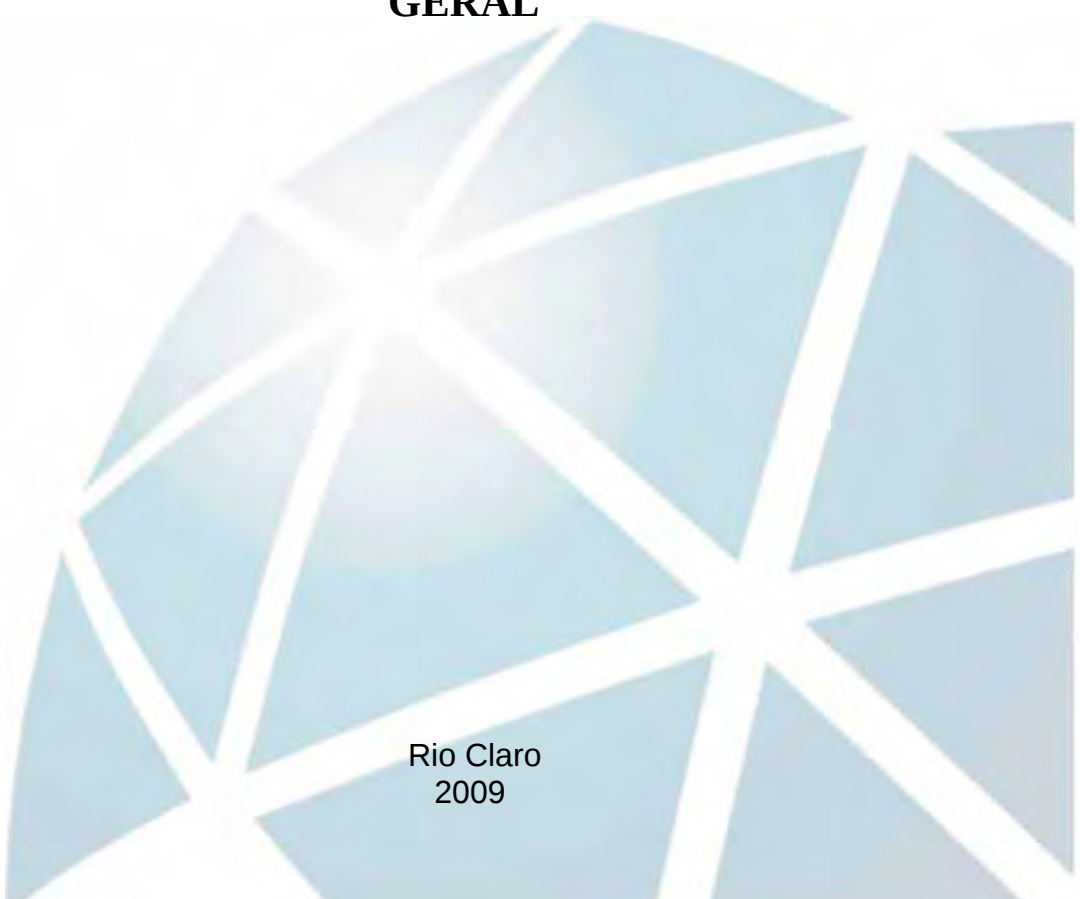

Ciências Biológicas

LEANDRO GOMES DA SILVA

**OS PAPÉIS DOS RNAs NÃO CODIFICANTES NO
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO: UM PANORAMA
GERAL**



Rio Claro
2009

LEANDRO GOMES DA SILVA

Os papéis dos RNAs não codificantes no desenvolvimento
embrionário: um panorama geral

Orientadora: Dr^a LUCIA ELVIRA ALVARES

Supervisor: Dr. MAURICIO BACCI JÚNIOR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2009

574 Silva, Leandro Gomes da
S586p Os papéis dos RNAs não codificantes no desenvolvimento
embrionário : um panorama geral / Leandro Gomes da Silva. - Rio Claro :
[s.n.], 2009
29 f. : il., figs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Lucia Elvira Alvares

1. Biologia do desenvolvimento. 2. Transcritos alternativos. 3.
Embriogênese. 4. Epigenética. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

À Elizabeth, mãe e rainha da minha vida

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, por toda a força que Ele tem me proporcionado ao longo de toda essa jornada. Em segundo lugar, a toda a minha família, por todo o suporte, por terem acreditado em mim, por tudo que eu sou, pelas brigas, dificuldades, alegrias, à minha super mãe Elizabeth, a quem devo honrar por toda a minha vida; ao meu finado pai, José, o qual, infelizmente, não tive a honra de conhecer muito bem, mas creio que alcancei o que ele almejou a todos os seus filhos, obrigado pai, você foi um motivo de inspiração pra mim; aos meus queridos irmãos: Cesar, Douglas, Tatiana e Félix, que me deram todo o suporte e hoje espero poder retribuir todos os seus favores e contribuir com tudo o que aprendi; às minhas cunhadas Simone, Vanusa e Elisangela, que vêm apoiando os meus irmãos e trazendo melhorias às suas vidas; aos meus sobrinhos Cesar Junior, Julio Cesar, Kauê, Kawane, Karina, Karen, Gustavo e Félix Junior, que são o futuro de nossa família; à minha tia Luciana e aos meus primos Daiane, David, Hellen, Yohanna, Gabriel e Tamilly, por integrarem essa rede familiar; enfim, a todos os amigos da família, por toda ajuda e suporte.

Aos meus amigos, que muito me ajudaram, desde a tomada de decisões até ações concretas, por todos os momentos alegres e também críticos pelos quais passamos, vocês são inesquecíveis para mim: José Filho, meu irmaozão; Anderson Cesar, minha imagem refletida no espelho (rs); Carmem e Monica, pelo imenso carinho; Fernanda, Kilda, Lucilene, por acreditarem no meu potencial e por proporcionarem os momentos mais agradáveis do meu expediente; Zélia, minha mãezona de Rio Claro; Eilazake, Aline, Elisangela, Patrícia, igualmente por partilharem momentos agradáveis e dificuldades no ambiente de trabalho; a todos os amigos da Santa Casa de Rio Claro, que me ajudaram a alcançar mais essa vitória; Gustavo, carinhosamente chamado de “hipócrita”, mas que na verdade é um amigo de todas as horas e está sempre pronto a oferecer seu alto astral.

Aos meus amigos e irmãos da república Black Out, onde vivi grande parte da minha graduação, e por isso me lembrarei por toda a vida: Gustavo “Tropeço”, sua grande estatura também traz um grande coração e uma canção em seu cavaquinho; Gabriel “Gnomo”, com sua discrição de todo bom mineiro, seu grande esforço também serviu de inspiração a mim; Sérgio “Miagui”, por sua disciplina e sábios ensinamentos; ao grande Alessandro “Perdido”, companheiro de curso, sempre pronto a estender a mão e a partilhar as mesmas dores; Ives “Xaxim”, com quem dividi o quarto nos últimos dois anos, por seus discursos retóricos e engraçados; Leonardo “Pataca”, ex morador e agregado eterno, obrigado também por suportar minhas noites de ronco; Sidnei “Néia”, que passou apenas um ano conosco, mas que deixou sua contribuição e exemplo de homem trabalhador, sempre de bom humor. Aos nossos animaizinhos de estimação Ping e Antonio, por atuarem como uma válvula de escape ao nosso estresse, por tornarem a casa mais alegre e barulhenta; Bambina, nossa mascote oficial, conseguido com muito esforço e afinco dos moradores.

À minha orientadora, Dr^a Lucia Elvira Alvares, por me acompanhar em meio as agruras e pela paciência; a doutoranda Débora e ao mestrando Denner, do departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP, por toda a ajuda e boa vontade.

Aos meus amigos e mestres da graduação, por todo ensinamento, por todas as alegrias e aflições, enfim, aqui deixo o meu mais sincero desejo de boa sorte aos que porventura não mais verei tão cedo. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O genoma de um organismo multicelular apresenta um vasto repertório de sequências que são transcritas em RNA não codificantes de proteínas. Esses ncRNAs atuam na manutenção e regulação gênica, bem como na sinalização e diferenciação celular, eventos cruciais para o desenvolvimento embrionário e ontogenético. Além disso, outros eventos requerem a expressão ordenada desses transcritos, como nos processos de inativação cromossômica e imprinting genômico, podendo a sua falha originar diversas síndromes, malformações, doenças e até mesmo a morte do indivíduo afetado. Esta revisão procura apresentar as principais formas de atuação dos ncRNAs já estudadas, bem como apresentar o panorama atual de transcritos da família Dapper (Dpr) e sua atuação no desenvolvimento de vertebrados.

ABSTRACT

The genome of multicellular organisms shows a huge index of RNA transcripts that are not protein coding. These ncRNAs act in housekeeping and genic regulation, as well in signaling and cell differentiation, crucial events to embryonic and ontogenetic development. Moreover, another events require the orderly expression these transcripts, as in chromosomal inactivation and genomic imprinting process, and their fail may cause several syndromes, malformations, illness and even death of affected individual. This review focus is to present the main acting pathways of ncRNAs already studied, as well to introduce the actual landscape of Dapper gene cluster and its performance in vertebrate development.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.	6
1.1. Os papéis do RNA não codificante (ncRNA)	7
1.2. Principais ncRNAs de cadeia curta	7
1.2.1. Micro RNAs	7
1.2.2. siRNAs	7
1.2.3. piRNAs e rasiRNAs	8
1.2.4. SnoRNAs	8
1.3. Classificação e funções dos ncRNAs	9
2. Alguns mecanismos moleculares envolvendo ncRNAs	11
2.1. Inativação do cromossomo X	11
2.2. Imprinting genômico	12
3. Exemplos de fatores regulados em cis	14
3.1. Igf2 e H19	14
3.2. Kcnq1 e Kcnq1ot1	15
3.3. Igf2r e Airn	16
4. Exemplo de fatores regulados em trans	18
4.1. HOTAIR – o antisense Hox	18
4.2. Genes Dlx e os transcritos Evf-1 e Evf-2	19
5. Os genes da família Dapper.	22
5.1. Breve histórico	22
5.2. Estrutura do DACT1	23
5.3. Transcritos variantes gerados a partir do gene Dpr1	24
6. Considerações finais	25
7. Referências	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os papéis do RNA não codificante (ncRNA)

De acordo com o dogma proposto pela biologia molecular, nosso genoma está organizado de forma a conter toda a informação genética na molécula de dupla hélice, o DNA, representando todo o patrimônio genético de um indivíduo de uma espécie em particular. Esse DNA codificaria, através da transcrição, outra molécula de suma importância para o funcionamento da maquinaria genética e para a coordenação dos processos metabólicos do organismo: o RNA mensageiro (mRNA), cuja função primordial é servir de molde para a tradução de proteínas. Em resumo, o DNA é transcrito em RNA, que por sua vez, é traduzido em proteínas funcionais. No entanto, recentemente descobriu-se que a porção do genoma responsável por todo esse processo corresponde a ~ 1 a 2% apenas, ao passo que 98% de todo o genoma transcrível humano é representado por RNAs que não codificam proteínas (BROSNAN e VOINNET, 2009). Esses RNAs não codificantes (ncRNAs) consistem em transcritos que não possuem ORFs (do inglês *Open Reading Frames* - módulos abertos de leitura) – sequências de bases potencialmente codificadoras de proteínas – e são muito difíceis de serem previstos em sequências genômicas (COSTA, 2005; XUE e LI, 2008). Observando que o número de genes codificadores de proteínas é teoricamente insuficiente para controlar o complexo programa transcrível dos vertebrados, Mattick observou que a porcentagem do genoma transcrito em ncRNA aumenta com a complexidade do organismo (MATTICK, 2004 apud CARNINCI, 2008).

ncRNAs como um grupo heterogêneo pode ser dividido em três diferentes classes, de acordo com o comprimento de sua sequência de nucleotídeos e com suas diferentes funções. De acordo com o comprimento podem variar de (1) ~ 18 a 25 nucleotídeos para a família dos micro RNAs e pequenos RNAs de interferência (siRNAs); (2) ~ 20 a 300 nucleotídeos para RNAs curtos comumente encontrados como reguladores transcripcionais e traducionais, predominantes em procariotos (STORZ, 2002); ou (3) acima de 10.000 nucleotídeos de comprimento para RNAs envolvidos em outros processos – longos ncRNAs (lncRNAs) (COSTA, 2006). No entanto, definir lncRNAs simplesmente tomando-se como base seu comprimento ou pela incapacidade de codificar proteínas não representa um resultado

satisfatório (PONTING et al., 2009).

Transcritos de ncRNAs podem ser divididos entre ncRNAs *housekeeping* e ncRNAs regulatórios (PONTING et al., 2009). Transcritos *housekeeping* incluem os RNAs ribossomal, de transferência, snRNAs (pequenos RNAs nucleares), snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares), e geralmente são expressos constitutivamente. Dentre os ncRNAs regulatórios curtos estão os micro RNAs, siRNAs e Piwi RNAs; entretanto, a maioria desses transcritos está associada com lncRNAs (MATTICK e MAKUNIN, 2006 apud PONTING et al., 2009).

1.2. Principais ncRNAs de cadeia curta

1.2.1. Micro RNAs

Constituídos de ~ 22 nt, produzidos a partir de estruturas *hairpir* (pareamento endógeno) imperfeitos presentes em ncRNAs longos, precursores de introns de genes codificantes e não codificantes, processados em duas clivagens consecutivas pela ribonuclease Drosha e pela proteína de ligação de RNA Pasha e são digeridos pela ribonuclease específica, de dupla fita, Dicer (CULLEN, 2004; GREGORY et al., 2004 apud SIRACUSA e BUCHBERG, 2008). Moléculas maduras de miRNA interagem entre si por pareamento de bases com alvo no mRNA para modular a translação ou degradação direta entre efetores associados das famílias Argonauta e Piwi (Ago/Piwi) (AMARAL e MATTICK, 2008). Nos animais, miRNAs possuem centenas de sítios alvo, que podem incluir ncRNAs e regular o desenvolvimento a partir de diferentes formas, incluindo nas sinalizações Notch, Nodal e Hedgehog (CHOI et al., 2007; FLYNT et al., 2007; HORNSTEIN et al., 2005; LAI et al., 2005; MARTELLO et al., 2007; STARK et al., 2003 apud AMARAL e MATTICK, 2008). miRNAs podem controlar os programas de controle de expressão durante o desenvolvimento ligando-se a sítios regulares de splicing transcrição, como com as proteínas da família Hox. Mais recentemente, mostrou-se que miRNAs também estão envolvidos no controle da metilação do DNA em células tronco embrionárias de camundongos ligando-se a sítios de metiltransferases, interferindo na expressão gênica e na homeostase do comprimento dos telômeros (BENETTI et al., 2008; SINKKONEN et al., 2008 apud AMARAL e MATTICK, 2008), desempenhando um importante papel na conservação do material genético.

1.2.2. siRNAs

Curtos RNAs de transferência (*small interference RNAs* – siRNAs) possuem ~ 21 nt de comprimento, similar ao tamanho dos micro RNAs, porém derivados de precursores de RNA de dupla fita (a partir de duplex RNA:RNA ou de longos hairpins internos), diretamente processados por Dicer (FARAZI et al., 2008 apud AMARAL e MATTICK, 2008). Geralmente, associam-se a sítios de RNA sinalizando sítios de degradação. No entanto, siRNAs também podem silenciar transposons e participar em processos regulatórios endógenos que controlam a expressão gênica durante o desenvolvimento (AMARAL e MATTICK, 2008).

1.2.3. piRNAs e rasiRNAs

RNAs de interação Piwi (piRNAs) possuem ~ 28 – 33 nt de comprimento e são encontrados associados a proteínas PIWI em células germinativas masculinas e em ovócitos de animais. Inicialmente, foram descobertos em testículos de camundongo e aparentemente são derivados de precursores de ncRNAs de fita simples processados independentes ao Dicer (AMARAL e MATTICK, 2008). Já os RNAs de associação repetidos (rasiRNAs) possuem cerca de 23 – 28 nt, e foram descobertos em *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* e aparentemente correspondem a piRNAs nesses organismos. Parecem estar envolvidos no controle de atividade de transposons em *Drosophila*, *C.elegans*, peixes e mamíferos, e são essenciais para a viabilidade das células germinativas (FARAZI et al., 2008 apud AMARAL e MATTICK, 2008).

1.2.4. SnoRNAs

Pequenos RNAs nucleolares (*small nucleolar RNAs* – snoRNAs) possuem ~ 60 – 300 nt, são moléculas de ação trans que funcionam como guias específicos para complexos protéicos efetores de modificações em nucleotídeos de RNAs alvo, a partir de pareamento específico de bases próximas a sítios de modificação (BACHELLERIE et al., 2002 apud AMARAL e MATTICK, 2008). Cerca de centenas de snoRNAs foram descritos em humanos, porém, a maioria deles são encontrados entre outros metazoários, processados a partir de transcritos precursores de ambos introns, codificantes e não codificantes. Originalmente, pensa-se que esses RNAs tiveram funções na modificação e infra estrutura de rRNAs e tRNAs, desempenhando assim, exclusivamente, uma função housekeeping. Entretanto, muitos snoRNAs não possuem sítios de ligação reconhecidos e alguns são expressos especificamente em determinados tecidos, etapas do desenvolvimento ou clado, em diferentes eucariotos, especialmente no tecido cerebral (AMARAL e MATTICK, 2008).

1.3. Classificação e funções dos ncRNAs

De acordo com Ponting et al. (2009) um ncRNA pode estar situado dentro de uma ou mais dentre cinco categorias: (1) senso, ou (2) antisenso, quando sobrepõem-se a um ou mais éxons ou a outro transcrito na mesma fita ou na fita oposta, respectivamente; (3) bidirecional, quando a expressão do mesmo e de um transcrito vizinho codificado na fita oposta é iniciado em uma proximidade genômica; (4) intrônico, quando é derivado totalmente dentro de um íntron de um segundo transcrito (embora as vezes isso possa representar apenas sequências pré mRNA); ou (5) intergênico, quando estão dentro de um intervalo genômico entre dois genes. A expansão de genes não codificadores de proteínas e que especificam RNAs regulatórios preenchem uma ampla gama de funções na biologia celular e do desenvolvimento (TAFT et al., 2007) e em muitos casos esses ncRNAs foram encontrados regulando a expressão gênica. A maioria deles atua através de padrões de expressão gênica mediados por RNAi (RNA de interferência), no entanto, alguns ncRNAs regulam a expressão gênica em cis (HARTZOG e MARTENS, 2009), quando o RNA antisenso é transcrito na mesma região cromossômica do gene alvo, na fita oposta (NUMATA et al., 2007). Nesses casos, o ato da transcrição por si só em vez de gerar RNA como produto final, passa a mediar a regulação de um gene sobreposto (HARTZOG e MARTENS, 2009). Muitos elementos regulatórios em cis atuam em múltiplos níveis, como na arquitetura da cromatina, transcrição, *splicing*, modificação e edição do RNA, tradução e estabilidade do RNAm (TAFT et al., 2007).

Quanto aos RNAs antisenso codificados em trans, transcritos de um locus cromossômico diferente do gene regulado (NUMATA et al., 2007), estes podem recrutar fatores de transcrição de uma maneira sequência-específica para precisar posições nos cromossomos, a fim de reduzir o risco de transcrição errônea devido a especificidade ambígua de seu sítio de ligação oposto às sequências alvo do DNA (SUZUKI e HAYASHIZAKI, 2004). A maioria dos fenômenos epigenéticos, senão todos, é dirigida por RNAs antisenso em trans, a sinalização desses RNAs parece estar envolvida com os processos de metilação do DNA, *imprinting* genômico, transfecção, variação no efeito de posição, remodelagem da cromatina e ativação e repressão de domínios nos cromossomos (MATTICK, 2003). Mecanismos epigenéticos são modificações ocorrentes no material genético que não modificam a sequência de nucleotídeos, porém, causam modificações conformacionais na molécula de DNA (COSTA, 2007). Metilação da citosina no DNA e modificações que ocorrem nas histonas, como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, etc, são as

modificações epigenéticas mais estudadas, e elas implicam em uma variedade de mecanismos regulatórios na expressão gênica (COSTA, 2007).

Funcionalmente, ncRNAs possuem importantes papéis em uma larga escala de eventos biológicos, incluindo compensação de dose e inativação do cromossomo X, imprinting genômico, resposta a condições de estresse, regulação de atividades de proteínas no controle transcricional, função neuronal, regulação do desenvolvimento, e localização de RNAs e de proteínas (SUZUKI e HAYASHIZAKI, 2004). Algumas doenças podem estar relacionadas com ncRNAs, como desordens neurocomportamentais e do desenvolvimento, bem como certas formas de câncer (SZYMANSKI et al., 2005; PEREZ et al., 2007). Mudanças no nível de expressão ou alterações genéticas e epigenéticas afetando ncRNAs acompanhando processos de malignidade apoiam fortemente o papel funcional do RNA, especialmente nos casos em que genes de ncRNAs são alterados por mutações cromossômicas (SZYMANSKI et al., 2005).

2. ALGUNS MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVENDO ncRNAs

Apesar de que alguns mecanismos de atuação dos ncRNAs já foram parcial ou completamente elucidados, não se deve fazer generalizações sobre tais mecanismos tomando-se como base alguns poucos, embora bem conhecidos, estudos de caso (PONTING et al., 2009). A seguir, alguns exemplos de atuação dos ncRNAs, mostrando a sua grande versatilidade.

2.1. Inativação do cromossomo X

Nos mamíferos a compensação de dose é alcançada pela inativação de um dos dois cromossomos X nas células somáticas das fêmeas. Esse mecanismo de compensação de dose tem a função de equalizar a dosagem entre produtos gênicos do cromossomo X de machos e fêmeas. As mutações que interferem na compensação de dose são letais, demonstrando a necessidade da manutenção da relação correta entre os produtos gênicos dos cromossomos X para com os dos autossomos (ALBERTS et al., 2004). Antes da inativação aleatória do cromossomo X, ocorre a interação intercromossômica entre o locus do centro de inativação X (XIC) nos cromossomos X. Esse evento pode promover a interferência entre os dois XICs, promovendo a contagem do número de cromossomos X em uma célula e determinando qual dos dois cromossomos será inativado. O futuro cromossomo X inativado é caracterizado por um acúmulo do ncRNA *Xist*. Dentro do XIC há três genes codificantes de ncRNAs que regulam um ao outro: *Xist*, *Tsix* e *Xite*. *Xist* tem 17 Kb de comprimento e é capaz de se ligar fisicamente e formar complexos com a cromatina adjacente do cromossomo X nas fêmeas (COSTA, 2007), sendo requerido para o início da inativação de um dos cromossomos X; *Tsix* é o antisenso de *Xist* e promove o silenciamento do mesmo; e *Xite* regula positivamente a transcrição de *Tsix* (KIEFER, 2007). Ambos os transcritos podem afetar diretamente as modificações na cromatina e assim alterar o nível de proteínas ligantes ao DNA do cromossomo X (COSTA, 2007). Dessa forma, XIC é regulado pela ação oposta de transcritos senso e antisenso em cis (WHITEHEAD et al., 2008) (Figura 01).

2.2. Imprinting genômico

Imprinting é o processo pelo qual as marcas epigenéticas permitem a expressão monoalélica de um único parental. Há cerca de centenas de genes em imprinting, muitos dos quais regulam o crescimento fetal e placentário (KIEFER, 2007). Embriões com deficiência na metilação morrem no meio do período de gestação, demonstrando o papel essencial e dosagem-dependente do imprinting genômico de mamíferos (BOURC'HIS e PROUDHON, 2008). Geralmente, o mecanismo de imprinting envolve a metilação do DNA de um dos alelos de um ou de muitos genes do mesmo locus gênico. A maioria das regiões que possui controle da expressão monoalélica tem ncRNAs mapeados para a mesma região (ou nas proximidades) e estes estão relacionados ao processo de silenciamento (COSTA, 2007). Diversos grupamentos gênicos são regulados por imprinting, e os ncRNAs possuem um papel crucial no silenciamento ou ativação da expressão gênica. A seguir, três grupos são exemplificados: *Igf2* (fator de crescimento semelhante a insulina), *Kcnq1* (canal de potássio voltagem-dependente), e *Igf2r*, cujos silenciadores são respectivamente os ncRNAs *H19*, *Kcnq1ot1* e *Airn* (anteriormente conhecido como *Air*, mas recentemente renomeado para *Airn*, segundo o Comitê de Nomenclatura dos Genes – HUGO) (STRICKER et al., 2008). Embora atuem de maneira cis regulados, a maioria desses ncRNAs, com uma possível exceção de *Kcnq1ot1*, também servem como transcritos hospedeiros para regulação trans de RNAs curtos, como siRNAs, miRNA e snoRNA (KOERNER et al., 2009)

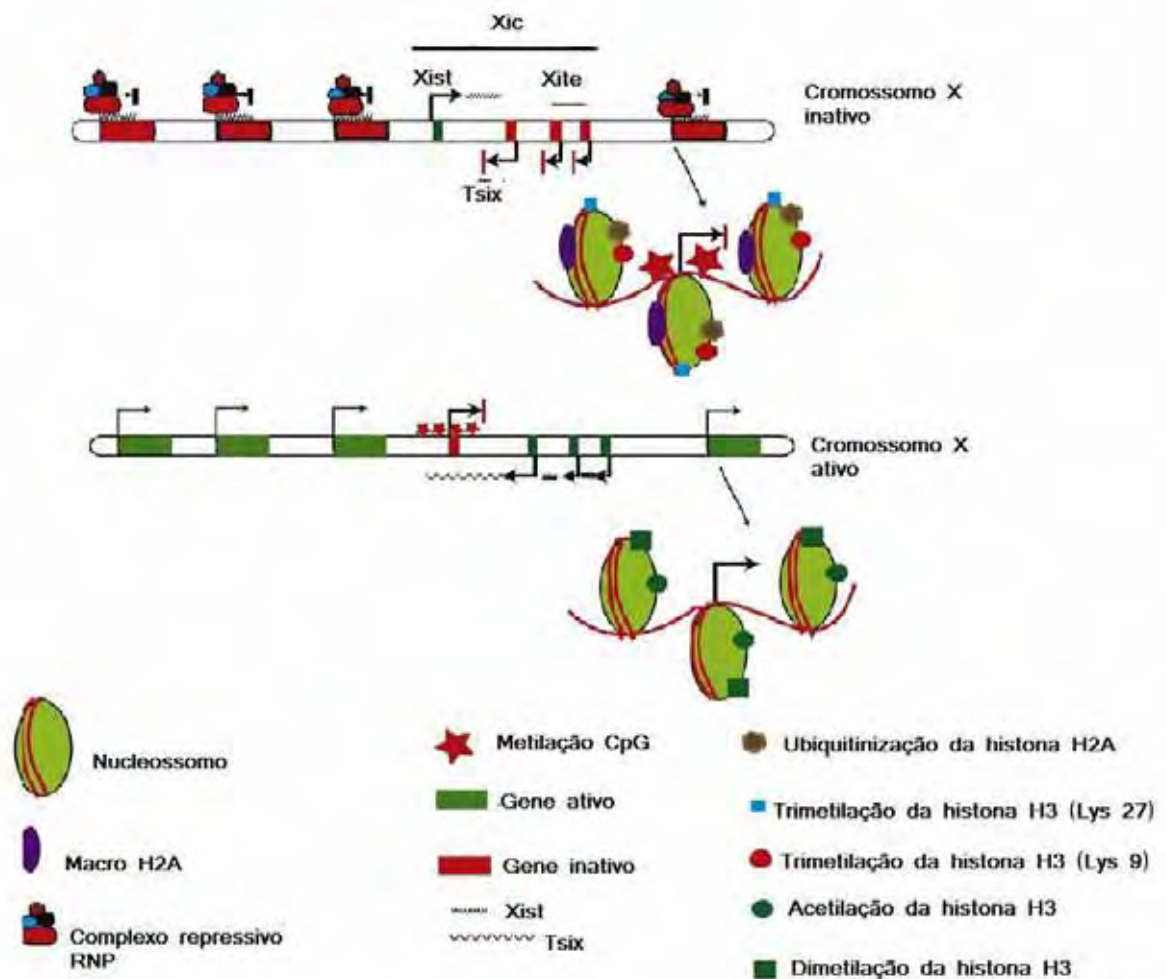


Figura 01 – Esquema representando a inativação do cromossomo X. No cromossomo X inativo, a transcrição de *Xist* e o seu acúmulo ao longo do cromossomo leva à oclusão de RNAPII, seguido pelo recrutamento hierárquico dos processos epigenéticos, levando ao silenciamento transcricional. O silenciamento de *Xist* no cromossomo X ativo é devido ao RNA antisenso *Tsix*, ou sua transcrição permite a expressão de genes ligados ao cromossomo X. Extraído de J. Whitehead, et al., *Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs*, *Biochim. Biophys. Acta* (2008).

3. EXEMPLOS DE FATORES REGULADOS EM CIS

3.1. Igf2 e H19

Esses genes estão localizados próximos um do outro, no cromossomo 11 humano. Numa dada célula, uma cópia de H19 no cromossomo materno é expresso, ao passo que a outra cópia no cromossomo paterno é silenciada; para Igf2 ocorre o inverso, a cópia paterna é expressa, ao passo que a cópia materna é silenciada. Duas sequências regulatórias são essenciais para a expressão diferencial entre esses dois genes: um *enhancer* (regulado *downstream* do gene H19) e um elemento isolador (região de controle do imprinting – ICR), localizado entre o H19 e o Igf2. Elementos enhancer são uma importante classe de sequências cis regulatórias, que compartilham ambas características estruturais e mecanismos de ação comuns. Aumentam drasticamente o nível de transcrição de um promotor, em um modo independente de orientação e posição. Enhancers possuem tipicamente 100 a 300 pb de comprimento, e contêm múltiplos sítios curtos de ligação para diferentes ativadores e repressores de transcrição (LUDWIG, 2002). O enhancer pode ativar qualquer um dos genes, dependendo do estado de metilação do ICR. Assim, o enhancer não pode ativar o gene Igf2 no cromossomo materno, pois nesse cromossomo o ICR está ligado a uma proteína silenciadora CTCF, que bloqueia os ativadores do enhancer para o gene Igf2. No cromossomo paterno, em contraste, o elemento ICR e o promotor H19 estão metilados. Nesse estado, a maquinaria transcricional não pode se ligar ao ICR. Como resultado, o enhancer ativa o gene Igf2 (Figura 02).

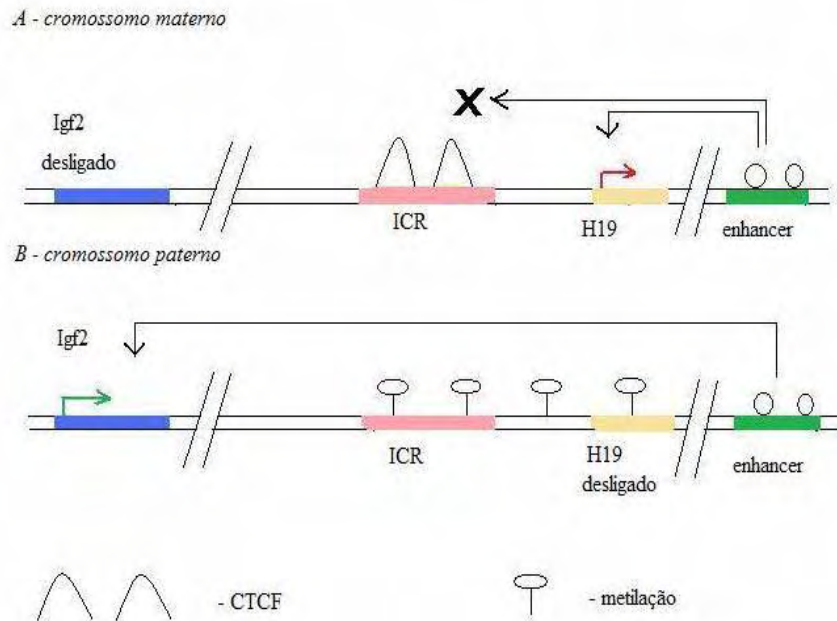


Figura 02 – O estado de metilação do isolador (ICR) determina se a proteína ligante CTCF pode ligar ou bloquear a ativação do gene H19 do enhancer regulado downstream (adaptado de *Molecular Biology of the Gene* 6th ed, Watson et al., 2008, p.625).

3.2. Kcnq1 e Kcnq1ot1

O ICR de Kcnq1 é metilado no cromossomo materno, mas não metilado no cromossomo paterno, e serve como promotor para o transcrito antisense Kcnq1ot1 (PAULER et al., 2007; WHITEHEAD et al., 2008). Cromossomos maternos portadores do cromossomo truncado mantêm o DNA metilado e não apresentam alteração na expressão. No entanto, cromossomos paternos expressam o ncRNA repletos de reexpressão de genes flanqueados em ambos tecidos embrionário e extra embrionário (PAULER et al., 2007) (Figura 03). Experimentos com RACE (amplificações rápidas de terminações de cDNA) e RT-PCR forneceram quatro sítios de início de 20 pb e um sítio de poliadenilação a 121 kb, localizado downstream do sítio principal, mostrando que kcnq1ot1 possui ambas extremidades: 5' metil capeada e a cauda poliadenilada. Todas as ESTs foram contíguas com a sequência genômica, provando não haver evidência de splicing (REDRUP et al., 2009). Kcnq1ot1 é transcrito pela RNA

polimerase II, localizado no núcleo e é moderavelmente estável, semelhantemente a outros ncRNAs longos com atribuições epigenéticas (UMLAUF et al., 2008 apud REDRUP et al., 2009).

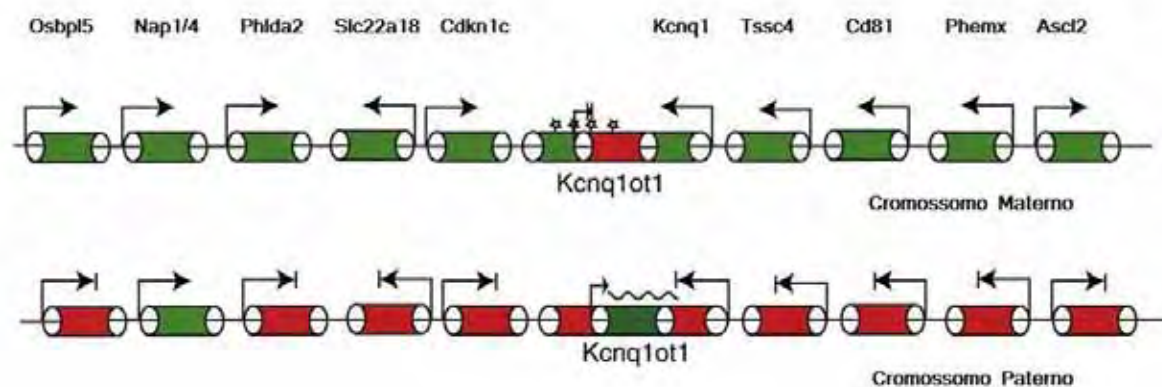


Figura 03 – O domínio megabase Kcnq1, regulado pelo transcrito antisense Kcnq1ot1, contém 10 genes em imprinting. Genes expressos estão representados em verde, e genes silenciados em vermelho. Extraído de J. Whitehead, et al., *Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs*, *Biochim. Biophys. Acta* (2008).

3.3. Igf2r e Airn

O padrão de expressão paterno-específico do ncRNA Airn silencia três genes em cis distribuídos a cerca de uma região de 300 Kb. O promotor do Airn encontra-se em uma orientação antisense no íntron 2 do Igf2r e origina um ncRNA de 108 Kb, não submetido a splicing, que se sobrepõe ao promotor Igf2r. De qualquer forma, dois outros genes (Slc22a2 e Slc22a3, de 80 e 150 Kb, respectivamente) silenciados *upstream* não são sobrepostos, muito menos apresentam sequer homologia com Airn (STRICKER et al., 2008). A produção de Airn no cromossomo paterno está associada ao silenciamento em tecidos extra embrionários de três outros genes situados em ambos os lados do ICR DMR2 (região de controle de imprinting diferencialmente metilada). Em tecidos embrionários somente o gene Igf2r sobreposto é silenciado, demonstrando que os mecanismos de imprinting tecido específico

atuam nesse grupo gênico (WHITEHEAD et al., 2008) (Figura 04). A expressão de Igf2r e Airn quantificadas em QPCR mostra que o aumento da expressão desses ncRNAs acompanha a diferenciação de células tronco embrionárias em camundongo com uma cinética paralela: um agudo aumento é observado a primeira vista entre dos dias 2 e 3 para ambos os genes. Em relação ao dia zero, estado indiferenciado, Igf2r aumenta na taxa de ~ 5-dobras (de ~ 20 a 100) e Airn de ~100 (para mais de 100). Já as expressões de Slc22a2 e Slc22a3 não foram detectáveis por QPCR até os dias 2 – 3 de diferenciação e seu aumento foi similar ao observado em Igf2r e Airn. Embora a expressão de ambos Slc22a2 e Slc22a3 seja restrita ao trofoblasto placentário, e presumidamente ausente em células tronco embrionárias, o ciclo inicial de QPCR indicou que Slc22a2 é expresso de níveis baixos a medianos, ao passo que Slc22a3 é expresso em níveis claramente detectáveis nessas células (LATOS et al., 2009).

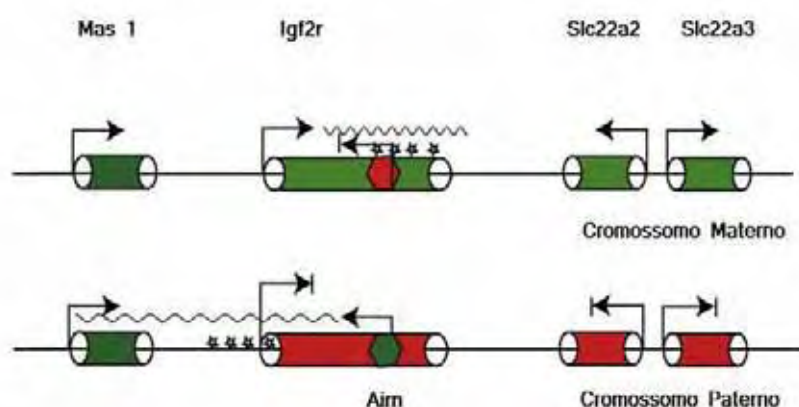


Figura 04 – A família gênica Igf2r, regulada pelo transcrito antisense Airn, contém 5 genes, 4 dos quais estão em imprinting. Extraído de J. Whitehead, et al., *Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs*, *Biochim. Biophys. Acta* (2008).

4. EXEMPLOS DE FATORES REGULADOS EM TRANS

4.1. HOTAIR – o antisense Hox

A expressão de fatores de transcrição dos genes homeobox (*Hox*), que especificam a identidade posicional das células em um embrião em desenvolvimento e mantêm o padrão de simetria bilateral nos animais, é regulado de um modo espacial e temporal por complexas interações entre dois grupos opostos de enzimas modificadoras de histonas, o grupo de proteínas *policombo* (PcG) e o grupo *tritórax* (TrxG) (WHITEHEAD et al., 2008). Em *Drosophila melanogaster* ambas as proteínas PcG e TrxG regulam a expressão dos genes Hox via interação com os elementos responsivos policombo/tritórax (PRE/TRE), e há evidências no envolvimento de ncRNAs promovendo a ligação em proteínas TrxG em mamíferos (RINGROSE e PARO, 2007; SANCHEZ-ELSNER et al., 2006 apud WHITEHEAD et al., 2008), no entanto, esses mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos (WHITEHEAD et al., 2008). PcG mantém o padrão espacial dos genes Hox através da deposição de sinais de silenciamento epigenético, i.e. metilação de histonas. Além disso, PcG reprime genes Hox em regiões onde normalmente não são expressos (KIEFER, 2007). PcG se liga na região regulatória PRE dos genes alvo, incluindo genes de vários fatores de transcrição do desenvolvimento (*Fox*, *Sox*, *Pax*), e moléculas sinalizadoras (*Wnts*, *Shh*, BMPs) (BRACKEN et al., 2006; NEGRE et al., 2006 apud KIEFER, 2007). PcG é composto por dois complexos, complexos repressivos policombo (PRC) 1 e 2. O PRC2 de mamíferos contém quatro núcleos protéicos: EED; SUZ12 e RbAP48; EZH2; e PRC1, composto por mais de 10 subunidades, incluindo a proteína do cromodomínio policombo (PC), a oncoproteína BMI1, e E-3 ubiquitina ligases RING1 A e B (KIEFER, 2007). Como mecanismo de ação oposto ao PcG, o grupo tritórax (TrxG) mantém a expressão gênica, incluindo genes Hox, facilitando o acesso à eucromatina (BEISEL et al., 2002 apud KIEFER, 2007). O TrxG de mamíferos é composto por múltiplas proteínas, incluindo as proteínas homólogas de *Drosophila*, conhecidas como Set1a, Set1b, Mll1, Mll2, Mll3 e Mll4, e a ATPase SWI/SNF Brg1 (KIEFER, 2007). TrxG se liga ao mesmos elementos cromossômicos que PcG, sendo que a ativação de PRE/TRE requer a transcrição de TRE.

Nos mamíferos, os genes Hox estão agrupados em uma família entre quatro loci cromossômicos, do HoxA ao HoxD. Trabalhos com o transcrito antisenso Hox (HOTAIR), que tem um transcrito antisenso de 2,2 Kb e é encontrado no limite do domínio do complexo HoxC, mostraram sua atividade em fibroblastos da hipoderme (LEMPRDL e RINGROSE, 2008). Sua expressão está correlacionada não com os genes 3' de HoxC, mas com seus genes 5'. Notavelmente, esse transcrito não age em cis, mas em trans em relação ao complexo HoxD. O silenciamento de HOTAIR expresso do locus HoxC não surte efeito sobre o próprio HoxC, mas leva a uma desrepressão em trans em um grande domínio do locus de HoxD. Essa desrepressão foi acompanhada pela perda do sítio ativo da proteína PcG e perda expressiva de metilação na lisina 27 da histona H3 (LEMPRDL e RINGROSE, 2008). Uma questão interessante é que, em contraste com muitos ncRNAs, i.e. H19, HOTAIR parece ser conservado em muitos grupos de vertebrados. Assim, não só os temas de regulação, mas também talvez as sequências regulatórias por si só possam indicar um nível elevado de conservação, indicando que alguns ncRNAs regem funções básicas na Biologia (BROSNAN e VOINNET, 2009).

4.2. Genes *Dlx* e os transcritos *Evf-1* e *Evf-2*

Genes *Dlx* codificam proteínas homodomínio requeridas na diferenciação e migração interneuronal durante o desenvolvimento do cérebro nos vertebrados, e são críticos à padronização e migração de neurônios da região ventral do prosencéfalo no desenvolvimento embrionário (KOHTZ e FISHELL, 2004). A proteína *Dlx-2* interage com duas sequências intergênicas ultraconservadas dos enhancers *ei* e *eii*, e transcrionalmente ativa os genes flanqueados *Dlx-5/6*. Essas regiões enhancer codificam dois ncRNAs, *Evf-1* e *Evf-2* (WHITEHEAD et al., 2008; JEONG et al., 2008).

Evf-1 é codificado por dois éxons separados por um intron de 37,5Kb. O éxon 1 de *Evf-1* está localizado a 4Kb regulado *upstream* do gene *Dlx-6* e a 8Kb distante do enhancer *eii* (Figura 06). Essa é uma região de sintenia entre o cromossomo 6 do camundongo e o cromossomo 7 humano, suportando a idéia de que importantes genes funcionais são codificados nessa região (KOHTZ e FISHELL, 2004). Em embriões de ratos com 12 dias, o perfil diferencial do mRNA do telencéfalo dorsal e ventral foram analisados, e oito diferentes genes foram encontrados como diferencialmente expressos por análises de RT-PCR e de

Northern Blott. Hibridação in situ revelou que o gene *Evf-1* exibe um padrão de expressão muito similar ao dos genes *Dlx*. A expressão de *Evf-1* é vista predominantemente nos arcos branquiais, prosencéfalo ventral, bulbo olfatório e botões dos membros superiores (Figura 05). Tal padrão de expressão é semelhante aos padrões previamente reportados por *Dlx-5* e 6 (KOHTZ e FISHELL, 2004).

Evf-2, uma forma do *Evf-1* submentida a splicing alternativo, é transcrito de *ei* e porta uma região altamente conservada em sua extremidade 5'. A interação entre *Evf-2* e a proteína *Dlx-2* é crucial para a ativação transcricional de *Dlx-5/6*, que é mediada através da sequência conservada 5' (WHITEHEAD et al., 2008). Bond et al. relatam pela primeira vez que *Evf-2* é importante para a regulação gênica e desenvolvimento dos produtores de GABA, principal neurotransmissor inibitório do cérebro. O balanço entre excitação e inibição no cérebro é crucial para o seu devido funcionamento e é mantido por duas principais classes de neurônios: os neurônios excitatórios de projeção e os circuitos locais inibitórios. Embora a excitação seja primeiramente mediada pelo neurotransmissor glutamato, GABA medeia a inibição primária (BOND et al., 2009). Disfunções nos circuitos GABA-regulados podem implicar em diferentes desordens psiquiátricas, como esquizofrenia, autismo e síndrome de Tourette, bem como epilepsia. Assim, *Evf-2* controla o desenvolvimento interneuronal GABAérgico e o circuito cerebral adulto, tornando seu mecanismo um alvo para ambos os estudos do desenvolvimento e de doenças do sistema nervoso (BOND et al., 2009).

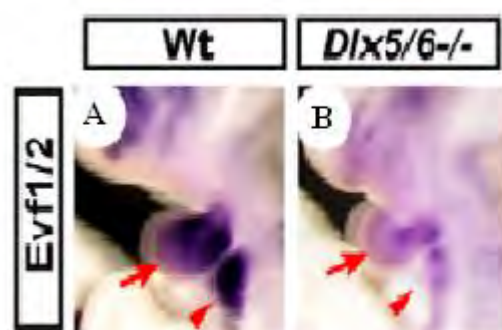


Figura 05 – Padrões de expressão dos arcos branquiais em genes downregulados *Dlx5/6^{-/-}*. Em A as seta e cabeça de seta indicam a expressão de fatores de transcrição para *Evf1/2*, e em B as mesmas setas indicam acentuada redução da expressão dos mesmos em decorrência da mutação deletéria do gene *Dlx 5/6*. Extraído e adaptado de Jeong et al., *Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs* (2008).

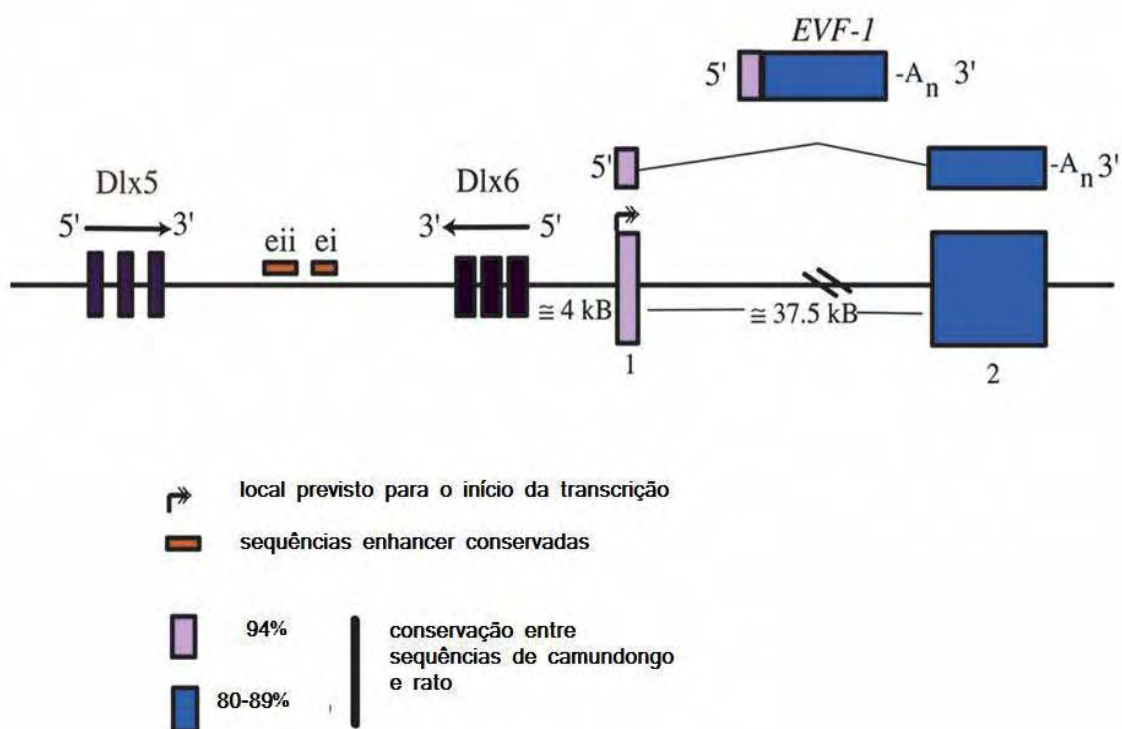


Figura 06 – Organização genômica de *Evf-1* de camundongo, baseada na sequência genômica disponível em Genbank database. Extraído de J.D.Kohtz; G.Fishell, *Developmental regulation of Evf-1, a novel non-coding RNA transcribed upstream of the mouse Dlx6 gene* (2004).

5. OS GENES DA FAMÍLIA DAPPER

5.1. Breve histórico

Aos genes que compõem a família *Dapper* (Dpr) foram atribuídos diversos papéis. A multiplicidade de funções é possível devido à habilidade de a proteína Dpr interagir com diversos parceiros moleculares (SOBREIRA, 2009). Assim sendo, dependendo do contexto no qual estejam inseridas, essas proteínas podem desempenhar diferentes papéis ao longo da embriogênese dos vertebrados (MOUSTAKAS e HELDING, 2009; WAXMAN et al., 2004), dentre eles o de inibição da indução mesodérmica, o de atuação na morfogênese cefálica e do olho, na coordenação de movimentos morfogenéticos e na cardiogênese (CHEYETE et al., 2002; GLOY et al., 2002; ZANG et al., 2006 apud SOBREIRA, 2009; WAXMAN et al., 2004).

O gene Dpr1 foi descoberto em 2002 por Cheyete et al., num estudo de sinalização molecular via Wnt. Em paralelo, Gloy et al. (2002) descreviam a proteína Frodo, altamente relacionada com Dpr1. Observou-se então que ambas as proteínas eram capazes de interagir com as proteínas *Dishevelled* (Dsh), molécula chave na via de sinalização Wnt (CHEYETE et al., 2002 apud SOBREIRA, 2009). Após a identificação inicial no anfíbio *Xenopus laevis*, ficou claro que genes da família Dapper estavam presentes no genoma de todos os outros vertebrados, não obstante não tenham sido identificados no genoma de organismos invertebrados. No genoma de *Xenopus laevis*, tetraplóide, existem os genes Dpr1 e Frodo (HIKASA e SOKOL, 2004), gerados por duplicação gênica. Na galinha (*Gallus gallus*) foram identificados dois ortólogos, Dpr1 e Dpr2. No camundongo e no homem existem três membros dessa família gênica, Dpr1, Dpr2 e Dpr3 (FISCHER et al., 2006 apud SOBREIRA, 2009).

A grande versatilidade na formação das proteínas Dpr é atribuída ao splicing alternativo pelo qual o gene Dpr é submetido, além da utilização de promotores alternativos e da produção de transcritos antisenso. Estudando tais possibilidades, Sobreira (2009) levantou 121 sequências de cDNAs e ESTs de camundongos (*Mus musculus*) obtidas nos bancos de dados UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) e Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir dessas análises, verificou que cerca de 10% das sequências apresentavam um segmento adicional de 111pb na porção 5'do éxon 4 em relação à sequência de referência, sugerindo que dois transcritos de tamanhos diferentes seriam gerados pelo transcriptoma do

camundongo a partir do locus Dpr1 (Figura 07). Esse dado reforçou ainda a possibilidade da tradução de uma proteína através da sequência variante, a qual em condições funcionais desempenharia algum papel durante o desenvolvimento embrionário (SOBREIRA, 2009).

5.2. Estrutura do Dpr1

A sequência do Dpr1 foi elucidada e descrita como DACT1 no banco de referências (CHEYETE et al. apud SOBREIRA, 2009). É um gene composto por quatro éxons e três regiões intrônicas (Figura 07), além de apresentar sítios de splicing alternativo distribuídos nos quatro éxons. Entre os vertebrados, o gene Dpr 1 apresenta uma estrutura evolutivamente conservada, basicamente, o tamanho deste locus varia pela diferença no tamanho dos segmentos intrônicos entre as diferentes espécies de vertebrados estudadas. Em contrapartida, o tamanho dos éxons varia muito pouco, mesmo entre espécies distantes (SOBREIRA, 2009).

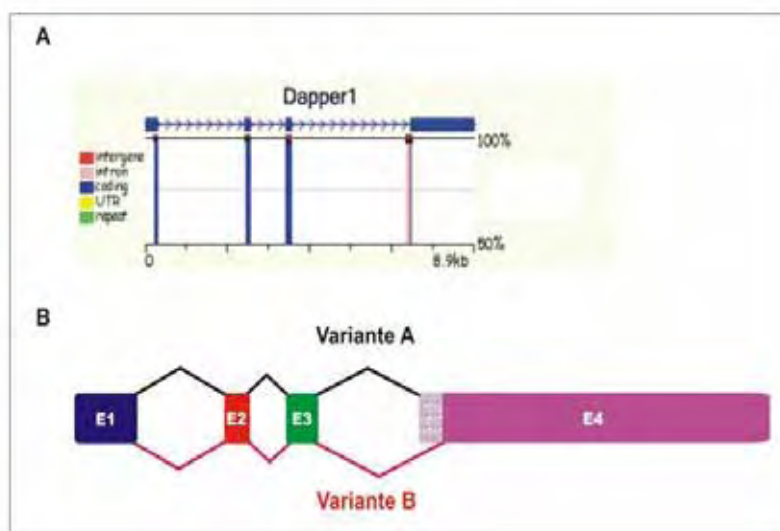


Figura 07 – Identificação dos transcritos variantes A e B para o gene Dpr1. A – os éxons de Dpr1 estão representados por quatro caixas azuis, enquanto que os segmentos intrônicos são representados por flechas azuis. A barra vertical rosa representa o segmento de 111pb encontrado em 10% das sequências Dpr analisadas. B – diagrama representando as duas variantes geradas por splicing alternativo a partir do gene Dpr1 de camundongo, composto por quatro éxons, representados pelas caixas coloridas. Extraído de *D.R.Sobreira, Identificação de uma nova variante do gene Dapper1 gerada por splicing alternativo durante o desenvolvimento de vertebrados e sua análise numa abordagem evolutiva* (2009).

5.3. Transcritos variantes gerados a partir do gene Dpr1

Trabalhando com 121 sequências de cDNAs e ESTs de camundongo, obtidas nos bancos de dados UCSC e Unigene, Sobreira procurou justificar e caracterizar a existência de transcritos ainda não descritos na literatura. O resultado das análises mostrou que aproximadamente 10 % das seqüências apresentavam um segmento adicional de 111 pb na porção 5' do éxon 4 em relação à sequência referência para o cDNA Dpr1 de camundongo, sugerindo que dois transcritos de tamanho diferentes seriam gerados pelo transcriptoma do camundongo a partir do locus Dpr1. A utilização da ferramenta Open Reading Frame Finder (ORF finder) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a sequência da proteína codificada pela Variante A foi predita. Esta análise revelou que a Variante A produz uma proteína que contém 37 aminoácidos a mais em relação à Variante B, sem que haja ruptura do quadro de leitura subsequente. Esse dado reforçou a idéia de que a Variante A pudesse existir e que a proteína gerada por ela teria condições de ser funcional e desempenhar algum papel durante o desenvolvimento embrionário (SOBREIRA, 2009).

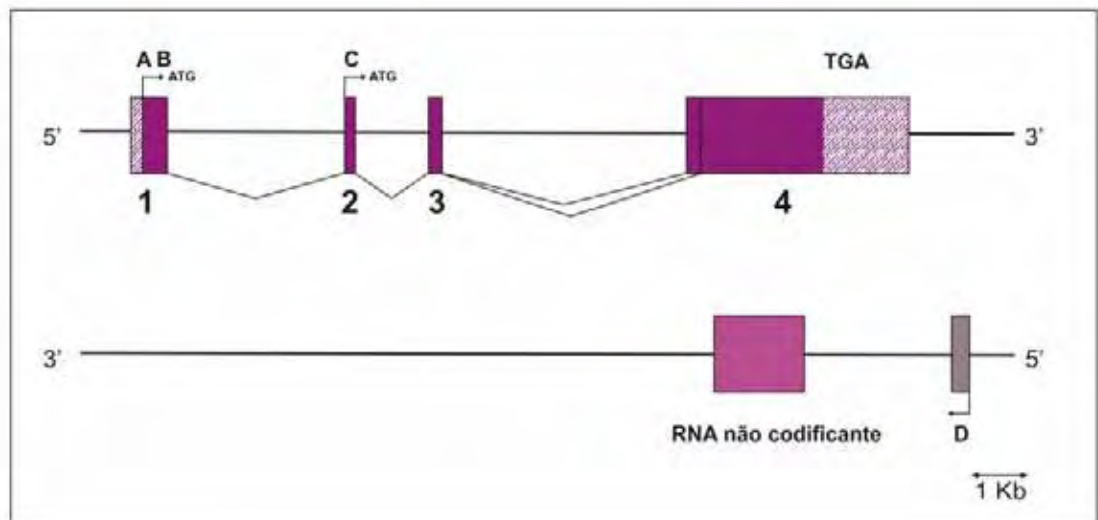


Figura 08 - Esquema representando as possíveis variantes para o gene Dpr1 encontradas nas análises de bioinformática. Os quadrados púrpura representam os quatro éxons (1, 2, 3 e 4) do gene Dpr1. Na orientação 3'-5' está representado o transcrito antisenso (Variante D) produzido por um promotor alternativo presente nesta fita do DNA. Extraído de *D.R.Sobreira, Identificação de uma nova variante do gene Dapper1 gerada por splicing alternativo durante o desenvolvimento de vertebrados e sua análise numa abordagem evolutiva* (2009).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os RNAs não codificantes possuem funções diversas, atuando principalmente como reguladores da expressão gênica em momentos ontogenéticos diversos, e são responsáveis pela repressão de alguns caracteres, através do imprinting e da inativação cromossômica em mamíferos. Em alguns casos essas interações requerem intermediações de moléculas auxiliares, onde entram muitas vezes os ncRNAs de cadeia curta. Quanto aos ncRNAs de cadeia longa, sua interação costuma ser mais direta e representa o produto final de expressão. Em ambos os casos, proteínas podem interagir durante o processo.

Transcritos alternativos da família Dapper parecem permear importantes reações ontogenéticas, daí o seu padrão de conservação entre os diversos grupos de vertebrados, que por sua vez apresentam alta semelhança nos padrões de desenvolvimento embrionário. Para maiores esclarecimentos, sugere-se a realização de testes Northern Blott e hibridação in situ com a sequência Dpr1 antisenso em embriões de organismos modelo diferentes do camundongo, como em embriões de galinha, por exemplo. Sem dúvida, os resultados obtidos elucidariam mais alguns passos desconhecidos da intrigante e fascinante Biologia do Desenvolvimento.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ªEd. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 1463 p.

AMARAL, P.P.; MATTICK, J.S. Noncoding RNA in Development. **Mamm Genome**, New York, n. 19, p. 454 – 492, 2008.

AMERONGEN, R.; NUSSE, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 3205 – 3214, 2009.

BOURC' HIS, D.; PROUDHON, C. Sexual dimorphism in parental imprint ontogeny and contribution to embryonic development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Paris, n. 282, p. 87 – 94, 2008.

BROSNAN, C.A.; VOINNET, O. The long and the short of noncoding RNAs. **Current Opinion in Cell Biology**, Strasbourg, n. 21, p. 416 – 425, 2009.

CARNINCI, P. Non-coding RNA transcription: turning on neighbours. **Nature Cell Biology**, Londres, n. 10, p. 1023 – 1024, 2008.

CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y. Noncoding RNA transcription beyond annotated genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, Oxford, n. 17, p. 139 – 144, 2007.

COSTA, F.F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, Chicago, n. 410, p. 9 – 17, 2008.

COSTA, F.F. Non-coding RNAs: Lost in translation? **Gene**, Chicago, n. 386, p. 1 – 10, 2007.

COSTA, F.F. Non-coding RNAs: New players in eukaryotic biology. **Gene**, Chicago, n. 357, p. 83 – 94, 2005.

EDDY, S.R. Noncoding RNA genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, Oxford, n. 9, p. 695 – 699, 1999.

FENG, J.; BI, C.; CLARK, B.S.; MADY, R.; SHAH, P.; KOHTZ, J.D. The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2. **Genes & Development**, Illinois, n. 20, p. 1470 – 1484, 2006.

GLASS, C.K.; ROSENFELD, M.G. Transcriptional regulatory machinery and epigenetics at a crossroads. **Current Opinion in Cell Biology**, Oxford, n. 20, p. 249 – 252, 2008.

GUFFANTI, A.; JACONO, M.; PELUCCHI, P.; KIM, N.; SOLDÀ, G.; CROFT, L.J.; TAFT, R.J.; RIZZI, E.; ASKARIAN-AMIRI, M.; BONNAL, R.J.; CALLARI, M.; MIGNONE, F.; PESOLE, G.; BERTALOT, G.; BERNARDI, L.R.; ALBERTINI, A.; LEE, C.; MATTICK,

J.S.; ZUCCHI, I.; DE BELLIS, G. A transcriptional sketch of a primary human breast cancer by 454 deep sequencing. **BMC Genomics**, Londres, v. 10, n. 103, p. 1 – 17, 2009.

HIKASA, H.; SOKOL, S.Y. The involvement of Frodo in TCF-dependent signaling and neural tissue development. **Development**, Cambridge, v. 131, p. 4725 – 4734, 2004.

HARTZOG, G.A.; MARTENS, J.A. NcRNA transcription makes its mark. **The EMBO Journal**, Heidelberg, n. 28, p. 1679 – 1680, 2009.

HÜTTENHOFER, A.; SCHATTNER, P.; POLACEK, N. Non-coding RNAs: hope or hype? **Trends in Genetics**, Londres, n. 21, p. 289 – 297, 2005.

JEONG, J.; LI, X.; MCEVILLY, R.J.; ROSENFELD, M.G.; LUFKIN, T.; RUBENSTEIN, J.L. Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs. **Development**, Cambridge, v.135, P. 2905 – 2916, 2008.

KIEFER, J.C. Epigenetics in Development. **Developmental Dynamics**, Salt Lake City, n. 236, p. 1144 – 1156, 2007.

KOERNER, M.V.; PAULER, F.M.; RUANG, R.; BARLOW, D.P. The function of non-codings RNAs in genomic imprinting. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 1771 – 1783, 2009.

KOHTZ, J.D.; FISHELL, G. Developmental regulation of EVF-1, a novel non-coding RNA transcribed upstream of the mouse Dlx6 gene. **Gene Expression Patterns**, Chicago, n. 4, p. 407 – 412, 2004.

LATOS, P.A.; STRICKER, S.H.; STEENPASS, L.; PAULER, F.M.; HUANG, R.; SENERGIN, B.H.; REGHA, K.; KOERNER, M.V.; WARCZOCK, K.E.; UNGER, C.; BARLOW, D.P. An in vitro ES cell imprinting model shows that imprinted expression of the *Igf2r* gene arises from an allele-specific expression bias. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 437 – 448, 2009.

LEMPRADL, A.; RINGROSE, L. How does noncoding transcription regulate Hox genes? **BioEssays**, Cambridge, n. 30, p. 110 – 121, 2008. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

LIN, R.; MAEDA, S.; LIU, C.; KARIN, M.; EDGINGTON, T.S. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. **Oncogene**, La Jolla, n. 26, p. 851 – 858, 2007.

LINDGREEN, S.; GARDNER, P.P.; KROGH, A. MASTR: multiple alignment and structure prediction of non-coding RNAs using simulated annealing. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n.24, p. 3304 – 3311, 2007.

LUDWIG, M.Z. Functional evolution of noncoding DNA. **Current Opinion in Genetics & Development**, Oxford, n. 12, p. 634 – 639, 2002.

MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **BioEssays**, Cambridge, n. 25, p. 930 – 939, 2003. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

MATTICK, J.S. RNA regulation: a new genetics? **Nature Reviews Genetics**, Londres, n. 5, p. 316 – 323, 2004.

MATTICK, J.S. The Functional Genomics of Noncoding RNA. **Science**, Washington, n. 309, p. 1527 – 1528, 2005. Disponível em : <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

MATTICK, J.S.; MAKUNIN, I.V. Non-coding RNA. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v.15, p. R17 – R19, 2006.

MOUSTAKAS, A.; HELDING, C.H. The regulation of TGF β signal transduction. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 3699 – 3714, 2009.

PANG, K.C.; FRITH, M.C.; MATTICK, J.S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. **Trends in Genetics**, Londres, n. 22, p. 1 – 5, 2006.

PAULER, F.M.; KOERNER, M.V.; BARLOW, D.P. Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? **Trends in Genetics**, Londres, v. 23, n. 6, p. 284 – 292, 2007.

PEREZ, D.S.; HOAGE, T.R.; PRITCHETT, J.R.; DUCHARME-SMITH, A.L.; HARLLING, M.L.; GANAPATHIRAJU, S.C.; STRENG, P.S.; SMITH, D.I. Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer. **Human Molecular Genetics**, Oxford, n. 17, p. 642 – 655, 2008.

PONTING, C.P.; OLIVER, P.L.; REIK, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. **Cell**, Oxford, n. 136, p. 629 – 641, 2009.

REDRUP, L.; BRANCO, M.R.; PERDEAUX, E.R.; KRUEGER, C.; LEWIS, A.; SANTOS, F.; NAGANO, T.; COBB, B.S.; FRASER, P.; REIK, W. The long noncoding RNA Kcnq1ot1 organises a lineage-specific nuclear domain for epigenetic gene silencing. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 525 – 530, 2009.

ROSSI, S.; SEVIGNANI, C.; NNADI, S.C.; SIRACUSA, L.D.; CALIN, G.A. Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatics and therapeutic implications. **Mamm Genome**, New York, v. 19, p. 526 – 540, 2008.

SIRACUSA, L.D.; BUCHBERG, A.M. The Noncoding RNAs: a genomic symphony of transcripts. **Mamm Genome**, New York, v. 19, p. 449 – 453, 2008.

SOBREIRA, D.R. **Identificação de uma nova variante do gene *Dapper1* gerada por *splicing* alternativo durante o desenvolvimento de vertebrados e sua análise numa abordagem evolutiva**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

STORZ, G. An Expanding Universe of Noncoding RNAs. **Science**, Washington, n. 296, p. 1260 – 1263, 2002. Disponível em : <<http://www.sciencemag.org>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

STRICKER, S.H.; STEENPASS, L.; PAULER, F.M.; SANTORO, F.; LATOS, P.A.; HUANG, R.; KOERNER, M.V.; SLOANE, M.A.; WARCZOK, K.E.; BARLOW, D.P. Silencing and transcriptional properties of the imprinted Airn ncRNA are independent of the endogenous promoter. **The EMBO Journal**, Heidelberg, n. 27, p. 3116 – 3128, 2008.

SUZUKI, M.; HAYASHIZAKI, Y. Mouse-centric comparative transcriptomics of protein coding and non-coding RNAs. **Bioessays**, Cambridge, n. 26, p. 833 – 843, 2004. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

TABEI, Y.; ASAI, K. A local multiple alignment method for detection of non-coding RNA sequences. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 12, p. 1498 – 1505, 2009.

TAFT, R.J.; PHEASANT, M.; MATTICK, J.S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaritic complexity. **BioEssays**, Cambridge, n. 29, p. 288 – 299, 2007. Disponível em: <<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em: 24 abr. 2009.

TRAINOR, P.A. Developmental Biology Is “Cruzing”. **Developmental Cell**, Kansas City, n. 7, p. 481 – 486, 2004.

WAGNER, E.G.H.; FLÄRDH, K. Antisense RNAs everywhere? **Trends in Genetics**, Londres, n. 18, p. 223 – 226, 2002.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Molecular Biology of the Gene**. 6th ed. São Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2008. 841 p.

WAXMAN, J.S.; HOCKING, A.M.; STOICK, C.L.; MOON, R.T. Zebrafish Dapper1 and Dapper2 play distinct roles in Wnt-mediated developmental processes. **Development**, Cambridge, v.131, p. 5909 – 5921, 2004.

WHITEHEAD, J.; PANDEY, G.K.; KANDURI, C. Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, p.1 – 12, 2008.

ZHANG, Y.; ANDL, T.; YANG, S.H.; TETA, M.; LIU, F.; SEYKORA, J.T.; TOBIAS, J.W.; PICCOLO, S.; SCHMIDT-ULLRICH, R.; NAGY, A.; TAKETO, M.M.; DLUGOSZ, A.A.; MILLAR, S.E. Activation of β -catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate. **Development**, Cambridge, v. 135, p. 2161 – 2172, 2008.