

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/02/2019.



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).

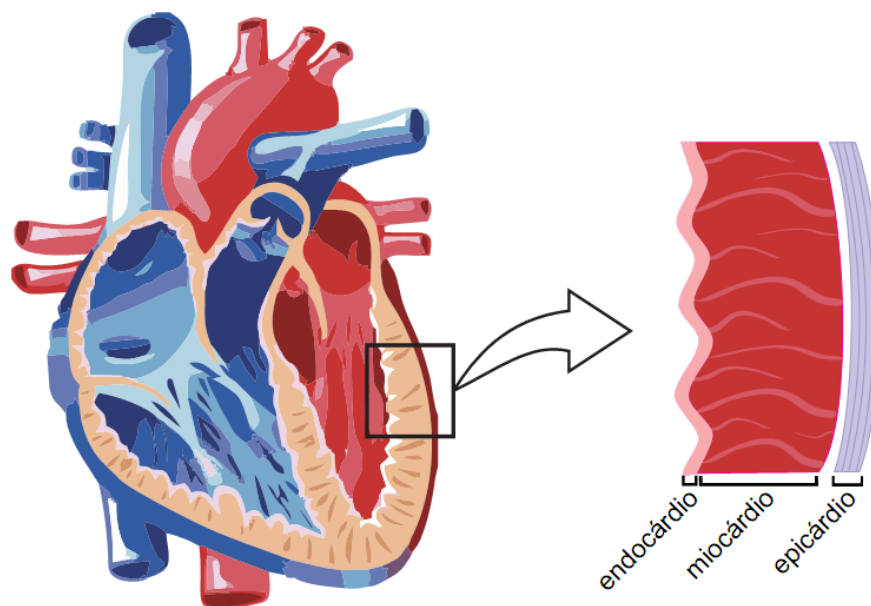


Figura 1. Coração e as três camadas cardíacas.

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).

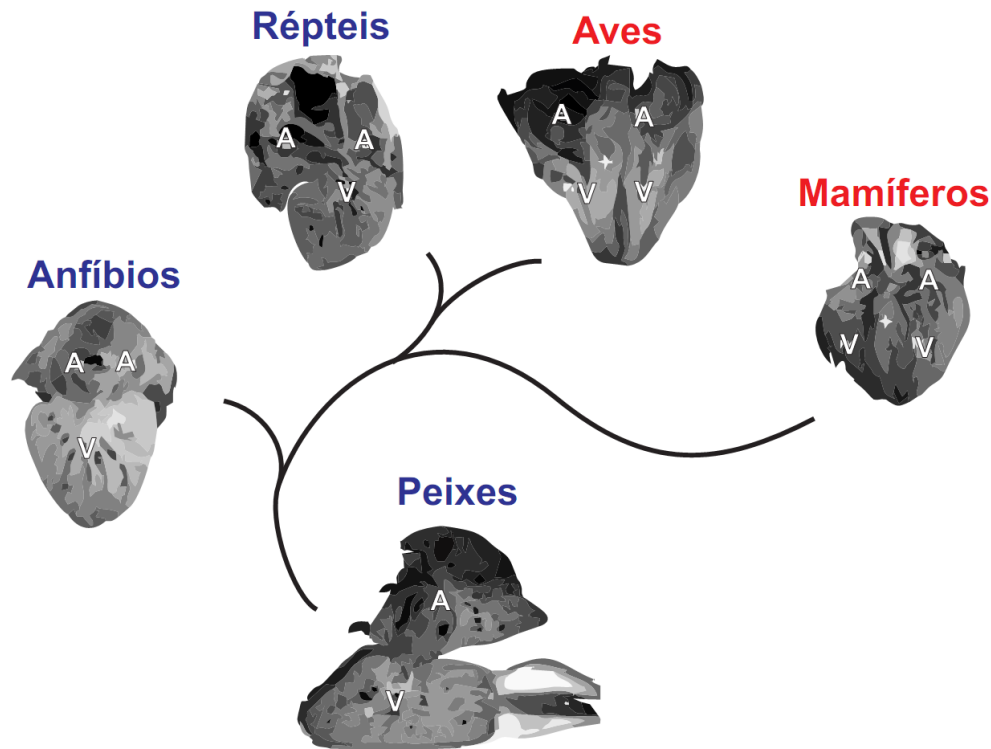


Figura 2. Morfologia cardíaca típica dos vertebrados. Grupos grafados em cor azul são ectotérmicos. Grupos grafados em cor vermelha são endotérmicos. A – átrio; V – ventrículo.

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.

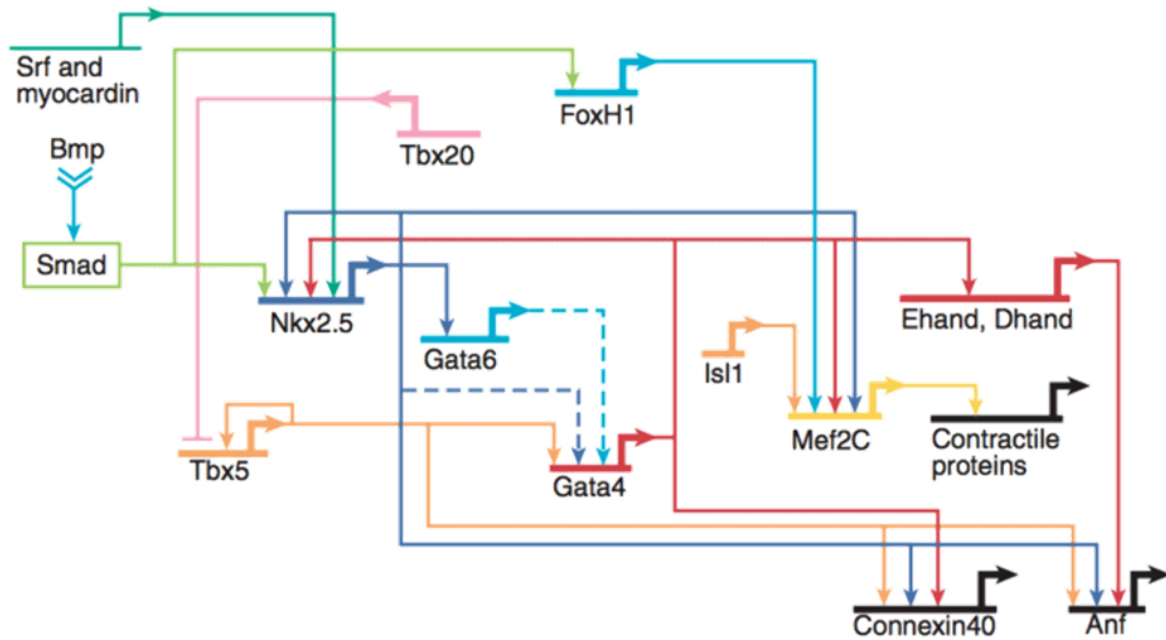


Figura 3. Rede regulatória conservada do desenvolvimento cardíaco. No exemplo estão os reguladores-chave (ex.: Nkx), os reguladores auxiliares (ex.: Smad) e as proteínas funcionais do tecido cardíaco (em preto). Imagem modificada de Erwin e Davidson (2009).

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.

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.

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, Siederdissen 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.