafish ou paulistinha, como organismo modelo para auxiliar na compreensão de diversos processos biológicos do desenvolvimento (Liu e Stainier, 2012). Essa espécie possui diversas vantagens para o estudo do desenvolvimento cardíaco, a saber: (1) embrião transparente: o desenvolvimento externo do zebrafish permite uma visualização não-invasiva de qualquer tecido a ser analisado (Beis e Stainier, 2006); (2) o embrião não necessita do sistema cardiovascular durante o desenvolvimento para suprir suas necessidades de oxigênio, assim, mesmo embriões com mutações críticas no tecido cardíaco podem sobreviver e continuar a se desenvolver normalmente, permitindo analisar o fenótipo final obtido (Liu e Stainier, 2012); (3) genoma sequenciado e alta similaridade com o genoma humano (Howe et al., 2013); (4) conservação nos mecanismos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento cardíaco, apesar da diferença morfológica distinta entre os vertebrados; (5) fácil aplicação de técnicas moleculares como transgenia, transplante de células e experimentos funcionais, tanto para genes codificadores de proteína quanto para genes não-codificadores de proteína; (6) baixo custo e fácil manipulação para se manter em biotério; e (7) rápida taxa de desenvolvimento. Estas particularidades tornaram o zebrafish um modelo robusto e de baixo custo (Wienholds et al., 2005; Giraldez et al., 2006; Mishima et al., 2009). Além disso, as etapas do desenvolvimento e os respectivos fenótipos padrão (i.e., normais) de

cada etapa encontram-se muito bem caracterizados em zebrafish (Kimmel et al., 1995; Miura e Yelon, 2011; Asnani e Peterson, 2014).

Assim, a análise funcional da interação de miRNA-mRNA alvo *in vivo* utilizando-se zebrafish como organismo modelo apresenta grande potencial para responder questões fundamentais do desenvolvimento cardíaco de vertebrados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Considerando-se o papel fundamental desempenhado por miRNAs na regulação de diversas vias biológicas e sua relação com o aumento da complexidade das redes regulatórias, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de miRNAs no tecido cardíaco de espécies pertencentes aos diferentes grupos de vertebrados, assim como validar o papel funcional de interações miRNA-genes alvo selecionadas.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar o perfil de expressão de miRNAs no músculo cardíaco de 13 espécies representantes dos grandes grupos de vertebrados (teleósteis, anfíbios, répteis, aves e mamíferos) por RNA-seq
- Identificar a ontologia funcional dos miRNAs a partir dos alvos preditos com perfil de expressão no tecido cardíaco de vertebrados
- Identificar miRNAs que tenham como alvo genes importante para o coração
- Integrar os dados de miRNAs à rede regulatória do desenvolvimento cardíaco de vertebrados
- Verificar a interação miRNA-alvo entre o miRNAs e seus potenciais alvos utilizando zebrafish como modelo

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise genômica funcional e comparativa, foram utilizados dados de RNA-seq de pequenos RNAs do tecido cardíaco de 10 espécies de vertebrados disponíveis no banco de dados do NCBI (ver Tabela 1 para maiores detalhes). Somado a isso, no presente estudo foi realizado sequenciamento do miRNoma cardíaco de outras três espécies que não possuíam dados disponíveis. A análise dos dados permitiu a seleção de miRNA específico para realização de análise funcional para validação da interação miRNA-alvo utilizando zebrafish como modelo biológico. O *workflow* utilizado nas análises do presente estudo está sumarizado na Figura 4.

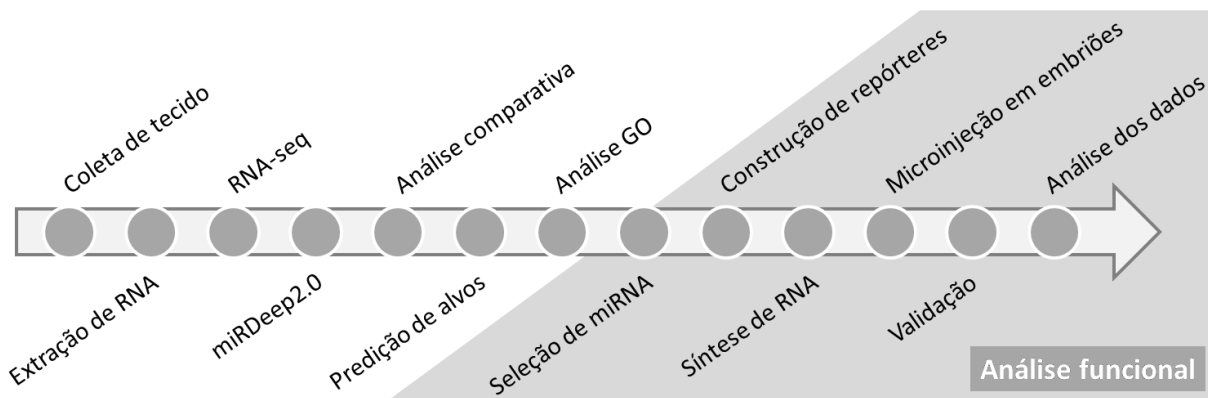


Figura 4. Fluxograma da análise genômica funcional abordada no presente estudo.

Para as bibliotecas de sequenciamento das amostras não disponíveis em bancos de dados, foram utilizadas as seguintes amostras de RNA: dez indivíduos adultos da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), sendo cinco machos e cinco fêmeas com idade aproximada de seis meses; dez indivíduos da espécie *Tropidurus torquatus* (lagarto), sendo seis machos e quatro fêmeas com idade em torno de sete meses; e seis indivíduos da espécie *Xenopus laevis* (sapo), todos machos e com idade superior a quatro meses. Os espécimes de tilápia foram

obtidos na fazenda de piscicultura Royal Fish (Jundiaí, SP), foram mantidos em aquários individuais, à temperatura de 25°C e ciclos de luminosidade de 12 horas, no Biotério do Laboratório Genômica Integrativa do Departamento de Morfologia, IB, UNESP, Botucatu, SP. As amostras de RNA de *T. torquatus* foram obtidas junto ao Laboratório de Evolução de Tetrápodes, USP, Riberão Preto, SP, através da colaboração com a Prof^a. Dr^a. Tiana Kohlsdorf. As amostras de RNA de *X. laevis* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ethan Lee, da Vanderbilt University, Nashville, TN, EUA. Todos os experimentos foram aprovados pela CEUA local (protocolo 352/11).

Tabela 1. Datasets gerados e utilizados para identificação de miRNAs expressos no músculo cardíaco de vertebrados.

Nome da espécie	Nome comum	Grupo taxonômico	Literatura	Número de acesso	Referência
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia	Peixe	Não	-	Presente estudo
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	Peixe	Sim	SRX685389	Desvignes et al., 2014
<i>Salmo salar</i>	Salmão	Peixe	Sim	SRX285795	Andreassen et al., 2013
<i>Xenopus tropicalis</i>	Sapo	Anfíbio	Sim	GSE56680	Warnefors et al., 2014
<i>Xenopus laevis</i>	Sapo	Anfíbio	Não	-	Presente estudo
<i>Tropidurus torquatus</i>	Lagarto	Réptil	Não	-	Presente estudo
<i>Gallus gallus</i>	Galinha	Ave	Sim	GSE40499	Meunier et al., 2013
<i>Taeniopygia guttata</i>	Tentilhão	Ave	Sim	Requisitado pessoalmente	Luo et al., 2012
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Ornitorrinco	Mamífero	Sim	GSE40499	Meunier et al., 2013
<i>Monodelphis domestica</i>	Gambá	Mamífero	Sim	GSE40499	Meunier et al., 2013
<i>Mus musculus</i>	Camundongo	Mamífero	Sim	GSE40499	Meunier et al., 2013
<i>Macaca mulatta</i>	Rhesus	Mamífero	Sim	GSE40499	Meunier et al., 2013
<i>Homo sapiens</i>	Humano	Mamífero	Sim	GSE40499	Meunier et al., 2013

Para a manipulação, as tilápias foram anestesiadas com MS222 (triclaína) (Sigma, EUA) e sacrificadas por imersão em água e gelo, coletadas as amostras de coração. No momento da retirada dos tecidos, tomou-se o cuidado de coletar todo o órgão, retirando o sangue presente no tecido, através de banhos sucessivos em solução fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9%, no intuito de evitar possível contaminação de RNA sanguíneo nas amostras. Todos os tecidos coletados foram preservados inicialmente em nitrogênio líquido (-180°C), durante o período de coleta, e, posteriormente, estocados a -80°C em ultrafreezer.

3.1. Extração de RNA do tecido cardíaco

Para o isolamento do RNA total utilizou-se o método de extração orgânica com *TRI Reagent*® (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo o método descrito por Chomczynski (1993) com algumas modificações. Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril livre de RNAses, de modo a evitar a degradação do RNA das amostras. No procedimento foi adicionado 1ml de *TRI Reagent*® a um criotubo de 4,5ml contendo todo aproximadamente 20mg de tecido. Em seguida, o tecido foi homogeneizado com o auxílio do aparelho *Ultra-Turrax* (Ika, Alemanha). Após a homogeneização, o material foi mantido à temperatura ambiente por 5min. A mistura foi então transferida para um novo tubo (de 1,5ml) contendo 200µl de clorofórmio. O material foi novamente homogeneizado por inversão durante 15s, e estabilizado por 3min à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada centrifugação a 12000rpm por 15min a 4°C, e da mistura trifásica formada, transferiu-se apenas o sobrenadante (aproximadamente 500µl) para um novo tubo de 1,5ml contendo 500µl de álcool isopropílico. O conteúdo foi invertido durante 30s, mantido por 10min à temperatura ambiente, e centrifugado a 12000rpm por 10min a 4°C. Nesta etapa o

sobrenadante foi descartado e gotículas remanescentes removidas com o auxílio de papel autoclavado enrolado, tomando-se o cuidado de não encostar o papel no *pellet*. Após foi adicionado ao *pellet* 1ml de etanol 75%, seguido de centrifugação a 7500rpm por 5min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e novamente foi utilizado papel autoclavado para remoção de gotículas, mantendo-se o tubo por 5min à temperatura ambiente para completar a secagem. Na etapa final, o *pellet* contendo o RNA oriundo de cada amostra foi eluído em água ultra-pura. Todas as amostras foram estocadas em ultrafreezer a -80°C.

3.2. Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA

A quantificação e a verificação de contaminação das amostras de RNA total obtidas foram analisadas através do equipamento *NanoDrop 1000* (Thermo-Scientific). Esse equipamento quantifica o *pool* total de RNA contido em cada amostra individual, além de verificar se há contaminação por proteínas e/ou solventes orgânicos como álcool/clorofórmio/Trizol, através da comparação das razões de absorbância a 260/280nm e 230/280nm, respectivamente.

Sabe-se que a degradação do RNA é um processo gradual, independente de contaminação no momento da realização da extração e que interfere diretamente nos resultados finais da metodologia de RT-qPCR (Imbeaud et al., 2005; Ibberson et al., 2010). Assim, uma análise da integridade do RNA utilizado é necessária. Para realização da análise de integridade do RNA extraído foi utilizado o aparelho *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA), que avalia o número de integridade do RNA (*RNA integrity number* - RIN). Esse valor numérico é gerado a partir da análise de dados de fluorescência dos RNAs ribossomais contidos na amostra, após corrida em gel por microfluidos. Os valores de RIN variam entre 10 (RNA intacto) e 1 (RNA

totalmente degradado). Em experimentos que envolvam a extração de RNA de amostras de tecido animal, como no caso do tecido muscular cardíaco, valores de RIN >7 são considerados adequados para a realização de RNA-seq (Schroeder et al., 2006). Os dados referentes à qualidade e integridade das amostras de RNA utilizadas no presente estudo estão apresentados no Apêndice A.

3.3. RNA-seq das amostras de tecido cardíaco

A reação de RNA-seq foi realizada pela contratação do serviço da empresa LC Sciences, EUA, para sequenciamento de miRNAs através do equipamento Genome Analyzer Iix, Illumina, utilizado pela empresa. Para construção das bibliotecas de miRNAs foi utilizado o kit Small RNA Sample v.15 (Illumina, EUA) segundo as instruções do fabricante. O RNA previamente isolado foi fracionado em fragmentos de diferentes tamanhos a partir de eletroforese em gel de acrilamida. A porção do gel correspondente aos fragmentos com tamanho variando de 15 a 30 nucleotídeos (a maioria miRNAs) foi excisada do gel. Os fragmentos de pequenos RNAs foram recuperados por resfriamento overnight em solução salina, seguido por extração, precipitação e filtração em micropore. Após eluídos em água DEPC, foram ligados adaptadores às extremidades 3' e 5' dos fragmentos dos pequenos RNA isolados. Com a ligação dos adaptadores à ambas extremidades, primers com complementaridade à sequência dos adaptadores (fornecidos no kit) foram então utilizados para a transcrição reversa e amplificação seletiva de fragmentos de pequenos RNAs por PCR (RT-PCR). Os fragmentos de cDNA construídos foram purificados e se constituíram nas bibliotecas que foram validadas quanto à pureza, concentração e tamanho dos fragmentos de pequenos RNAs no sistema 2100

Bioanalyzer, utilizando o *chip DNA-1000* (Agilent, EUA). As quais foram utilizadas no sequenciamento de pequenos RNAs.

3.4. Análise dos dados de RNA-seq

Todo o conjunto de dados de sequenciamento gerado somado aos dados obtidos na literatura (sumarizados na Tabela 1) foram analisados utilizando-se um *workflow* específico (Figura 5) que permite a identificação de novos genes de miRNAs e a detecção de diferenças mínimas nos níveis de expressão de miRNAs previamente descritos em outras espécies e disponíveis no banco de dados do miRBase (<http://www.mirbase.org/>; release 21, junho de 2014; Kozomara e Griffiths-Jones, 2014).

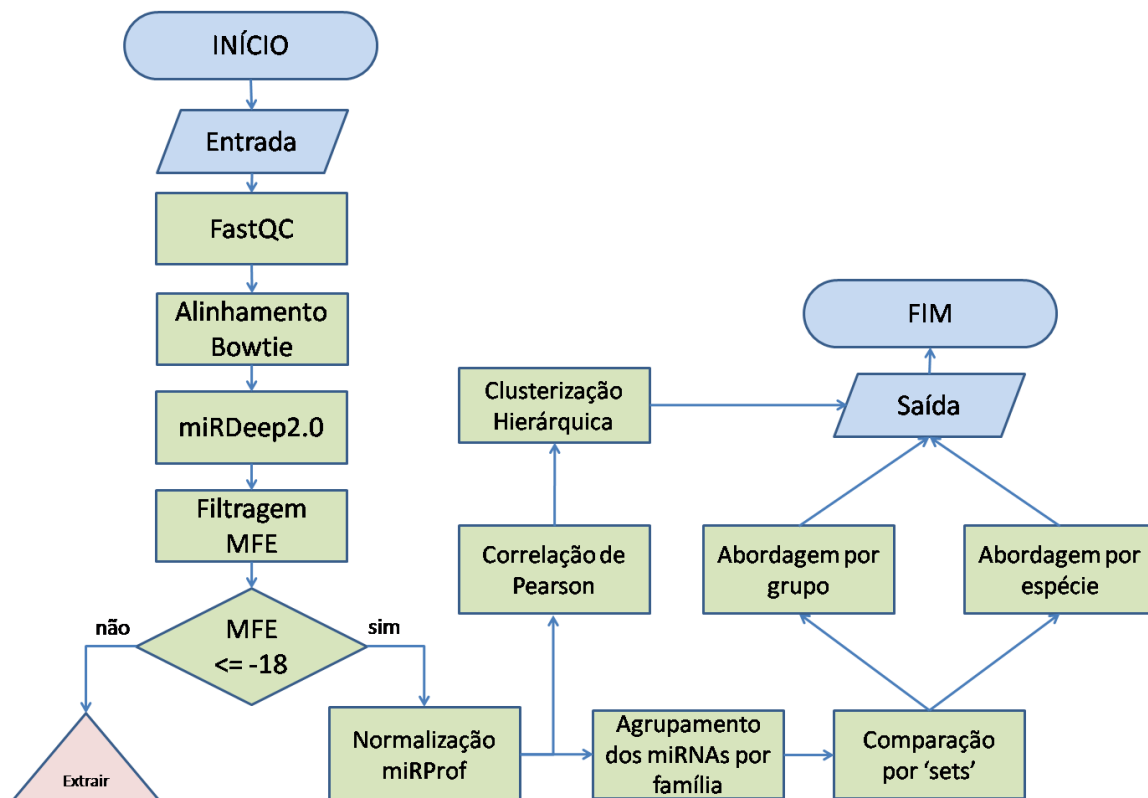


Figura 5. Fluxograma da análise dos dados obtidos por RNA-seq.

O *workflow* teve início com a análise da qualidade do sequenciamento utilizando-se o algoritmo FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Tal etapa permitiu a remoção de *reads* de baixa qualidade, ou seja, *reads* que apresentaram um Phred Score inferior a 30 foram excluídas da análise. A remoção dos adaptadores utilizados para o sequenciamento foi realizada utilizando-se o algoritmo FASTX-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Sequências de tamanho inferior a 18 nucleotídeos foram também removidas da análise, já que não poderiam constituir miRNAs íntegros ou representariam erros de leitura do sequenciador. Após esses dois passos, uma segunda rodada de análise da qualidade foi executada para checagem das *reads* pré-processadas com o FastQC.

As *reads* de miRNAs trimadas foram então alinhadas contra o genoma da respectiva espécie de origem utilizando-se o algoritmo Bowtie (Langmead et al., 2008). Previamente foi realizada a indexação dos genomas para o correto mapeamento das *reads*. Nesta etapa, foram considerados somente os alinhamentos sem *mismatches*. Informações referentes aos genomas utilizados para a análise estão compiladas na Tabela 2.

Tabela 2. Genomas utilizados para a análise com o miRDeep2.

Nome da espécie	Nome comum	Assembly atual	Banco de dados	Tamanho do genoma (Mb)	Versão
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilápia	Grupos de ligação	USCS	815	Orenil2.0, Jan 2014
<i>Danio rerio</i>	Zebrafish	Cromossomo	Ensembl	1505	GRCz10, Set 2014
<i>Salmo salar</i>	Salmão	Scaffold	NCBI	1203	AGKD00000000.4
<i>Xenopus tropicalis</i>	Sapo	Grupos de ligação	Ensembl	1358	JGI 4.2, Nov 2009
<i>Xenopus laevis</i>	Sapo	Scaffold	XenBase	1482	Xenla 6.0, Nov 2013
<i>Tropidurus torquatus</i>	Lagarto	Cromossomo	Ensembl	1701	AnoCar2.0, Maio 2010
<i>Gallus gallus</i>	Galinha	Cromossomo	Ensembl	1072	Galgal4, Nov 2011
<i>Taeniopygia guttata</i>	Tentilhão	Cromossomo	Ensembl	1222	taeGut3.2.4, Ago 2008
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Ornitorrinco	Grupos de ligação	Ensembl	1917	OANA5, Dez 2005
<i>Monodelphis domestica</i>	Gambá	Cromossomo	Ensembl	3501	monDom5, Out 2006
<i>Mus musculus</i>	Camundongo	Cromossomo	USCS	3482	GRCm38, Jan 2012
<i>Macaca mulatta</i>	Rhesus	Cromossomo	Ensembl	3093	MMUL 1.0, Fev 2006
<i>Homo sapiens</i>	Humano	Cromossomo	USCS	3543	GRCh38, Dez 2013

Na etapa de identificação de miRNAs, foi utilizado o algoritmo miRDeep2 (Friedlander et al., 2012). Este permite a identificação de miRNAs conhecidos, previamente descritos no miRBase (versão 21, <http://www.mirbase.org/>) em espécies relacionadas e/ou distantes, assim como a identificação de possíveis novos miRNAs. Após essa etapa, foi realizada a extração da sequência nucleotídica referente ao pré-miRNA para verificação de uma estrutura secundária passível de participação no processo de biogênese de miRNA. Para isto utilizou-se o algoritmo RNAfold (Lorenz et al., 2011), revelando a estrutura secundária dessa molécula de RNA e o valor de energia livre mínima (MFE – *minimum free energy*). Além disso, foi realizado um cálculo estatístico para validação da estrutura secundária da molécula com o algoritmo Randfold (Bonnet et al., 2004), auxiliando a confirmar a sequência

precursora detectada como um miRNA. A normalização de expressão para os miRNAs detectados foi realizada utilizando o algoritmo miRProf presente no programa *UEA sRNA workbench v3.2* (Stocks et al., 2012).

3.5. Análise comparativa do miRNoma cardíaco de vertebrados

3.5.1. Análise comparativa

Todo o conjunto de dados de sequenciamento gerado e analisado foi submetido a uma análise comparativa. Para a realização dessa análise, foi desenvolvido um algoritmo utilizando-se a linguagem *Python*. O algoritmo foi desenvolvido no intuito de gerar uma filtragem dos dados obtidos, sendo que apenas miRNAs identificados em um genoma com estrutura secundária com *mfe* inferior a -18 foram considerados genes de miRNAs verdadeiros, diminuindo, assim, falso-positivos. Na etapa seguinte, os miRNAs foram comparados a partir de sua sequência precursora, sendo assim os miRNAs que eram gerados a partir de uma mesma sequência precursora pertenciam a uma entrada única, independente de sua família. Uma vez que miRNAs da mesma família possuem funções distintas no genoma (van Rooij et al., 2008; Marco et al., 2012), esse aspecto foi desconsiderado. Assim, o algoritmo gerado permite verificar se os miRNAs estão sendo expressos em apenas uma espécie e/ou em outras espécies. Assim, essa análise permitiu verificar quais miRNAs possuíam uma expressão conservada entre os vertebrados. O que permitiu a seleção de alguns miRNAs para a etapa de predição de alvos. Como resultado final foram considerados apenas os miRNAs expressos nos grandes grupos, sendo peixes (intersecção entre zebrafish, tilápia do Nilo e salmão), anfíbios (intersecção entre *X. tropicalis* e *X. laevis*), répteis (dados

de *T. torquatus*), aves (intersecção entre tentilhão e galinha) e mamíferos (intersecção entre ornitorrinco, gambá, camundongo, rhesus e humano).

Após realização da análise qualitativa, o conjunto de dados normalizado pelo foi submetido a uma análise quantitativa para comparação do nível de expressão do miRNAs entre as espécies analisadas. Para a realização dessa análise, seguiu-se o cálculo demonstrado por Sudmant et al. (2015) para comparação de datasets de expressão gênica entre espécies distintas. No caso foi aplicada uma matriz de coeficiente de correlação de Pearson seguida de clusterização hierárquica para verificação de padrões de expressão similares entre as amostras e os miRNAs conservados identificados pela análise qualitativa utilizando scripts na linguagem R. Após finalização do cálculo foi aplicado Log nos dados para normalização e facilitar a visualização gráfica dos resultados obtidos utilizando o software Gene-E (<https://software.broadinstitute.org/GENE-E/>).

3.5.2. Predição de alvos

Primeiramente, foi realizado o download das sequências de 3'UTR disponíveis para as espécies analisadas utilizando-se a ferramenta *BioMart* do banco de dados do *Ensembl* (versão 82; www.ensembl.org). Os arquivos foram preparados para a realização da predição de acordo com as necessidades dos algoritmos utilizados, seguindo o protocolo dos desenvolvedores dos algoritmos de predição.

Foram selecionados para essa análise apenas os miRNAs com expressão conservada entre os vertebrados. Assim, para predição de alvos foram utilizados os algoritmos *TargetScan* (versão 6,2; Lewis et al., 2005) e *miRanda* (Enright et al., 2003). O algoritmo *TargetScan* realiza uma predição baseada na sequência *seed* do

miRNA e no número de sítios de ligação presentes no 3'UTR do gene alvo, gerando assim um valor denominado “*context+score*”. Já o algoritmo miRanda realiza a predição a partir da ligação do miRNA no sítio de ligação e sua força de ligação para gerar um *score* determinado pela ligação perfeita da seed somado à ligações existentes fora da seed. Assim, esses algoritmos podem gerar falso-positivos, para evitar isso foi utilizado um filtro que considerou apenas alvos com um *context+score* inferior a -0,2 para o TargetScan e um *score* superior a 155 para o miRanda, deixando assim, uma lista de alvos mais restritiva e estrigente.

3.5.3. Análise de ontologia funcional

Para se verificar a funcionalidade desses miRNAs conservados entre os vertebrados foi realizada uma análise de enriquecimento funcional. Essa análise se baseia em ontologia através dos dados funcionais disponíveis no banco de dados do *Gene Ontology* (www.geneontology.org; Ashburner et al., 2000) para cada espécie. Assim, foram identificados os termos para cada gene alvo baseado na categoria “Processo biológico”.

Para realização da análise estatística dos dados de ontologia foi utilizado o algoritmo *EmpiricalGO* (Bleazard et al., 2015). Este cálculo se baseia na distribuição empírica do número de genes alvos de um miRNA dentro de suas anotações funcionais de ontologia gênica. Este cálculo foi selecionado para nossas análises, pois possui um resultado funcional mais adequado para a finalidade desejada do que o protocolo padrão considerado para este tipo de análise em miRNAs (Ritchie et al., 2009). Bleazard e colaboradores (2015) demonstraram que o cálculo empírico diminui o número de falso-positivos e possui um resultado mais efetivo do que o cálculo considerado padrão. Esse cálculo considera o número de sítios de ligação

de cada miRNA para cada gene envolvido no processo, e quantas vezes aquele gene alvo aparece para cada miRNA. Assim, o resultado se baseia na probabilidade daquele termo aparecer ao acaso, ou seja, quanto menor o valor, menor a probabilidade de uma randomização gerar o mesmo resultado. Desta maneira, foram considerados resultados com valores inferiores a 0,05.

3.6. Análise funcional de miRNAs

3.6.1. Seleção de miRNA e seus alvos

Baseado nos resultados de análise comparativa anteriormente apresentados e em dados prévios da literatura (Cao et al., 2012), o miRNA miR-129 foi prioritariamente selecionado para a realização de análise funcional.

A seleção do miR-129 também foi baseada na conservação e no número de sítios de ligação presentes na sequência do 3'UTR dos seus genes alvo preditos, no caso, os fatores transcricionais Tbx5, Tbx20 e Bmp4. Esses fatores transcricionais são considerados essenciais para o desenvolvimento cardíaco, sendo que, qualquer alteração em seu nível de expressão resulta em defeitos na estrutura cardíaca em desenvolvimento (Jiao et al., 2003; Greulich et al., 2011).

Para testar se o miR-129 é capaz de regular a expressão dos genes alvos Tbx5, Tbx20 e Bmp4, e assim, modular o desenvolvimento cardíaco, experimentos funcionais foram desenvolvidos. Em síntese, para essa análise funcional, que tem o objetivo de validar a interação do miRNA-alvo, foram gerados cassetes de expressão contendo a região 3'UTR de cada um dos 3 genes individualmente. Estes foram microinjetados isoladamente e/ou co-injetados com inibidores do miR-129 em embriões de zebrafish. Os resultados foram comparados a grupos controles com e

sem inibição do miRNA e através da utilização de inibidores controle. As etapas para a realização dessa análise estão descritas detalhadamente a seguir.

3.6.2. Morfolino

Para inibição do miRNA foi utilizado oligo antisense de morfolino. Morfolinos têm sido rotineiramente utilizados para análise funcional de miRNAs (Kloosterman et al., 2007). Morfolino é uma cadeia nucleotídica modificada que possui uma forte ligação à sua sequência complementar no RNA alvo (Moulton e Yan, 2008). No caso dos morfolinos utilizados, estes precisam ser entregues ativamente à célula alvo, no caso de embriões essas moléculas foram injetadas diretamente. Uma vez injetadas nos embriões, essas moléculas se mantêm estáveis, uma vez que não ativam uma resposta imune inata, mantendo-se ativos de cinco a sete dias em embriões (Woltering e Durston, 2008; Pase et al., 2009; Conte et al., 2010). Desse modo, a injeção de morfolinos é considerada uma metodologia ideal para detecção de funções regulatórias em estágios iniciais do desenvolvimento, incluindo a formação total do tecido cardíaco, que se completa em 48 hpf em zebrafish. No caso, o morfolino utilizado foi desenhado para bloquear a biogênese e maturação do miR-129 (5'- TGAAAAACGCCAGACCCGAACGAA -3'), inibindo, assim, a função desse miRNA ao longo do desenvolvimento cardíaco de zebrafish.

Para garantir que alterações fenotípicas detectadas fossem específicas do oligo desenhado para o miR-129, foi utilizado um morfolino controle "*Std Control*" (5'- CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA -3'), o qual não possui identidade com nenhuma região do genoma de zebrafish.

3.6.3. Amplificação do 3'UTR e síntese do vetor de expressão

Para validar a interação com os alvos específicos, primers foram desenhados para amplificar a região 3'UTR (região 3' não-traduzida) de cada alvo. A sequência 3'UTR amplificada foram inseridas em um plasmídeo pCS2+. Este plasmídeo contém uma sequência promotora SP6 seguida da sequência codificadora do gene GFP (Green Fluorescent Protein) e de um sinal poli-A. Para inserção da sequência 3'UTR na região adjacente ao GFP e anterior ao sinal poli-A, foram utilizadas enzimas de restrição específicas para cada gene analisado. Assim, os primers desenhados para amplificar o 3'UTR específico possuem uma cauda com a sequência de corte da enzima de restrição utilizada (ver Tabela 3 para maiores detalhes).

Tabela 3. Sequência dos primers para amplificação do 3'UTR dos alvos selecionados.

Gene	Primer	Sequência do primer ¹
Tbx5	Forward	5'- aattgaattcCATGCAGATGCGGATTACAGC -3'
	Reverse	5'- ctcggtctcgagGAATTTCCATTAAATTTTAATTGTATCAAGG -3'
Tbx20	Forward	5'- ataggcaagtgtgtgcTCCTGACACTGCAGAGTGATAC -3'
	Reverse	5'- cttcatcacgtaAGTCAATAGTGGTATTTTATGTTGTCAC -3'
Bmp4	Forward	5'- cgtaagatctACGGAGACTCTTACCACAAAAACATCCAC -3'
	Reverse	5'- cgcaggtacgtaGATCAATAAGGGGGTCGCTTGGC -3'

Nota: ¹as letras em minúsculo e sublinhadas representam a sequência do sítio de ligação das enzimas de restrição utilizadas para inserção do 3'UTR no vetor de expressão. As letras maiúsculas representam a sequência do primer para amplificação do 3'UTR. Tbx5 foram utilizadas as enzimas EcoRI e XhoI; Tbx20 foram utilizadas as enzimas AlfI e SnaBI; Bmp4 foram utilizadas as enzimas BglII e SnaBI.

Desse modo, a sequência de 3'UTR foi amplificada a partir de uma biblioteca de cDNA, previamente gerada a partir de amostras de RNA total do tecido cardíaco de zebrafish (extraído conforme descrito no item 3.1 da seção de materiais e métodos). O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies), seguindo protocolo do fabricante.

A reação de PCR para amplificação do 3'UTR constou em solução contendo 0,8mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, tampão de enzima Taq DNA polimerase (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), 200nmol de cada primer, 1 unidade de enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 25ng de cDNA. O programa no termociclador PTC-200 (MJ Research) constou em etapa de denaturação inicial a 94° por 5 min., seguido por 35 ciclos de denaturação a 95° por 1 min., anelamento de primers a 58° por 30 seg. e extensão a 72° por 1,5 min., seguido por uma etapa de extensão final a 72°C por 4 min. Os resultados da PCR foram verificados em gel de agarose a 1%, corado com *GelRed* (Uniscience), sob luz ultravioleta e quantificados utilizando-se o aparelho NanoDrop 1000 (Thermo-Scientific).

O 3'UTR e o plasmídeo pCS2+ foram submetidos à reação com enzima de restrição para corte das extremidades utilizando-se as enzimas específicas para cada 3'UTR. As enzimas de restrição utilizadas para essa etapa da análise foram da empresa *New England Biolabs*, e foram utilizados os tampões específicos para eficiência de 100% de cada enzima, conforme descrito no protocolo do fabricante. A reação de ligação foi realizada utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen), seguindo protocolo do fabricante. O resultado da reação de ligação foi inserido em bactérias competentes *Dh5α™ Competent Cells* (Invitrogen), utilizando-se a técnica de transformação de choque térmico. Os plasmídeos foram recuperados a partir do uso do kit comercial *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante.

3.6.4. Validação da interação miRNA-alvo

Sabe-se que a atividade dos miRNAs promove a degradação do RNA mensageiro ou a inibição da tradução de seus alvos, eventos que podem ser

detectados a partir da análise de expressão protéica do gene e/ou utilizando-se um gene repórter (Brennecke et al., 2003; Mansfield et al., 2004; Giraldez et al., 2005). Atualmente, esses experimentos são realizados com proteínas fluorescentes (como GFP e dsRed). Assim, esses ensaios se baseiam no seguinte protocolo: utilizar um vetor que codifica o gene repórter seguido da sequência 3'UTR do alvo a ser analisado (Figura 6; Staton e Giraldez, 2011). Para comparações, pode ser utilizado um segundo repórter sem a sequência do 3'UTR para ser expresso nas mesmas células. Na presente análise em zebrafish, esses genes repórteres foram transcritos *in vitro*, utilizando-se o kit *mMESSAGE mMACHINE*® (Life technologies), seguindo o protocolo do fabricante, sendo que a purificação do RNA sintetizado foi realizada utilizando-se o método de extração por phenol:clorofórmio. O RNA sintetizado foi quantificado usando o aparelho *NanoDrop 1000* (Thermo-Scientific), e sua integridade verificada em gel de agarose a 1%.

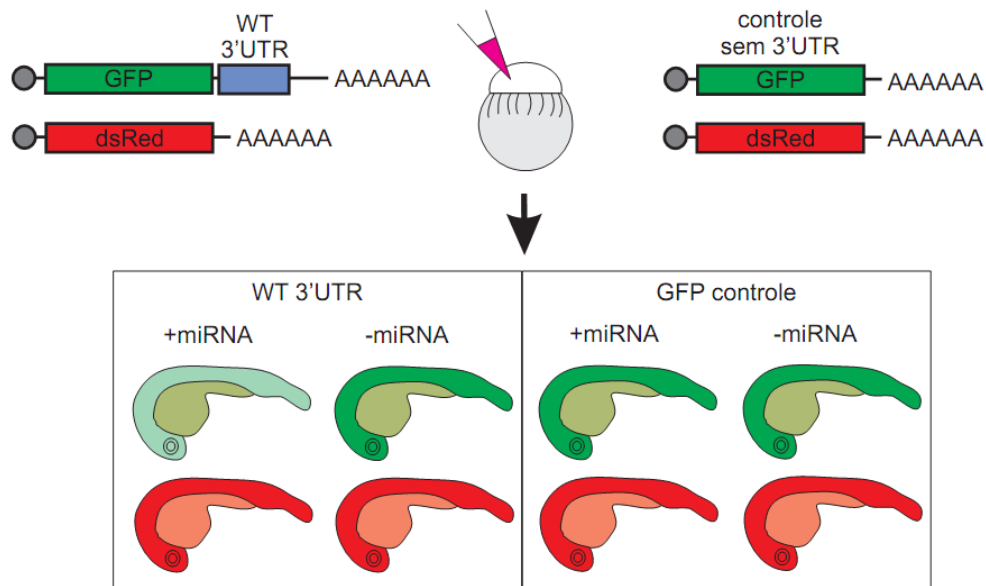


Figura 6. Repórteres usados para validação de um interação miRNA-alvo. Na presença do miRNA com o 3'UTR (WT 3'UTR) a expressão de GFP é inferior do que na ausência do miRNA (com o morfolino). O GFP controle possui o mesmo nível de expressão na ausência e presença do miRNA. dsRed é utilizado como controle positivo da microrinjeção.

Nesse sentido, foram realizados cruzamentos da linhagem Tübingen de zebrafish para obtenção de embriões conforme descrito por Westerfield (2000). Após obtenção dos embriões, os mix de injeções foram produzidos (ver Tabela 4) e as injeções dos mix foram realizadas em embriões no estágio de desenvolvimento de 1-2 células (até 1,5 hpf), para garantir a presença do transcrito gerado em todas as células do embrião. Assim, foi injetado um volume de 1nl do mix por embrião. Foram utilizados cerca 200 embriões por mix para confirmação estatística do resultado. As injeções foram realizadas utilizando-se o micromanipulador InjectMan NI 2 e microinjetor FemtoJet (Eppendorf) acoplado a um estereomicroscópio Stemi DV4 (Zeiss). As imagens de validação da interação miRNA-alvo foram obtidas utilizando-se o microscópio de fluorescência SteREO Discovery V8 (Zeiss).

Tabela 4. Conteúdo dos mix de microinjeção.

Mix	Reagente ¹	Concentração final	Conteúdo em 1nl
GFP.3'UTR + MO	RNA _m GFP.3'UTR RNA _m dsRed Morpholino PhenolRed 2%	100ng/μl 80ng/μl 0,25mM 0,05%	100pg 80pg 1,7ng -
GFP.3'UTR – MO	RNA _m GFP.3'UTR RNA _m dsRed PhenolRed 2%	100ng/μl 80ng/μl 0,05%	100pg 80pg -
GFP + MO	RNA _m GFP RNA _m dsRed Morpholino PhenolRed 2%	100ng/μl 80ng/μl 0,25mM 0,05%	100pg 80pg 1,7ng -
GFP – MO	RNA _m GFP RNA _m dsRed PhenolRed 2%	100ng/μl 80ng/μl 0,05%	100pg 80pg -

Nota: ¹PhenolRed é utilizado como marcador visível para verificar a injeção do mix no embrião.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do miRNoma cardíaco de vertebrados

Os resultados de sequenciamento gerados e somados aos dados disponíveis em bancos de dados reanalisados pelo *workflow* aplicado no presente estudo perfizeram um total de 22.175.905 *reads* para todas as espécies (ver Tabela 5 para maiores detalhes).

Nessa análise, qualitativa, foram identificados transcritos de miRNAs distintos expressos numa escala crescente, sendo a menor diversidade observada em peixes e a maior observada em mamíferos. Assim, verificou-se uma correlação positiva entre o número de genes de miRNAs e o nível de complexidade metabólica das espécies. Entretanto, em termos qualitativos, ou seja, em número de genes de miRNA expressos, as espécies de peixes apresentaram valores superiores aos de anfíbios, répteis e aves. Provavelmente, este fato seja decorrente do *round* adicional de duplicação genômica específica de teleóteos (TGD; Taylor et al., 2003). Assim, os números apresentados na Tabela 3 representam o total de genes de miRNAs, incluindo-se as cópias parálogas de um mesmo miRNA, as quais possuem uma mesma sequência nucleotídica e, portanto, não acrescentam *a priori* uma maior diversidade no repertório de genes de miRNA.

Interessantemente, foram detectados 697 miRNAs maduros conhecidos para *X. laevis*. Entretanto, essa espécie possui apenas 21 miRNAs maduros descritos no miRBase. Assim dos 697 miRNAs detectados, aproximadamente 42 representam esses 21 miRNAs, o que pode ser explicado pela existência de duas cópias no genoma para todos esses genes de miRNA, sendo que os outros miRNAs ortólogos a outras espécies, também já descritos no miRBase, demonstraram a existência em duplicata no genoma dessa espécie. Um resultado semelhante ao encontrado por

Ahmed et al. (2015), que realizou RNA-seq para detectar miRNAs ao longo do desenvolvimento de *X. laevis*. Essas cópias duplicadas são resultado do processo de poliploidia que ocorreu durante a história evolutiva de *X. laevis* (Session et al., 2016), o que torna a espécie de grande interesse para estudos evolutivos e biológicos sobre os impactos causados por eventos de duplicação genômica (Kobel e Du Pasquier, 1986).

Tabela 5. Reads mapeadas e miRNAs detectados nos genomas das espécies analisadas.

Nome da espécie	Reads total	Reads mapeadas	miRNAs detectados ¹	Novos miRNAs ²	Diversidade de miRNAs ³
<i>Oreochromis niloticus</i>	303832	181550	255	23	278
<i>Danio rerio</i>	5110570	242684	439	80	519
<i>Salmo salar</i>	105799	37338	452	19	471
<i>Xenopus tropicalis</i>	1122091	703755	287	26	313
<i>Xenopus laevis</i>	1208952	842238	697	93	790
<i>Tropidurus torquatus</i>	373785	48834	320	20	340
<i>Gallus gallus</i>	1643918	753403	450	14	464
<i>Taeniopygia guttata</i>	1543864	969049	176	2	178
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	4192247	2025447	287	9	293
<i>Monodelphis domestica</i>	4365256	2296111	555	23	578
<i>Mus musculus</i>	863955	300687	648	9	657
<i>Macaca mulatta</i>	954210	278391	779	28	807
<i>Homo sapiens</i>	387426	90820	657	9	666

¹miRNAs conhecidos para a espécie e ortólogos em outras espécies de cordados; ²novos miRNAs preditos pelo algoritmo miRDeep2; ³Total de miRNAs detectados

4.2. Análise comparativa

Para realização da análise comparativa de miRNAs expressos no tecido cardíaco das espécies de vertebrados analisadas foi desenvolvido um algoritmo utilizando-se a linguagem *Python*. Inicialmente, o algoritmo realiza uma filtragem nos dados obtidos pela análise do miRDeep2 para evitar a identificação de miRNAs falso-positivos, essa filtragem se baseia no valor de mínima-energia livre (no caso, foram considerados valores inferiores a -18 Kcal/mol) apresentada pela estrutura

secundária da sequência precursora do miRNA no genoma da espécie. Após essa filtragem, os miRNAs foram analisados baseando-se em sua sequência precursora, assim, miRNAs provenientes de uma mesma sequência precursora foram considerados como uma entrada única pelo algoritmo, ou seja, foram desconsiderados as especificações de braço dos miRNAs como -5p e -3p. Além disso, o algoritmo considerou como miRNAs únicos todos os miRNAs que possuem mais de um loci no genoma, isto é, miRNAs cujo o nome continham “-a” ou “-b” e “-1” ou “-2”. Após essa etapa, o algoritmo realizou as análises de interações entre os resultados obtidos e gerou um total de 1418 entradas únicas de miRNA na análise geral (ver Tabela 6 para maiores detalhes). Esses miRNAs foram considerados como uma entrada única, devido à similaridade de 100% entre suas sequências *seed*.

Tabela 6. Número de miRNAs provenientes de uma mesma sequência precursora baseado nos resultados provenientes do miRDeep2 para cada espécie e grupos analisados.

Espécie	Número de miRNAs únicos para a espécie	Número de miRNAs únicos para o grupo	Grupo
<i>D. rerio</i>	181	338	Teleósteos
<i>O. niloticus</i>	145		
<i>S. salar</i>	206		
<i>X. laevis</i>	248	308	Anfíbios
<i>X. tropicalis</i>	142		
<i>T. torquatus</i>	136	136	Répteis
<i>T. gutatta</i>	135	292	Aves
<i>G. gallus</i>	246		
<i>O. anatinus</i>	126	939	Mamíferos
<i>M. domestica</i>	247		
<i>M. musculus</i>	369		
<i>M. mulatta</i>	420		
<i>H. sapiens</i>	407		
Número de miRNAs únicos		1418	

Ao se considerar uma comparação entre as espécies de um mesmo grupo, observou-se que do total de 181, 145 e 206 miRNAs únicos para zebrafish, tilápia do Nilo e salmão, respectivamente, foram identificados 83 miRNAs conservados

entre as espécies de peixes. Dentro de anfíbios foram identificados 82 miRNAs conservados entre os 248 de *X. laevis* e 142 de *X. tropicalis*. Em répteis, essa análise não foi realizada uma vez que só foi gerado sequenciamento do tecido cardíaco de uma única espécie. Para os resultados em aves, dos 135 e 246 miRNAs únicos para tentilhão e galinha, respectivamente, notou-se que 89 estavam presentes em ambas as espécies. Já em mamíferos, do total de 126 em ornitorrinco, 247 em gambá, 369 em camundongo, 420 em rhesus e 407 em humano, foram encontrados 61 miRNAs conservados dentro do grupo. Isso indica que todos os miRNAs que ao mesmo tempo em que existem miRNAs com expressão conservada entre as espécies, os quais possuem função similar, existem miRNAs com expressão não-conservada, agindo em característica fisiológicas distintas de cada espécie.

Ao se considerar a abordagem de comparação por espécie entre os grupos, destaca-se que 32 miRNAs perfizeram o grupo de miRNAs com expressão conservada entre todas as espécies analisadas (ver Tabela 7 para maiores detalhes).

Quando se considerou a abordagem por grupo de espécies, onde os miRNAs de um grupo corresponde à união dos miRNAs expressos em cada espécie pertencente àquele grupo, obteve-se 338, 308, 136, 292 e 939 miRNAs únicos para os grupos dos peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, respectivamente. Com essa análise, o conjunto de miRNAs com expressão conservada entre os grupos de vertebrados analisados aumentou para um total de 72 genes de miRNAs (Figura 7; Tabela 7), o que indica uma função conservada para esses miRNAs, tendo em vista o grande número de espécies analisadas.

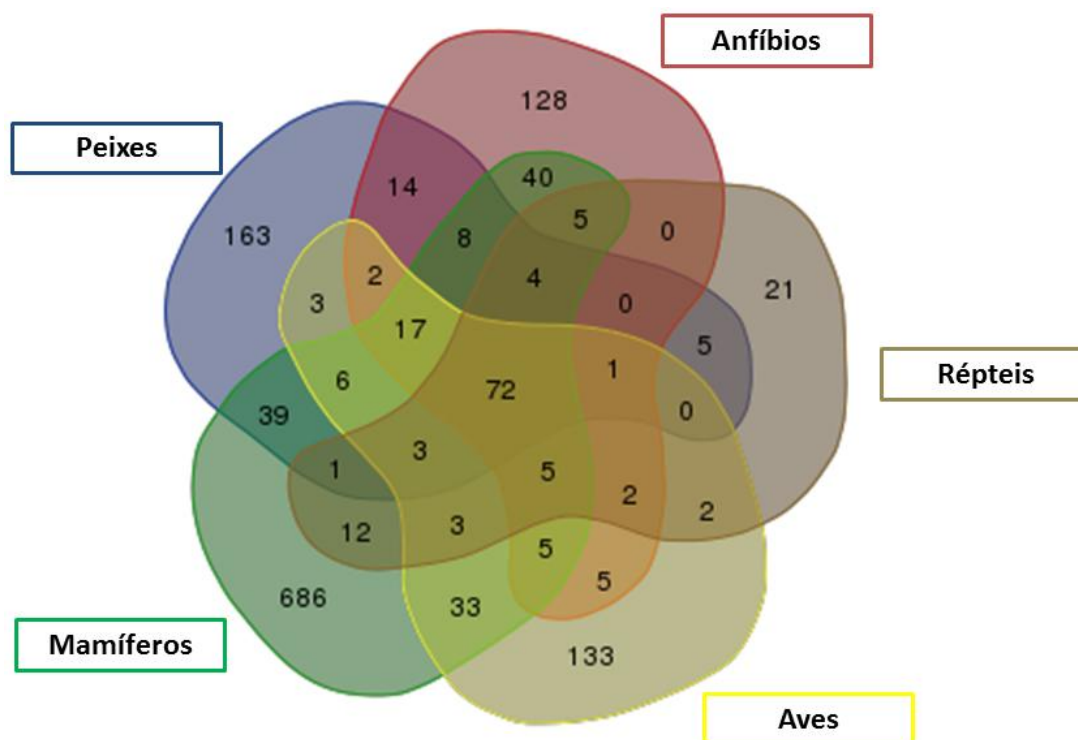


Figura 7. Diagrama de Venn demonstrando o resultado da análise comparativa entre miRNAs expressos no tecido cardíaco de vertebrados.

Ao se verificar os 72 miRNAs com expressão conservada entre os vertebrados nota-se que oito deles são considerados como miRNAs importantes para a fisiologia cardíaca, como o miR-1, miR-21, miR-125, miR-133, miR-143, miR-145, miR-199 e miR-499, que foram previamente descritos por bioinformática no trabalho de Lin e colaboradores (2014). Ressalta-se que o trabalho em questão considerou o miR-208 como importante para a fisiologia cardíaca de vertebrados, uma vez que o genoma dessas espécies contém o gene de miRNA, sendo nomeado miR-208 em anfíbios, répteis, aves e mamíferos e miR-736 em peixes. Entretanto, nossa extensa análise não detectou expressão no tecido cardíaco de adultos do miR-736 em peixes e do miR-208 em aves, mas detectou a expressão no miR-208 em anfíbios, répteis e mamíferos.

Outro ponto marcante, foi que o trabalho publicado por Lin e colaboradores (2014) indicou o miR-206 como sendo importante ao tecido cardíaco de

vertebrados. Entretanto, na presente análise, a expressão do miR-206 foi restrita ao grupo dos mamíferos, indicando que, se o miR-206 possui função fisiológica no tecido cardíaco, ela se restringe ao grupo dos mamíferos, e não aos vertebrados em geral como previamente descrito (Lin et al., 2014), o qual realizou uma análise de bioinformática, sem qualquer dado de expressão ou experimento de validação.

Tabela 7. MicroRNAs com expressão conservada no tecido cardíaco.

Abordagem	Número	miRNAs ¹
Grupo	72	mir-31, <u>let-7</u> , <u>mir-27</u> , mir-456, mir-214, <u>mir-15</u> , <u>mir-137</u> , <u>mir-7</u> , mir-200, <u>mir-193</u> , mir-126, <u>mir-153</u> , mir-375, <u>mir-18</u> , <u>mir-24</u> , <u>mir-499</u> , <u>mir-92</u> , <u>mir-9</u> , mir-363, <u>mir-130</u> , <u>mir-34</u> , <u>mir-103</u> , mir-191, <u>mir-122</u> , mir-458, mir-301, mir-2188, mir-146, <u>mir-133</u> , mir-460, mir-204, mir-139, mir-489, mir-148, mir-221, mir-99, mir-21, mir-33, <u>mir-365</u> , mir-128, mir-338, mir-129, mir-155, <u>mir-1</u> , mir-429, <u>mir-30</u> , mir-216, mir-16, <u>mir-101</u> , <u>mir-19</u> , mir-107, <u>mir-135</u> , <u>mir-26</u> , mir-125, mir-138, <u>mir-20</u> , <u>mir-199</u> , <u>mir-23</u> , mir-205, mir-145, mir-222, <u>mir-143</u> , <u>mir-181</u> , mir-194, mir-383, mir-29, mir-96, <u>mir-17</u> , <u>mir-218</u> , <u>mir-10</u> , mir-455, mir-140
Espécie	32	mir-133, mir-34, mir-135, mir-103, mir-23, mir-1, mir-218, mir-193, mir-181, mir-9, mir-10, mir-137, mir-17, mir-130, mir-199, mir-15, mir-101, mir-26, let-7, mir-20, mir-92, mir-30, mir-24, mir-7, mir-143, mir-19, mir-153, mir-499, mir-365, mir-18, mir-27 e mir-122

Nota: ¹miRNAs sublinhados estão presentes em ambas as abordagens.

Destaca-se que em ambas as abordagens utilizadas (i.e. entre as espécies ou entre os grupos), a lista de miRNAs que possui expressão conservada entre os grupos de vertebrados (i.e. 72 miRNAs) irá conter os mesmos 32 miRNAs que na abordagem mais restritiva por espécie (ver Tabela 5). Assim, pode-se considerar que esses 32 miRNAs possuem funções conservadas na fisiologia cardíaca de vertebrados apesar dos mais de 500 milhões de anos de divergência entre peixes e os demais grupos. Cabe destacar que dos 40 miRNAs de expressão não conservada em todas as espécies de cada grupo analisado, a ausência de expressão se baseia em apenas uma ou duas espécies. Tal resultado sugere que esses 40 miRNAs desempenham funções importantes, embora aparentemente não

essenciais para a manutenção do coração já formado nos indivíduos adultos de todas as espécies analisadas.

Os resultados de clusterização hierárquica obtidos através do cálculo de correlação de Pearson para a expressão global de miRNAs no coração de vertebrados, demonstrou um padrão de agrupamento das espécies com características ectotérmicas e endotérmicas (Figura 8A). Apesar da semelhança do padrão elétrico existente no batimento cardíaco de todas as espécies de vertebrados (Christoffels et al., 2010), o surgimento da característica endotérmica em aves e mamíferos acarretou em um aumento na frequência cardíaca (i.e., batimentos por minuto), resultado da alta demanda metabólica apresentada por esses indivíduos (Lillywhite et al., 1999). Além disso, espécies endotérmicas apresentam uma pressão sanguínea sistêmica elevada ao se comparar com espécies ectotérmicas (Burggren et al., 2010). Assim, o resultado obtido indica que o nível de expressão qualitativo e quantitativo dos miRNAs podem ter suas funções relacionadas às características fisiológicas diferenciais apresentadas entre ectotérmicos e endotérmicos.

Ao se aplicar a clusterização hierárquica para verificar a relação entre os 32 miRNAs conservados nas diferentes espécies (Figura 8B), verificou-se que o padrão de agrupamento das espécies em endotérmicos e ectotérmicos se manteve. Demonstrando que o nível de expressão de miRNAs conservados se mantém similar em espécies que possuem um mesmo padrão de fisiologia cardíaca.

4.3. Predição de alvos

A predição de alvos teve como principal objetivo identificar os possíveis alvos para os 32 miRNAs com expressão conservada entre os vertebrados e realizar uma análise por ontologia para indicar a funcionalidade desse grupo de miRNAs em um genoma. As espécies *X. laevis* e salmão foram excluídas dessa análise devido à falta de anotação das sequências de 3'UTR para o conjunto de genes anotados na versão atual de seus genomas. As anotações de 3'UTR disponíveis para *X. tropicalis*, tentilhão, ornitorrinco e gambá possuem uma baixa qualidade, mas foram consideradas na análise.

A predição gerou uma lista variando entre mais de 500 a 900 possíveis alvos para cada miRNA dependendo da espécie. Após realização da filtragem (conforme descrito no item 3.5.2 da seção de materiais e métodos), o número de genes alvo para cada miRNA diminuiu para cerca de 400 a 600 possíveis alvos. A Tabela 8 representa o total de alvos detectados para cada espécie. Interessantemente, foi identificada uma discrepância no número total de alvos detectados para cada espécie. Essa diferença pode ser decorrente de anotações incompletas de genes e de sequências 3'UTR na versão atual dos genomas disponíveis para uso para algumas espécies. Assim, o grande número de alvos preditos para as espécies *H. sapiens*, *M. musculus* e *D. rerio*, pode ser decorrente de uma melhor anotação do genoma, uma vez que são as espécies modelo mais comumente utilizadas dentro do grupo de vertebrados.

A partir da lista filtrada de alvos preditos foram realizadas as análises de ontologia funcional e seleção de miRNA e seus alvos para a análise funcional.

Tabela 8. Número total de alvos preditos para os 32 miRNAs com expressão conservada para cada espécie.

Espécie	Número total de alvos
<i>Danio rerio</i>	19200
<i>Oreochromis niloticus</i>	8785
<i>Xenopus tropicalis</i>	5998
<i>Tropidurus torquatus</i>	7333
<i>Taeniopygia guttata</i>	3003
<i>Gallus gallus</i>	9026
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	6401
<i>Monodelphis domestica</i>	9427
<i>Mus musculus</i>	17965
<i>Macaca mulata</i>	9823
<i>Homo sapiens</i>	19453

4.4. Análise de ontologia funcional

Os resultados da predição de alvo foram utilizados para realização de análise funcional *in silico* por ontologia. Os resultados dessa análise se mostram promissores para o entendimento e confirmação da funcionalidade dos miRNAs conservados no tecido cardíaco.

Assim, os dados foram obtidos utilizando-se o genoma de *H. sapiens*, uma vez que a espécie possui uma anotação funcional de alta qualidade, devido ao grande interesse existente nas análises genômicas dessa espécie. Esses resultados demonstraram que a intersecção dos alvos dos 32 miRNAs conservados apresentam alta probabilidade de exibir funcionalidade ao longo do desenvolvimento cardíaco (Tabela 9). Além disso, esses dados demonstram a potencialidade desses miRNAs na regulação da frequência cardíaca, uma característica relevante na evolução da fisiologia cardíaca de vertebrados (Jensen et al., 2013). Outro ponto marcante é que os dados adquiridos demonstram similaridade aos resultados adquiridos por Lin e colaboradores (2014) ao realizar este tipo de análise apenas para os alvos do miR-1, que sabidamente possui funções na fisiologia cardíaca (van Rooij et al., 2008; Qian et al., 2011). Esses dados se mostram promissores para o

entendimento acerca da fisiologia cardíaca em vertebrados. Além disso, os resultados indicam que mesmo miRNAs que possuem expressão e função em outros tecidos, quando presentes com miRNAs altamente expressos no tecido cardíaco, adquirem uma função específica para aquele tipo celular em questão.

Tabela 9. Lista dos 20 principais resultados obtidos com o EmpiricalGO.

GO term	#¹	p-value²
GO:0001947~heart looping	55	0.003287828
GO:0002026~regulation of the force of heart contraction	20	0.001143592
GO:0002027~regulation of heart rate	35	0.001500965
GO:0003007~heart morphogenesis	55	0.003359302
GO:0007507~heart development	202	0.012222143
GO:0008016~regulation of heart contraction	35	0.001643914
GO:0010460~positive regulation of heart rate	19	0.001000643
GO:0010881~regulation of cardiac muscle contraction by regulation of the release of sequestered calcium ion	19	0.001072118
GO:0035050~embryonic heart tube development	21	0.001072118
GO:0048738~cardiac muscle tissue development	22	0.00142949
GO:0055007~cardiac muscle cell differentiation	27	0.001572439
GO:0055010~ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis	25	0.001143592
GO:0055117~regulation of cardiac muscle contraction	20	0.001143592
GO:0060045~positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	18	0.001072118
GO:0060047~heart contraction	15	0.000857694
GO:0060048~cardiac muscle contraction	46	0.002144236
GO:0060307~regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane repolarization	15	0.00078622
GO:0086005~ventricular cardiac muscle cell action potential	15	0.00078622
GO:0086091~regulation of heart rate by cardiac conduction	27	0.001643914
GO:0086091~regulation of heart rate by cardiac conduction	27	0.001643914

Nota: ¹número de genes alvos presente no processo biológico; ²p-value calculado a partir do cálculo empírico.

4.5. MicroRNAs e a rede regulatória do desenvolvimento cardíaco de vertebrados

Os resultados da predição de alvos permitiram realizar a integração de miRNAs na rede regulatória cardíaca conservada em vertebrados, conforme descrito por Erwin e Davidson (2009). Os miRNAs miR-128, -129, -216 e -338 foram adicionados à rede devido ao alto nível de conservação, ou seja, à expressão em todas as espécies analisadas, e também em função do número de sítios de ligação preditos no 3'UTR de seus alvos, considerados genes importantes para o desenvolvimento cardíaco (ver Figura 9).

Para o miR-128 foi detectada alta probabilidade de regulação dos genes *Isl1*, *dHand* e *Gata6*. Interessantemente, dados recentes mostram que o miR-128 aumenta a proliferação de cardiomiócitos através da regulação do gene *E2f3* (Huang et al., 2013). Os alvos do miR-128 detectados na presente análise (i.e., *Isl1*, *dHand* e *Gata6*) diminuem a proliferação dos cardiomiócitos e causam a diferenciação final dessas células (McFadden et al., 2005; Zhao et al., 2008; Wang et al., 2016). A ação antagônica do miR-128 e seus genes alvo (*Isl1*, *Gata6* e *dHand*) traz indícios da participação efetiva desse miRNA na regulação da proliferação de cardiomiócitos, e indicam um potencial na utilização do miR-128 em terapias gênicas regenerativas. Estudos funcionais, entretanto, são necessários para validação de todas as interações miRNA-alvo supracitadas.

Quanto ao miR-129, um estudo realizado para verificar sua ação nos estágios iniciais do desenvolvimento de zebrafish, relatou que a inibição desse miRNA causa uma assimetria no posicionamento esquerdo-direito do coração (Cao et al., 2012). Este trabalho, entretanto, não verificou quais interações do miR-129 poderiam resultar em tal defeito. A presente análise verificou por predição *in silico* a possível

interação do miR-129 com os fatores transcricionais *bmp4*, *tbx5* e *tbx20*. O Bmp4 atua na septação atrioventricular (Jiao et al., 2003). Estudos realizados em zebrafish e *Xenopus* revelaram que o Bmp4 é crucial para o processo da 1ª volta cardíaca (Breckenridge et al., 2001). Além disso, um estudo demonstrou que a perda da expressão do Bmp4 causa uma assimetria no posicionamento esquerdo-direito do coração em desenvolvimento (Fujiwara et al., 2002), o que nos permite inferir uma possível relação entre o miR-129 e o Bmp4 nesse processo. Já, o Tbx5 e Tbx20 são constituintes da família dos fatores Tbx (Plageman e Yutzei, 2005). A família Tbx é constituída por 17 membros, sendo que, destes, seis membros são expressos no tecido cardíaco (Tbx1, Tbx2, Tbx3, Tbx5, Tbx18 e Tbx20). Destes seis genes da família Tbx, o Tbx5 e o Tbx20 estão relacionados com o desenvolvimento, diferenciação e septação das câmaras cardíacas (Hoogars et al., 2007; Greulich et al., 2011). Assim, uma interação do miR-129 com genes *tbx* resultaria em uma função chave para este miRNA no desenvolvimento das câmaras cardíacas em vertebrados.

O miR-216 fora previamente descrito como cardíaco-específico em mamíferos (Laganà et al., 2015), além disso, teve sua expressão relacionada a danos causados no tecido cardíaco por medicamentos em ratos (Vacchi-Suzzi et al., 2012). Na análise atual, detectamos que o miR-216 possui alta probabilidade de interação com o gene Nkx2.5. O Nkx2.5 foi demonstrado como essencial para a diferenciação dos lados esquerdo-direito do ventrículo em mamíferos (Yamagishi et al., 2001). Esse gene alvo também está presente e é conservado no genoma de todas as demais espécies analisadas. Esses dados indicam uma potencial atuação do miR-216 na regulação da estrutura de septação do ventrículo nos vertebrados de forma geral.

4.6. Análise funcional de miRNAs

4.6.1. Alvos preditos para o miR-129

Para verificar se o miR-129 regula os alvos preditos em nossa análise *in silico*, as regiões 3'UTR dos possíveis genes alvo do miR-129 foram amplificadas e inseridas no vetor repórter com GFP. O fato de a amplificação ter sido gerada a partir de RT-PCR, valida a expressão das sequências no tecido cardíaco e a presença dos sítios de ligação do miRNA no 3'UTR de seus genes alvo (Figura 10).

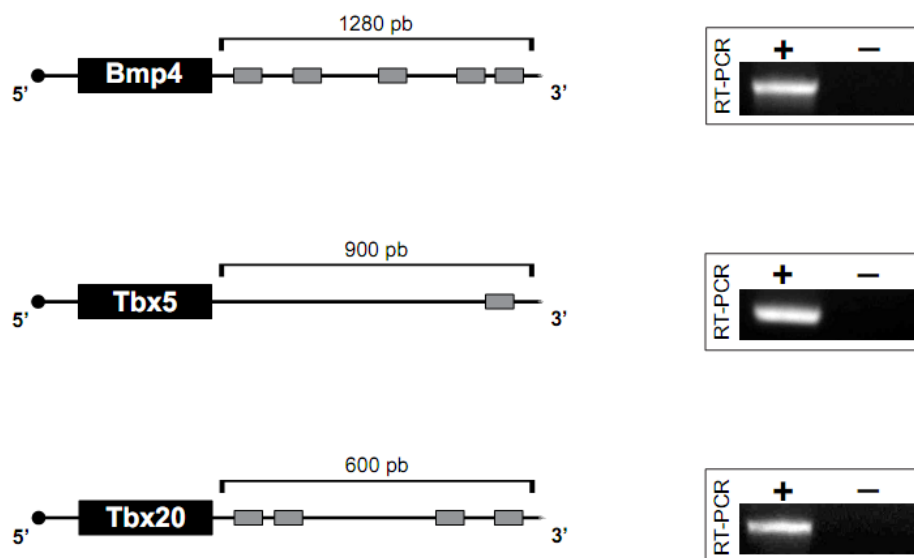


Figura 10. Sítios de ligação do miR-129 no 3'UTR dos genes Bmp4, Tbx5 e Tbx20. O quadrado em cinza representa os sítios de ligação e sua localização nos 3'UTR dos genes alvos. À direita, esta representada o resultado da amplificação por RT-PCR, sendo o controle positivo representado com o símbolo "+" e o controle negativo com o símbolo "-".

Assim, as sequências seed canônicas preditas para o miR-129 nas 3'UTRs dos genes Bmp4, Tbx5 e Tbx20. Esses sítios de ligação consistem em um tipo de ligação considerado forte, o tipo 8mer (Bartel, 2009), ou seja, são sítios de ligação com alta probabilidade de interação. Além disso, esses sítios de ligação estão presentes em regiões da estrutura secundária que permitem uma acessibilidade do

miRNA sobre seu alvo (Kertesz et al., 2007). Outra característica detectada se refere à conservação dos sítios de ligação entre os vertebrados (Argarwal et al., 2015). Todas as características supracitadas conferem aos genes *Bmp4*, *Tbx5* e *Tbx20*, alta probabilidade de interação com o miR-129. O que levou a realização de ensaios funcionais para validação da interação do miR-129 e esses três alvos, uma vez que esses genes são considerados importantes para o desenvolvimento cardíaco.

4.6.2. Ensaio funcional

O ensaio funcional consistiu em microinjetar em embriões de zebrafish os repórteres GFP, dsRED e o inibidor do miRNA. No caso os repórter de GFP pode conter o 3'UTR de interesse (GFP.3'UTR), para verificação da interação, ou pode não conter sequência de 3'UTR (GFP), para controle. O repórter dsRED é co-injetado como controle positivo da microinjeção, e nunca contém sequência 3'UTR. Essas injeções foram realizadas com e sem a co-injeção do morfolino para inibição do miRNA estudado, o miR-129.

Primeiramente, foram realizados testes para verificação da concentração final dos RNAm repórteres (GFP e dsRED) que seriam microinjetados. Estes testes iniciais permitiram chegar ao consenso de que a concentração ótima para injeção seria de 100ng/μl para o GFP e 80ng/μl para o dsRED. Pois estas concentrações geraram um nível de fluorescência suficiente para detecção e sem deixar muito ruído durante o processo de aquisição das imagens.

O teste de concentração de morfolino a ser aplicado por embrião foi realizado para testar as concentrações de 0,6pmol, 0,3pmol e 0,15pmol. O morfolino MO129 foi desenhado para inibir a ação da Dicer sobre os sítios de clivagem no pré-miRNA

(Figura 11A). O morfolino controle foi testado nas mesmas concentrações para confirmação do fentótipo obtido pelo MO129. De fato, o morfolino controle testado em várias dosagens não induziu a modificações fenotípicas e anormalidades no desenvolvimento dos embriões (Figura 11B). A injeção do MO129 na concentração de 0,6pmol resultou em morte de 66% dos embriões, deformidades severas em 31% dos embriões e apenas 3% se desenvolveram normalmente, porém apresentaram um atraso no tempo de desenvolvimento. A injeção na concentração de 0,15pmol acarretou em morte de 19% dos embriões, valor similar ao detectado no controle não-injetado, anormalidade em 19% dos embriões e desenvolvimento normal sem nenhuma alteração fenotípica aparente em 62% dos embriões. A injeção na concentração de 0,3pmol apresentou uma taxa de mortalidade de 19,5%, anormalidade em 51% e desenvolvimento sem modificação fenotípica aparente em 29,5% dos embriões (Figuras 11C e 11D). Assim, a microinjeção na concentração de 0,3pmol do MO129 se mostrou a mais adequada para utilização na co-injeção com os repórteres, uma vez que a taxa de mortalidade se manteve em baixos níveis com uma dosagem de morfolino mais alta.

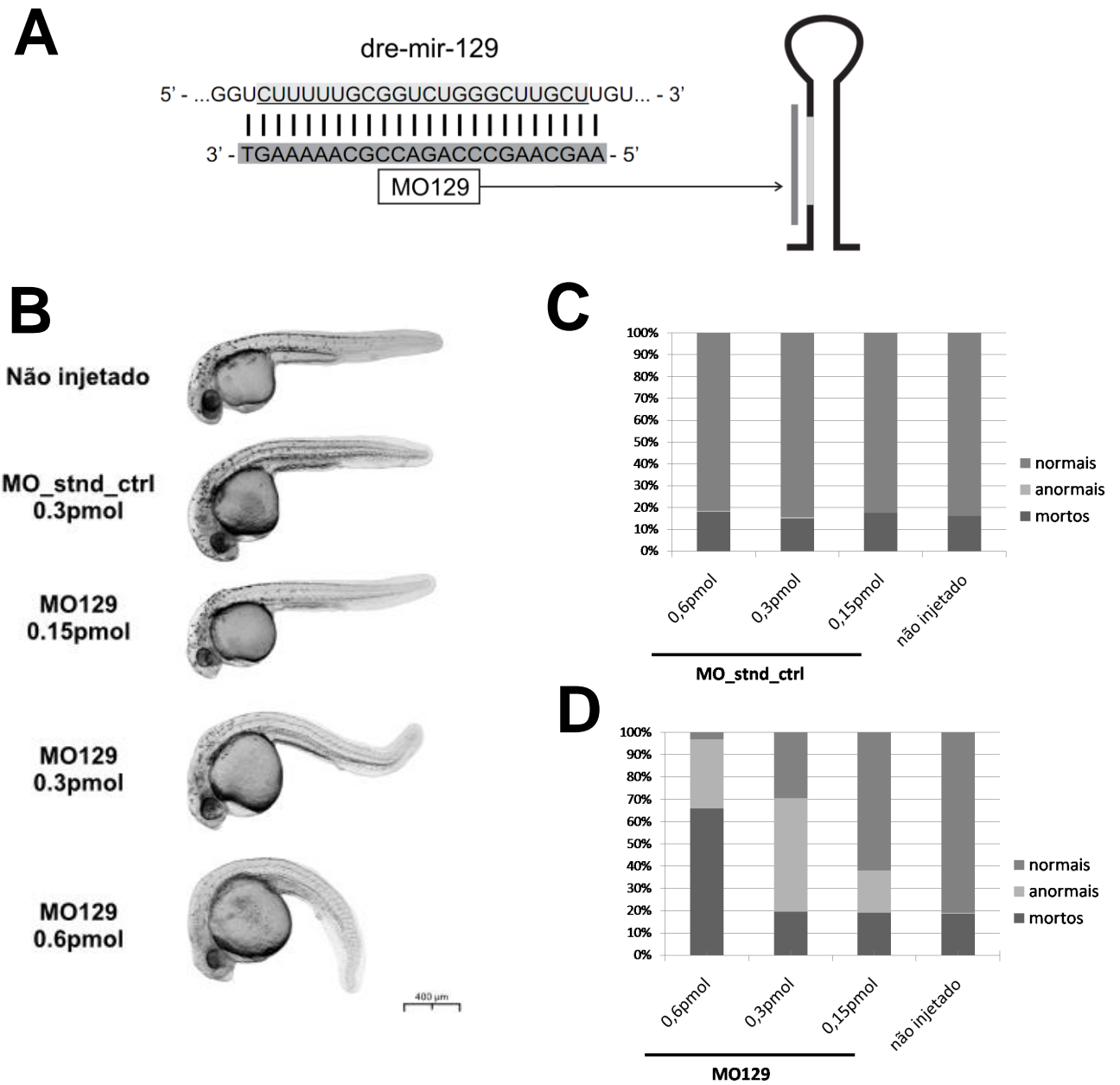


Figura 11. Testes do controle e mortalidade das concentrações de morfolino MO129 injetadas nos embriões. (A) Desenho do morfolino. (B) Características morfológicas apresentadas em embriões a 24hpf que foram realizadas microinjeções dos morfolininos MO129 e controle. (C) Gráfico da taxa de mortalidade e embriões anormais e normais com a microinjeção do morfolino controle. (D) Gráfico da taxa de mortalidade e embriões anormais e normais com a microinjeção do morfolino MO129.

As anormalidades detectadas que foram induzidas pela injeção de MO129 foram similares às descritas por Cao e colaboradores (2012). Neste trabalho, os autores demonstraram a regulação do miR-129 sobre o gene Cp110 e sua ação sobre a ativação na formação dos cílios primários em células em desenvolvimento. Assim, devido à importância dos cílios primários para as células em desenvolvimento, pois servem para facilitar as comunicações químicas entre as células, diversas anormalidades foram detectadas no embrião quando injetados morfolidos contra o miR-129. Estas anormalidades constaram em corpo curvado, edema pericardial e assimetria no posicionamento esquerdo-direito do tecido cardíaco (Cao et al., 2012). Interessantemente, essas anormalidades foram relatadas ao se bloquear a formação dos cílios primários, devido à relevância biológica dessas estruturas para o desenvolvimento (Kramer-Zucker et al., 2005; Wessely e Obara, 2008). Esses dados indicam que as anormalidades presentes podem estar relacionadas com a inibição da formação ciliar nas células, o que, conseqüentemente, causa uma interrupção na comunicação química entre as células.

Dessa maneira, as co-injeções foram realizadas utilizando-se a concentração de 0,3pmol de MO129 na presença do GFP com o 3'UTR de interesse e sem 3'UTR, além disso, foi co-injetado o dsRED como controle positivo da injeção. As análises de expressão foram realizadas com os embriões no estágio de desenvolvimento de 24hpf como descrito por Staton e Giraldez (2011). Para os controles, nenhuma diferença na expressão de GFP foi detectada. Já para o GFP com o 3'UTR (GFP.BMP4), foi observado um ínfimo aumento na expressão na presença do MO129. Porém, este aumento pode ser considerado significativo ao se comparar com o controle utilizado do dsRED. Essa pequena diferença de expressão

indica uma aparente modulação do miR-129 sobre o gene Bmp4 (Figura 12). Entretanto, serão necessários experimentos utilizando mimetizadores do miR-129 para se confirmar essa hipótese.

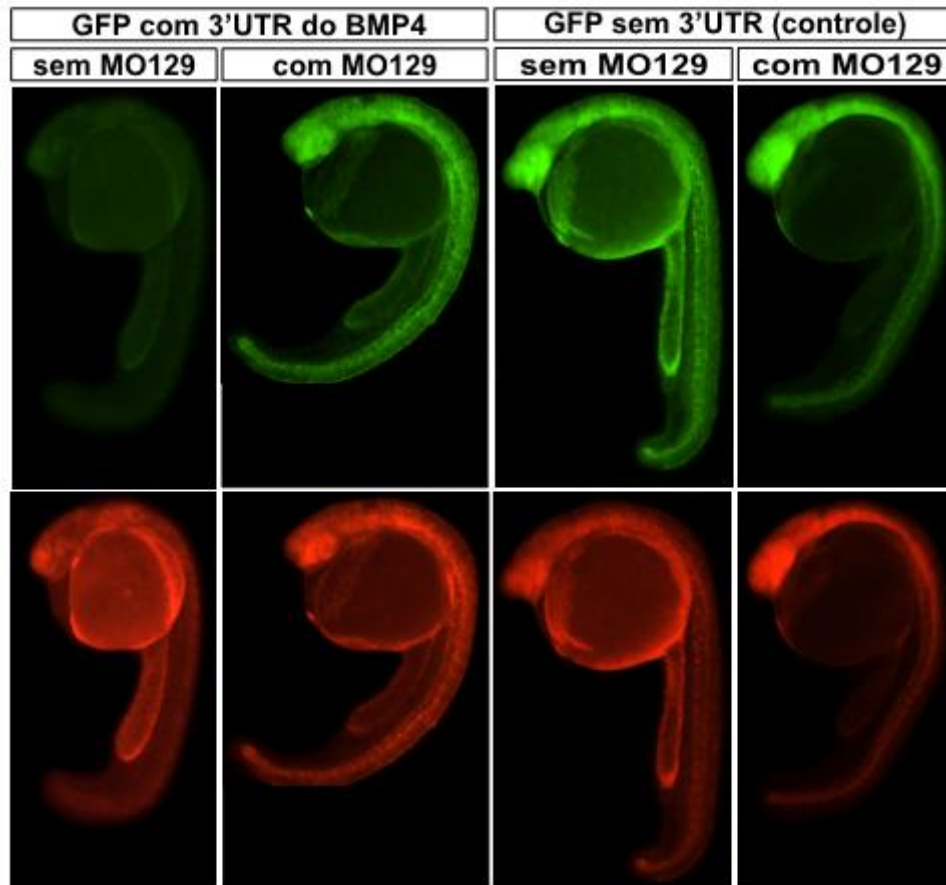


Figura 12. Repórteres demonstrando a putativa regulação do miR-129 sobre o gene Bmp4. A expressão de GFP com 3'UTR do gene Bmp4 na presença o morfolino MO129 se manteve presente, enquanto que na falta da expressão do morfolino a expressão do GFP se manteve em baixo nível. Ao se utilizar o respórter controle (sem o 3'UTR do gene Bmp4), observou-se que a expressão do GFP se manteve similar em ambos os casos, na presença e ausência do morfolino MO129. Nota-se que a expressão de dsRed manteve estável em todas as injeções realizadas.

Interessantemente, a injeção controle do GFP.BMP4 com e sem morfolino demonstrou um padrão de expressão similar so do gene Bmp4 no estágio de Shield (~6hpf; Figura 13; Hammerschmidt et al., 1996). Indicando uma possível ação de miRNAs para determinar a expressão espacial do Bmp4 nesse estágio de desenvolvimento, entretanto, nossos dados demosntraram que o miR-129 não é o responsável por essa regulação. A expressão espacial específica do Bmp4 neste período de desenvolvimento é crucial para a determinação da região dorso-ventral do embrião (Stickney et al., 2007). Apesar de diversos trabalhos terem relatado que o gradiente de expressão do Bmp4 pode ser estabelecido por em interações de fatores transciricionais em sua região promotora (Cruz et al., 2010; Ramel e Hill, 2013), os resultados obtidos na presente tese sugerem que essa regulação ocorra pela ação específica de algum miRNA, uma vez que a expressão de GFP manteve o mesmo padrão de expressão ao se injetar RNAm de GFP com a sequência 3'UTR do Bmp4.

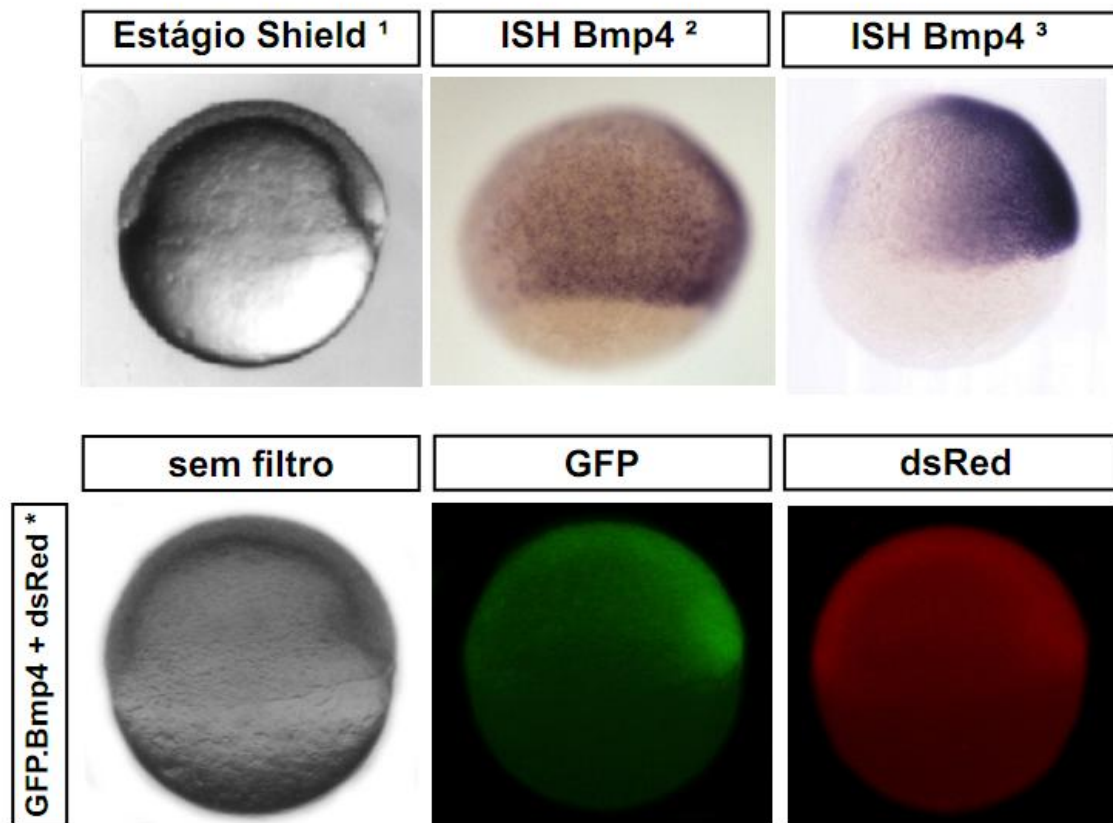


Figura 13. Comparação da expressão do gene Bmp4 no estágio de Shield do desenvolvimento de zebrafish previamente descrito com os dados adquiridos para o RNAm de GFP.Bmp4 do presente estudo. ¹Kimmel et al. (1995). ²Thisse et al. (2008). ³Cruz et al. (2010). *presente estudo.

5. CONCLUSÃO FINAL

O presente estudo demonstra que a análise genômica funcional comparativa de miRNAs por RNA-seq somado às análises de bioinformática é bastante informativa para a compreensão da rede regulatória cardíaca em vertebrados.

O amplo conjunto de dados de miRNoma analisados mostram a prevalência de um grupo seletivo de miRNAs, filogeneticamente conservados, e que, potencialmente, regulam genes previamente descritos como críticos e cruciais para o adequado desenvolvimento e manutenção da morfofisiologia do coração de vertebrados.

Experimentos funcionais, utilizando o modelo biológico zebrafish, revelaram-se eficientes para confirmação da interação miRNA-alvo. Até o momento, nossos dados revelaram a ligação entre o miR-129 e o Bmp4. Indicando uma regulação efetiva desse miRNA sobre o gene Bmp4 e a funcionalidade desse miRNA na regulação do desenvolvimento cardíaco.

A soma de todos os dados adquiridos confirmam a ação de miRNAs na rede regulatória cardíaca e que o conhecimento dessas interações podem gerar importantes subsídios para a compreensão da regulação de miRNAs no desenvolvimento e homeostasia cardíaca. Além disso, os dados podem ser integrados às redes regulatórias de doenças cardíacas e extrapolados para a possível utilização desses miRNAs em tratamentos por terapia gênica.

6. ATIVIDADES REALIZADAS

Além do desenvolvimento da presente tese, diversas atividades extras foram realizadas durante o período, como participação no desenvolvimento de outros projetos e realização de estágio supervisionado técnico no exterior (Apêndice B).

O discente foi parte integrante de um projeto de pesquisa que realizou a caracterização global de miRNAs em diferentes tecidos em ambos os sexos da tilápia do Nilo. Essa participação efetiva resultou na co-autoria do artigo intitulado “*Genome-wide microRNA screening reveals pervasive transcription of isomiRs, sex-biased arm switching and increasing complexity of expression throughout development*” submetido ao jornal científico *Scientific Reports*.

Somado a isso, o discente participou em projeto para avaliar e comparar a *performance* de algoritmos de predição de alvos de miRNA previamente publicados na literatura, com o objetivo de identificar a melhor ferramenta e metodologia a ser aplicada na predição de alvos. Esse projeto resultou na co-autoria do artigo intitulado “*Combining results from distinct microRNA target prediction tools enhances analysis performance*” submetido à publicação no jornal científico *Frontiers in Genetics*.

O discente integrou o grupo de estudos de um projeto para desenvolvimento de uma técnica molecular de baixo custo para identificação de espécie de tubarão endêmica da costa brasileira considerada criticamente ameaçada de extinção. Como resultado da participação nesse projeto, obteve-se a publicação do artigo intitulado “*A multiplex PCR approach for the molecular identification and conservation of the Critically Endangered daggenose shark*” no jornal científico *Endangered Species Research* (<http://www.int-res.com/abstracts/esr/v32/p169-175/>), no qual o doutorando atuou como primeiro autor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afouda BA, Hoppler S (2009) *Xenopus* explants as an experimental model system for studying heart development. *Trends Cardiovasc Med*, 19:220–226.
- Ahmed A et al. (2015). A Database of microRNA Expression Patterns in *Xenopus laevis*. *PloS one*, 10(10), e0138313.
- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4:e05005.
- Ashburner M et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1), 25-29.
- Asnani A, Peterson RT (2014) The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Disease Models and Mechanisms*, 7(7), 763-767.
- Asnani, A., & Peterson, R. T. (2014). The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease. *Disease Models and Mechanisms*, 7(7):763-767.
- Bakkers J (2011) Zebrafish as a model to study cardiac development and human disease. *Card Res*, 91:279–288.
- Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol*, 141(3):988-99.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215-33.
- Beis D, Stainier DY (2006) In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends in cell biology*, 16(2):105-112.
- Berezikov E (2011) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, 12:846-860.
- Bleazard T, Lamb JA, Griffiths-Jones S (2015) Bias in microRNA functional enrichment analysis. *Bioinformatics*, btv023.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20, 2911-7.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12): 1097-1101.
- Boogerd CJ, Moorman AF, Barnett P (2009). Protein interactions at the heart of cardiac chamber formation. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 191(6), 505-517.
- Breckenridge RA, Mohun TJ, Amaya E (2001) A role for BMP signalling in heart looping morphogenesis in *Xenopus*. *Developmental biology*, 232(1), 191-203.

- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1), 25-36.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3):e85.
- Bruneau BG (2002) Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res*, 90:509-519.
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S (2005) Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6, 826-837.
- Burggren W, Farrell A, Lillywhite H (2010) Vertebrate Cardiovascular Systems. In: John Wiley & Sons, Inc. (2010).
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12):1957-66.
- Cao L et al. (2012) MicroRNA expression profiling of the developing mouse heart. *Int J Mol Med*, 30(5):1095-104.
- Callis TE et al (2008) Muscling through the microRNA world. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(2):131-8.
- Chiavacci E et al. (2012) MicroRNA 218 mediates the effects of Tbx5a over-expression on zebrafish heart development. *PLoS One*, 7(11):e50536.
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3):532-4;536-7.
- Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, Moorman AF (2010) Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res*, 106:240–254.
- Cripps RM, Olson EN (2002) Control of Cardiac Development by an Evolutionarily Conserved Transcriptional Network. *Developmental Biology*, 246(1):14-28.
- Cruz C, Maegawa S, Weinberg ES, Wilson SW, Dawid IB, Kudoh T (2010) Induction and patterning of trunk and tail neural ectoderm by the homeobox gene *eve1* in zebrafish embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8):3564-3569.
- Darnell DK et al (2006) MicroRNA expression during chick embryo development. *Developmental Dynamics*, 235:3156–3165.
- Deacon DC et al. (2010) The miR-143-adducin3 pathway is essential for cardiac chamber morphogenesis. *Development*, 137(11):1887-96.
- Doench JG, Sharp PA, Sharp S (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 18(5):504-511.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome biology*, 5(1), 1.

- Esau C et al. (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*, 3(2):87-98.
- Erwin DH, Davidson EH (2009) The evolution of hierarchical gene regulatory networks. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 141-148.
- Falda M et al. (2012) Argot2: a large scale function prediction tool relying on semantic similarity of weighted Gene Ontology terms. *BMC bioinformatics*, 13(4), 1.
- Franco D, Campione M (2003) The role of Pitx2 during cardiac development: Linking left-right signaling and congenital heart diseases. *Trends Cardiovasc Med*, 13(4):157-63.
- Franco D et al. (2002) Species-specific differences of myosin content in the developing cardiac chambers of fish birds and mammals. *Anat Rec*, 268:27–37.
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic acids research*, 40(1), 37-52.
- Fish JE et al. (2011) A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Development*, 138(7):1409-19.
- Fujiwara T, Dehart DB, Sulik KK, Hogan BL (2002) Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse. *Development*, 129(20), 4685-4696.
- Jiao K, Kulesa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL (2003) An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes & development*, 17(19), 2362-2367.
- Giraldez AJ et al (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 308(5723):833-838.
- Greulich F, Rudat C, Kispert A (2011) Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovascular research*, 91(2), 212-222.
- Griffiths-Jones S (2006) miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*, 342:129-38.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36:D154-8.
- Grimes AC, Kirby ML (2009) The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *Jour Fish Biol*, 74:983-1036.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5):887-901.

- Haas BJ et al. (2008) Automated eukaryotic gene structure annotation using EVIDENCEModeler and the Program to Assemble Spliced Alignments. *Genome biology*, 9(1):1.
- Hammerschmidt M, Serbedzija GN, McMahon AP (1996) Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. *Genes & development*, 10(19):2452-2461.
- Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PC, Peterson KJ (2008) MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *PNAS*, 105:2946-2950.
- Heimberg AM et al (2010) MicroRNAs reveal the interrelationships of hagfish, lampreys, and gnathostomes and the nature of the ancestral vertebrate. *PNAS*, 107(45):19379-19383.
- Hoogaars WM, Barnett P, Moorman AF, Christoffels VM (2007) T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci*, 64(6), 646-660.
- Hosoda T et al. (2011) Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation*, 123:1287-1296.
- Howe DG, Bradford YM, Conlin T, Eagle AE, Fashena D, Frazer K, Paddock, H. (2013). ZFIN, the Zebrafish Model Organism Database: increased support for mutants and transgenics. *Nucleic acids research*, 41(D1):D854-D860.
- Huang W et al. (2013). Mir-128 targets E2f3 to regulate cardiomyocyte cell cycle re-entry. *Circulation*, 128(Suppl 22), A10616-A10616.
- Icardo JM (2006) Conus arteriosus of the teleost heart: dismissed, but not missed. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 288(8):900-8.
- Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M (2010) RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnology*, 9:102.
- Imbeaud S et al (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nuc Ac Res*, 33(6):e56.
- Ivey KN et al. (2008) MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell S Cell*, 2:219-229.
- Jensen B, Nielsen JM, Axelsson M, Pedersen M, Lofman C, Wang T (2010) How the python heart separates pulmonary and systemic blood pressures and blood flows. *J. Exp. Biol.*, 213:1611–1617.
- Jensen B, Wang T, Christoffels VM, Moorman AFM (2013) Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833:783–794.
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39(10):1278-84.
- Ketley A, Warren A, Holmes E, Gering M, Aboobaker AA, Brook JD (2013). The miR-30 microRNA family targets smoothed to regulate hedgehog signalling in zebrafish early muscle development. *PLoS One*, 8(6), e65170.

- Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5):376-385.
- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(2):126-39.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk, RH (2007) Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol*, 5(8), e203.
- Kobel HR, Du Pasquier L (1986) Genetics of polyploid *Xenopus*. *Trends Genet*. 2:310–315.
- Koshiba-Takeuchi et al. (2009) Reptilian heart development and the molecular basis of cardiac chamber evolution. *Nature*, 461:95-99.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 42(D1), D68-D73.
- Kramer-Zucker AG et al. (2005) Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development*, 132:1907-1921.
- Krutzfeldt J, Poy MN, Stoffel M (2006) Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet*, Suppl:S14-9.
- Laganà A, Veneziano D, Spata T, Tang R, Zhu H, Mohler PJ, Kilic A (2015) Identification of General and Heart-Specific miRNAs in Sheep (*Ovis aries*). *PloS one*, 10(11), e0143313.
- Lagendijk et al. (2011) MicroRNA-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting Has2 and extracellular hyaluronic acid production. *Circ Res*, 109(6):649-57.
- Lahvic JL, Ji Y, Marin P, Zuflacht JP, Springel MW, Wosen JE, Marvin MJ (2013) Small heat shock proteins are necessary for heart migration and laterality determination in zebrafish. *Developmental biology*, 384(2), 166-180.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 14(23):2162-2167.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), 1.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415-419.
- Lee Y, Han J, Yeom KH, Jin H, Kim VN (2006) Drosha in primary microRNA processing. *CSH Symp Quant Biol*.
- Lee YS, Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4:199-227.

- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell*, 120(1), 15-20.
- Lim LP et al (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027):769-773.
- Lin CC et al. (2014). Functional evolution of cardiac microRNAs in heart development and functions. *Molecular biology and evolution*, msu217.
- Liu HL, Zhu JG, Liu YQ, Fan ZG, Zhu C, Qian LM (2014) Identification of the microRNA expression profile in the regenerative neonatal mouse heart by deep sequencing. *Cell biochemistry and biophysics*, 70(1), 635-642.
- Liu J, Stainier DY (2012) Zebrafish in the study of early cardiac development. *Circulation research*, 110(6):870-874.
- Liu N et al (2008) MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.*, 22:3242Y54.
- Lillywhite HB, Zippel KC, Farrell AP (1999) Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 124:369–382.
- Lorenz R, Bernhart SH, Siederdisen CHZ, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL (2011) Vienna RNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* 2011, 6:26.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654):95-98.
- Machluf Y, Levkowitz G (2011) Visualization of mRNA expression in the zebrafish embryo. *RNA detection and visualization: Methods and protocols*, 83-102.
- Mansfield JH et al. (2004) MicroRNA-responsive ‘sensor’ transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet*, 36(10):1079-1083.
- Marco A, Hooks K, Griffiths-Jones S (2012) Evolution and function of the extended miR-2 microRNA family. *RNA biology*, 9(3), 242-248.
- Mardis ER (2011) A decade’s perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470:198-203.
- Marvin M, O'Rourke D, Kurihara T, Juliano CE, Harrison KL, Hutson LD (2008) Developmental expression patterns of the zebrafish small heat shock proteins. *Developmental Dynamics*, 237(2), 454-463.
- McFadden DG et al. (2005) The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development*, 132(1), 189-201.
- Mishima Y, Fukao A, Kishimoto T, Sakamoto H, Fujiwara T, Inoue K (2012) Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated

- silencing in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4):1104-1109.
- Miura GI, Yelon D (2011) A guide to analysis of cardiac phenotypes in the zebrafish embryo. *Methods in cell biology*, 101, 161.
- Moore K, Persaud T (2004) *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 6thed.
- Moorman AFM et al. (2003) Cardiac chamber formation: development, genes and evolution. *Physiol Rev*, 83:1223–1267.
- Morton et al. (2008) MicroRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. *PNAS*, 105(46):17830-5.
- Moulton JD, Yan YL (2008) Using Morpholinos to control gene expression. *Current protocols in molecular biology*, 26-8.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai E. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130:89–100.
- Olson EN (2004) A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med*, 10(5):467-74.
- Olson EN (2006) Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*, 313(5795):1922-7.
- Parlakian A, Tuil D, Hamard G, Tavernier G, Hentzen D, Concordet JP, Daegelen D (2004) Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Molecular and cellular biology*, 24(12), 5281-5289.
- Pase L, Lieschke GJ (2009) Validating microRNA target transcripts using zebrafish assays. *Zebrafish: Methods and Protocols*, 227-240.
- Pasquinelli AE et al. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408:86-89.
- Pearson JC et al. (2005) Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet*, 6:893–904.
- Plageman TF, Yutzey KE (2005) T-box genes and heart development: Putting the “T” in heart. *Developmental Dynamics*, 232(1), 11-20.
- Plasterk RH (2006) MicroRNAs in animal development. *Cell*, 124(5):877-81.
- Qian L et al. (2011) Tinman/Nkx2-5 acts via miR-1 and upstream of Cdc42 to regulate heart function across species. *J Cell Biol*, 193:1181–1196.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4):621-9.
- Ramel MC, Hill CS (2013) The ventral to dorsal BMP activity gradient in the early zebrafish embryo is determined by graded expression of BMP ligands. *Developmental biology*, 378(2):170-182.

- Reinhart BJ et al (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403:901-906.
- Ritchie W, Flamant S, Rasko JE (2009) Predicting microRNA targets and functions: traps for the unwary. *Nature methods*, 6(6), 397-398.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149):83-6.
- Sayed D, Abdellatif M (2011). MicroRNAs in development and disease. *Physiological reviews*, 91(3), 827-887.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7:3.
- Schunter C, Vollmer SV, Macpherson E, Pascual M (2014) Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. *BMC genomics*, 15(1):1.
- Sempere LF, Cole CN, McPeck MA, Peterson KJ (2006) The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J Exp Zool B*, 306:575-588.
- Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7(6): 633-636.
- Session AM et al. (2016) Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538:336-343.
- Shan ZX et al. (2010) miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS Lett*, 584:3592–3600.
- Simões-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, Yan CY, Davidson B, Xavier-Neto J (2005) The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol*. 2005 Jan 1;277(1):1-15.
- Sluijter JP, Mil A, Vliet P, Metz CH et al (2010) MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30:859-868.
- Small EM et al (2010) Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *PNAS*, 107(9):4218–4223.
- Staiger D (2015). Shaping the Arabidopsis transcriptome through alternative splicing. *Advances in Botany*, 2015.
- Staton AA, Giraldez AJ (2011) Use of target protector morpholinos to analyze the physiological roles of specific miRNA-mRNA pairs in vivo. *Nature protocols*, 6(12), 2035-2049.
- Staton AA, Knaut H, Giraldez AJ (2011) miRNA regulation of Sdf1 chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration. *Nature genetics*, 43(3):204-211.

- Stickney HL, Imai Y, Draper B, Moens C, Talbot WS (2007) Zebrafish *bmp4* functions during late gastrulation to specify ventroposterior cell fates. *Developmental biology*, 310(1):71-84.
- Stocks MB, Moxon S, Mapleson D, Woolfenden HC, Mohorianu, I, Folkes L, Schwach F, Dalmay T, Moulton V (2012) The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics*, 28:2059-2061.
- Sudmant PH, Alexis MS, Burge CB (2015). Meta-analysis of RNA-seq expression data across species, tissues and studies. *Genome biology*, 16(1):1.
- Synergren J et al. (2011) Expression of microRNAs and their target mRNAs in human stem cell-derived cardiomyocyte clusters and in heart tissue. *Physiol Genomics*, 43:581–594.
- Tanzer A et al. (2005) Evolution of microRNAs located within Hox gene clusters. *B Mol Dev Evol*, 304:75–85.
- Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y (2003) Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. *Genome research*, 13(3), 382-390.
- Thatcher EJ, Bond J, Paydar I, Patton JG (2008a) Genomic organization of zebrafish microRNAs. *BMC Genomics*, 9:253.
- Thatcher EJ, Paydar I, Anderson KK, Patton JG (2008b). Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47):18384-18389.
- Thisse C, Thisse B (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols*, 3(1), 59-69.
- Vacchi-Suzzi C et al. (2012). Perturbation of microRNAs in rat heart during chronic doxorubicin treatment. *PLoS One*, 7(7), e40395.
- van Rooij E et al (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316(5824):575-9.
- van Rooij E, Liu N, Olson EM (2008) MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet*, 24(4):159-66.
- van Rooij E et al (2009) A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*, 17(5):662–673.
- Wang DZ, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Olson EN (2001) Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*, 105(7), 851-862.
- Wang Y et al. (2016) ISL1 and JMJD3 synergistically control cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Nucleic acids research*, gkw301.
- Wessely O; Obara T (2008) Fish and frogs: models for vertebrate cilia signaling. *Front Biosci*, 13:1866-1880.

- Westerfield M (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Wienholds E et al (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309:310-311.
- Woltering JM, Durston AJ (2008) MiR-10 represses HoxB1a and HoxB3a in zebrafish. *PLoS ONE*, 3:e1396.
- Xia JH, He XP, Bai ZY, Yue GH (2011) Identification and Characterization of 63 MicroRNAs in the Asian seabass *Lateolabrax niloticus*. *PLoS ONE*, 6(3):e17537.
- Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R (2013) Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Yamagishi H, Yamagishi C, Nakagawa O, Harvey RP, Olson EN, Srivastava D (2001) The combinatorial activities of Nkx2.5 and dHAND are essential for cardiac ventricle formation. *Developmental biology*, 239(2), 190-203.
- Yang JS et al (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*, 17:312-326.
- Yi R et al (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Gen Dev*, 17:3011-3016.
- Yin et al. (2012) Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133. *Developmental Biology*, 365:319–327.
- Zeng Y, Cullen BR (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem*, 280(30): 27595-27603.
- Zhang R, Xu X (2009) Transient and transgenic analysis of the zebrafish ventricular myosin heavy chain (*vmhc*) promoter: An inhibitory mechanism of ventricle-specific gene expression. *Developmental Dynamics*, 238(6), 1564-1573.
- Zhao R, Watt AJ, Battle MA, Li J, Bondow BJ, Duncan SA (2008) Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice. *Developmental biology*, 317(2), 614-619.
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 436:214–220.

8. APÊNDICES:

Apêndice A. Resultados de quantificação, qualidade e integridade do RNA extraído das amostras de tecido cardíaco utilizadas no presente estudo.

Amostra ¹	Concentração (ng/μl)	A _{260/280} ²	A _{230/280} ³	RIN
TTO1140	1436,4	2,06	1,98	7,8
TTO1141	810,1	2,03	2,05	8,3
TTO1142	1020,0	2,05	1,71	8,0
TTO1143	150,0	2,35	0,60	7,9
TTO1144	1361,3	2,04	1,78	8,1
TTO1145	1088,2	2,02	1,72	8,5
TTO1146	1337,2	2,01	1,61	8,2
TTO1147	889,8	2,11	2,03	7,2
TTO1148	1121,5	2,11	1,87	8,3
TTO1149	954,2	2,10	1,72	7,9
XLA01	3508,7	1,99	1,20	8,1
XLA02	3209,1	2,00	1,45	7,9
XLA03	2873,4	2,03	1,58	8,0
XLA04	4196,8	1,95	1,62	7,8
XLA05	3504,2	2,01	1,78	8,1
XLA06	3102,3	2,05	1,86	8,2
NT25	2931,1	1,992	1,818	7,8
NT26	3541,1	1,999	1,799	7,5
NT27	3046,6	2,001	1,849	7,4
NT28	3541,1	1,976	1,875	7,9
NT29	276,7	2,016	1,796	7,7
NT30	3315,5	2,011	1,930	7,6
NT32	2454,5	2,012	2,100	7,8
NT106	1973,8	1,905	1,801	7,9
NT107	2602,3	2,062	1,895	7,6
NT108	1484,6	1,978	1,955	7,0

¹TTO = *Tropidurus torquatus*; XLA = *Xenopus laevis*; NT = *Oreochromis niloticus*. ²Relação de absorvância relativa à contaminação por proteínas. ³Relação de absorvância relativa à contaminação por compostos orgânicos (i.e., álcool, fenol, entre outros).

Apêndice B. Neste apêndice serão apresentados os dados obtidos durante estágio supervisionado no exterior.

Durante o período do doutorado, foram realizados quatro meses de estágio técnico-científico supervisionado no exterior, entre os dias 30 de outubro de 2014 e 28 de fevereiro de 2015, no Laboratório do Prof. Dr. James G. Patton, do Departamento de Biociências da *Vanderbilt University*, Nashville, Tennessee, EUA.

Neste estágio foram realizados experimentos de para geração de linhagem transgênica de zebrafish, a qual permitira realizar a análise do transcriptoma de RNAs de células individuais ao longo do desenvolvimento de zebrafish. No caso, esses indivíduos transgênicos gerados foram utilizados para obtenção de amostras de RNA específicas de células cardíacas em estágios embrionários específicos, nos quais acontecem processos biológicos cruciais para o desenvolvimento cardíaco da espécie.

A seguir apresenta-se uma breve introdução e justificativa quanto aos experimentos realizados.

1. Introdução e justificativa

Técnicas moleculares de análise em larga-escala, como microarrays e sequenciamento de próxima-geração, revolucionaram o uso da análise de expressão gênica aplicada à compreensão de processos biológicos complexos. Entretanto, técnicas para análise de células específicas integrantes de um tecido complexo, como a FACS (*Fluorescent-Activated Cell Sorting*), microdissecção e dissecção manual, possuem limitações devido a uma restrita caracterização de genes ativamente transcritos e com funções conhecidas em um tecido, além de resultar em resultados finais com muito “ruído”, devido a algumas pequenas falhas na aplicação dessas metodologias (Lobo et al. 2006; Daneman et al. 2010; Bartfai et

al. 2012; Guez-Barber et al. 2012; Sanna et al. 2012). Atualmente, têm-se destacado a utilização de uma técnica chamada *TU-tagging* para realização de transcriptoma de células específicas. Essa técnica consiste na síntese *in vivo* de moléculas de RNA com 4-thiorudine no local da base uracila (Gay et al., 2013). Para isto, é necessário gerar uma linhagem de célula transgênica que expresse o gene *uracil phospho ribosyl transferase* (UPRT) do protozoário *Toxoplasma gondii*. Esse gene possui a característica biológica de converter 4-TU (Thiuracil) em 4-thiouridine para que ocorra a incorporação do mesmo nos RNAs transcritos. Assim, o thio-RNA pode ser biotinilado, pois possui afinidade pela molécula biotina, e, conseqüentemente, purificado, de um total de RNA extraído de todos os tecidos, utilizando-se streptavidina conjugada a *beads* magnéticas. Ao final, o RNA marcado por TU, da célula específica, pode ser utilizado em análises de microarrays e/ou RNA-seq para avaliação do transcriptoma.

A técnica de *TU-tagging* têm sido utilizada em modelos de cultura celular e *Drosophila* (Cleary et al., 2005; Friedel et al., 2009; Miller et al., 2009; Lai et al., 2012). Além disso, publicações recentes demonstraram que a técnica poderia ser aplicada em vertebrados. Dois artigos demonstraram eficientemente a utilização da técnica em músculo cardíaco, cérebro, baço e embrião de camundongo (Gay et al., 2013; Gay et al., 2014). Nesses artigos, foi utilizada uma linhagem transgênica de camundongo que possui uma expressão de UPRT específica de células endoteliais independente do tecido. A análise do transcriptoma nesse estudo mostrou a expressão diferencial de genes nessas células entre os diferentes tecidos de adultos e em embriões. Outro ponto marcante na utilização da técnica consiste no fato de que o 4-TU não existe naturalmente em uma célula, sendo, portanto, necessária a aplicação de 4-TU nos indivíduos durante um período de tempo para que o RNA

transcrito seja marcado nas células que expressam o UPRT. Esta característica permite controlar o período em que a produção de RNAs transcritos marcados ocorre.

A utilização do zebrafish como modelo biológico em estudos do desenvolvimento tem sido cada vez mais difundida. Esta espécie de peixe possui características biológicas relevantes que a tornam um ótimo modelo para este tipo de estudo (Howe et al., 2013). Entretanto a realização de análise em larga escala de processos biológicos tecido-específicos ao longo do desenvolvimento é um grande problema, tendo em vista que é impossível realizar dissecação manual, e as técnicas de microdissecação e/ou *cell-sorting* produzem muito ruído na análise. Nesse contexto, a técnica de *TU-tagging* torna-se promissora e não há descrição anterior na literatura quanto à aplicação em zebrafish. Desse modo o objetivo desses experimentos foi a padronização dessa nova metodologia em embriões de zebrafish para o estudo de miRNAs no desenvolvimento cardíaco.

2. Materiais e métodos

2.1. Manutenção da linhagem de zebrafish

Os espécimes de zebrafish da linhagem AB foram mantidos em sistema de aquário à temperatura de 28°C e ciclo de luminosidade de 16 horas, no biotério do Departamento de Biociências da *Vanderbilt University*, Nashville, TN, EUA. Os embriões foram obtidos através de cruzamentos naturais entre os peixes. O cruzamento compreendia a manutenção de casais de zebrafish isolados num mesmo aquário, porém separados por um aparato durante o ciclo de escuro de 8 horas. Na manhã seguinte removia-se o separador e os casais agora em contato liberavam os gametas, ocorrendo assim a fecundação. Os embriões gerados eram

imediatamente coletados, mantidos em solução “*EggWater*” (solução salina específica para embriões de zebrafish) e selecionados para a etapa de microinjeção.

2.2. Geração da linhagem transgênica de zebrafish

O primeiro passo foi construir o vetor para adicionar a sequência de interesse no genoma de zebrafish da linhagem de wild-type AB. Assim, foi utilizada a técnica de MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit (Life Technologies), uma vez que nossos insertos eram formados por três sequências distintas: uma sequência promotora específica das células de estudo (no caso células cardíacas), uma sequência do gene GFP, que serve como marcador para linhagens transgênicas positivas, e a sequência do gene UPRT, para o processo de TU-tagging. Assim, as sequências promotoras de genes específicos de células cardíacas e do ventrículo, previamente publicadas na literatura (Huang et al., 2003; Park et al., 2009), foram isoladas diretamente do genoma de zebrafish utilizando-se os primers descritos na Tabela 10 a partir de uma PCR convencional. A sequência de GFP e UPRT inseridos em vetores distintos, já estava disponível no laboratório onde foi realizado o estágio. Para síntese do vetor com as sequências promotoras, foi utilizado o kit comercial Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Invitrogen), que permite adicionar o amplicon de PCR (no caso, as sequências promotoras de interesse) no vetor de entrada para realizar a reação de MultiSite e gerar o vetor final com as três sequências específicas na ordem correta, uma vez que os primers são sintetizados com uma cauda específica que permite isso. As reações de LR e MultiSite foram realizadas seguindo o protocolo do fabricante. Assim, os dois vetores foram gerados e checados utilizando-se enzimas de restrição SpuI e HindIII.

Tabela 10. Primers utilizados para confecção de vetores com os promotores utilizados.

Nome do promotor	Nome do primer	Sequência do primer (5' – 3')
Cardíaco	PCMLC_B4	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGGCAAAGCTTAAATCAGTTGTGT
	PCMLC_B1R	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGAGGTCAGTGTCTGCTTTGCTG
Ventrículo	PVMHC_B4	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGGCAAAGCTCGAGCCAGCTGTTATGCTGCAGTT
	PVMHC_B1R	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGAAAAGGATCCAAGTCTGCCATCTGAGCGTC

As sequências sublinhadas representam a cauda específica para a reação de MultiSite.

A metodologia escolhida para gerar a linhagem transgênica de zebrafish foi utilizando a maquinaria do elemento transponível Tol2 (Kawakami, 2007; Urasakiet al., 2008). Este elemento transponível tem sido amplamente utilizado para gerar linhagens transgênicas de zebrafish, pois é um elemento transponível específico da espécie Medaka (*Oryza latipes*) e só possui uma região de inserção no cromossomo nove do genoma de zebrafish. Assim, foi utilizado um vetor já estabelecido no laboratório para gerar o RNA mensageiro da transposase com o kit mMESSAGEmMACHINE® Kit (Life technologies). Uma vez que o vetor final as regiões de reconhecimento do elemento transponível Tol2 para retirar do vetor e inserir no genoma. Sendo assim, um mix, contendo RNA mensageiro de transposase (aproximadamente 175 ng de RNA) e o vetor final (aproximadamente 150 ng de vetor) foi gerado para realizar a microinjeção dos componentes em embriões de zebrafish (Figura 14).

A microinjeção do mix foi realizada em embriões no estágio de desenvolvimento de uma e/ou duas células (até duas horas pós-fecundação). Este período embrionário é o ideal para se realizar a microinjeção, uma vez que isso diminui o mosaicismo genético do transgenêse, ou seja, se garante que o genoma de todas as células do indivíduo microinjetado contém a sequência de interesse inserida, incluindo as células germinativas. Após a microinjeção, os embriões marcados com o GFP eram selecionados, pois esses indivíduos continham a sequência inserida no genoma.

Os indivíduos transgênicos, após atingirem a maturação sexual (aproximadamente dois meses), foram cruzados com indivíduos da linhagem AB, para recuperação de possíveis deleções aleatórias no genoma que a técnica pode causar. Assim, apenas os embriões marcados com GFP foram selecionados do resultado desse cruzamento para que a análise seguinte fosse realizada.

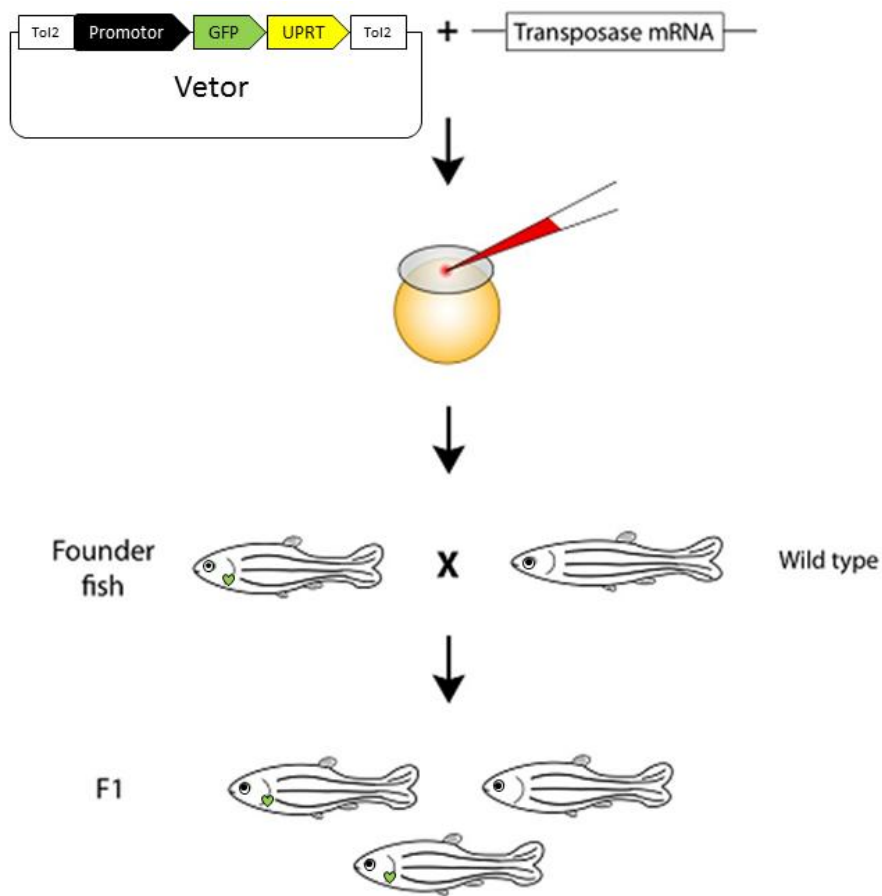


Figura 14. Tecnologia de transgenia Tol2 em zebrafish. No exemplo o tecido marcado com GFP é o coração. Imagem modificada de Kardash (2012).

2.3. Tratamento com 4-Thiuracil

Após estabelecimento da linhagem transgênica, testes de concentração de 4-TU em embriões ao longo do desenvolvimento foram realizados para verificar mortandade e sobrevivência dos embriões em meio com 4-TU. Já que doses muito

baixas de 4-TU geram baixa concentração de RNAs marcados e altas doses podem ser tóxicas. Assim, um teste contendo grupo controle foi realizado com as concentrações de 0,8 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml e 0,01 mg/ml, para se determinar a melhor concentração para o tratamento. O teste foi replicado três vezes para uma melhor confiabilidade no teste de sobrevivência.

2.4. Purificação do RNA marcado

Após verificar a concentração ideal de 4-TU nos embriões transgênicos, a purificação do RNA foi realizada a partir de um pool de 25 embriões por amostra. Foi realizada a extração do RNA utilizando-se o kit comercial miRNeasy (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante.

Após a extração do RNA do embrião total, foi realizada a biotilação das moléculas de RNA marcadas por 4-thiorudine com o kit EZ-Link® HPDP-Biotin (Thermo scientific), seguindo o protocolo do fabricante. Após a etapa de biotilação, o RNA marcado foi isolado do RNA não-marcado utilizando o kit μ Macs streptavidin (Macs molecular), seguindo o protocolo do fabricante, com a exceção de que para a eluição final foi utilizado 100 mM de 2-mercaptoethanol.

Para retirar o 2-mercaptoethanol das amostras, foi utilizado o kit RNeasy Mini Elute columns (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A amostra final foi quantificada, verificada a contaminação e integridade com o aparelho NanoDrop e Bioanalyzer, como descrito anteriormente no relatório parcial.

2.5. Verificação do RNA por qPCR

Para verificar se o RNA isolado possuía expressão diferencial entre o RNA marcado e o não-marcado, foi realizada reação de qPCR do gene endógeno U6

snRNA (*small nuclear RNA*). Para esta reação foi utilizado o kit comercial *TaqMan® MicroRNA Assays* (Life technologies), que consiste em uma reação para gerar o cDNA específico do RNA a ser analisado e uma reação em tempo real com primers e sonda específicos do gene. Todas as reações de qPCR foram realizadas segundo normas estabelecidas no "*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments- MIQE Guidelines*" (Bustin et al., 2009). A análise estatística foi realizada pelo cálculo de quantificação absoluta descrito por Bel et al. (2011).

3. Resultados e discussão

Os vetores sintetizados para gerar as linhagens transgênicas foram utilizados com sucesso, e apresentaram uma ótima confiabilidade ao se realizar as reações de verificação da integridade com as enzimas de restrição. Dessa maneira, após as microinjeções dos vetores, pode-se confirmar que as linhagens transgênicas foram geradas com sucesso, uma vez que os embriões em desenvolvimento apresentavam marcação com GFP apenas nos tecidos específicos esperados (Figura 15).

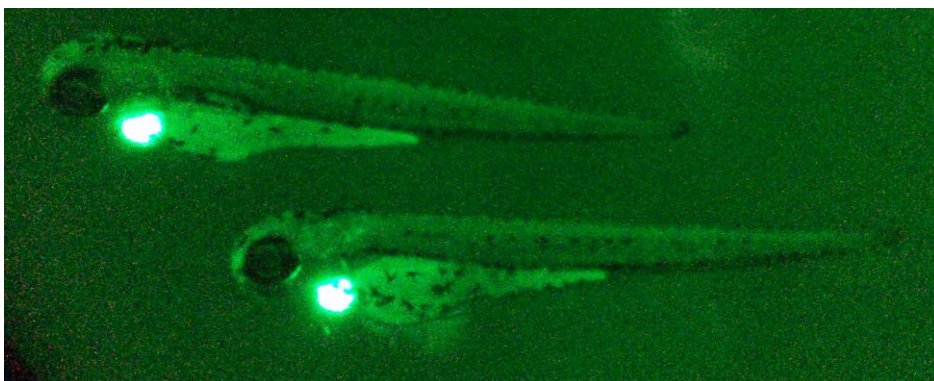


Figura 15. Embriões de linhagem transgênica de zebrafish com marcação GFP no tecido cardíaco em desenvolvimento, confirmando a especificidade do promotor utilizado (no caso o promotor do gene CMLC).

Os testes de concentração demonstraram que a melhor concentração de 4-TU foi a de 0,4 mg/ml, a qual resultou numa alta taxa de sobrevivência (~92%; Figura 16). Portanto, essa concentração resultou numa maior probabilidade de produção de RNA marcado nas células de estudo, já que baixas concentrações de 4-TU não produzem alta quantidade de RNA marcado (Gay et al., 2013). Dessa maneira, a concentração de 0,4mg/ml foi selecionada para as análises posteriores.

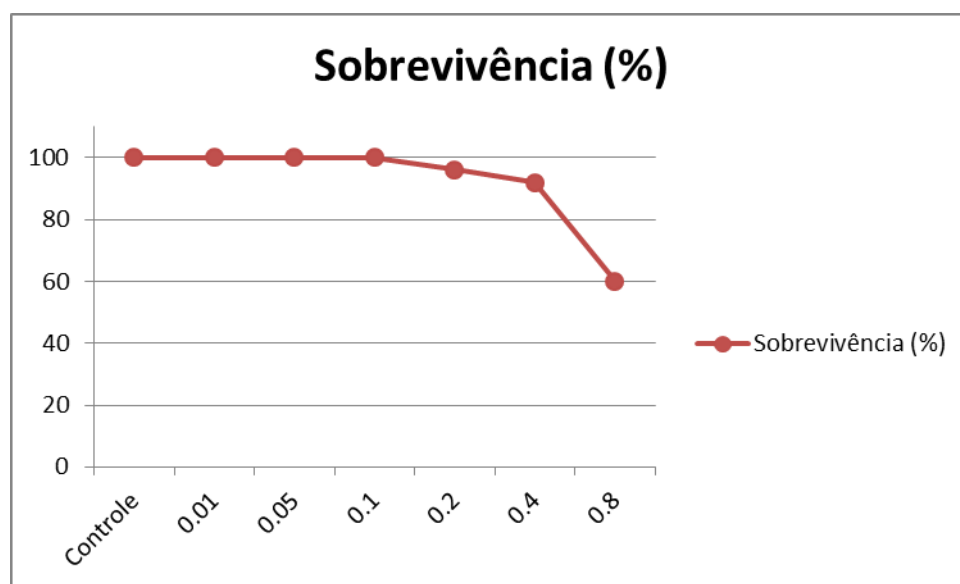


Figura 16. Gráfico de taxa de sobrevivência de embriões em diferentes concentrações de 4-TU.

Após iniciar os tratamentos com 4-TU nos embriões das linhagens transgênicas geradas. Foram realizados teste com qPCR para verificação do Cq entre amostras do embrião transgênico (CLMC e VMHC) e wild-type, para verificar expressão diferencial do U6 entre essas amostras. Entretanto, os resultados de qPCR demonstraram que o tratamento com 4-TU não resultava em moléculas de RNA marcadas, uma vez que os valores de Cq foram semelhantes para todas as amostras (Figura 17).

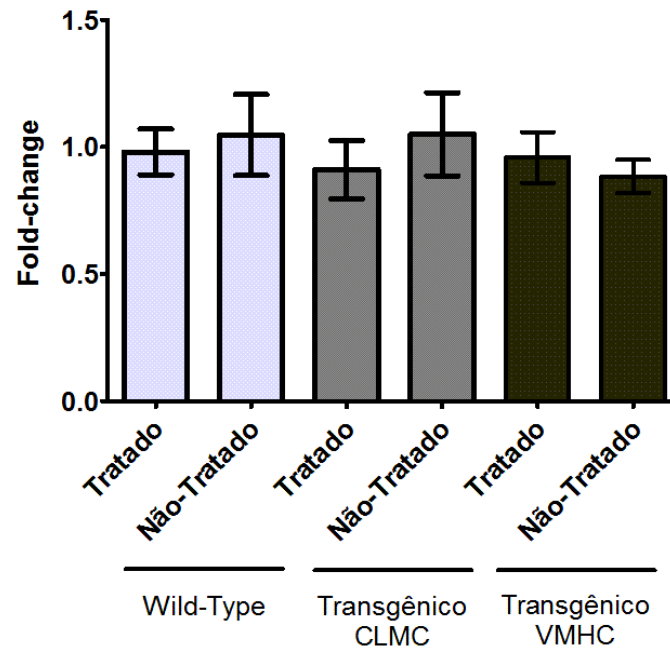


Figura 17. Gráfico da quantificação absoluta de U6 entre as amostras analisadas.

Para verificar se a produção de UPRT era suficiente, foi proposto realizar uma análise de expressão protéica do gene nessas amostras através da técnica *Western blot*. Entretanto, a análise para esse gene não estava padronizada no laboratório, e por ser um processo demasiadamente laborioso não pôde ser finalizado antes do retorno ao Brasil. Assim, essas análises deverão ser concluídas por outro pós-graduando nos EUA, dentro da colaboração estabelecida. Embora não conclusivos, os dados gerados são promissores para auxiliar na aplicação de técnicas moleculares distintas em zebrafish para facilitar o entendimento de vias moleculares envolvidas no desenvolvimento da espécie. Destaca-se ainda que o período de estágio no exterior foi importante e suficiente para o aprendizado de todas as técnicas necessárias para o desenvolvimento de linhagens transgênicas de zebrafish.