

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

DEBORA KAZUMI MAEDA

**MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA
O PAPEL E AS INTERAÇÕES ENTRE RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES
E MODIFICADORES DE HISTONAS NO CÂNCER**

BOTUCATU-SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA
O PAPEL E AS INTERAÇÕES ENTRE RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES
E MODIFICADORES DE HISTONAS NO CÂNCER**

DEBORA KAZUMI MAEDA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências de Botucatu,
UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biomédicas

BOTUCATU

2023

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

Maeda, Debora Kazumi.

Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão
gênica : o papel das interações entre lncRNAs e
modificadores de histonas no câncer / Debora Kazumi
Maeda. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

Capes: 20205007

1. Expressão gênica. 2. Epigenética. 3. Cromatina.
4. Metilação de DNA. 5. RNA Longo não codificante.

Palavras-chave: Complexos regulatórios; Cromatina;
Expressão gênica; Modificadores de histonas; lncRNA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente aos meus pais e minha irmã, pelo amor e apoio incondicional em todos os meus maiores sonhos.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dra. Cláudia Aparecida Rainho, pela orientação, oportunidade de crescimento profissional e pessoal, pelos conselhos e pelo suporte em todos os momentos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Fernanda, Naiade e Diogo, e em especial à Mai, que me acompanhou nesta jornada desde o início da faculdade e tive a oportunidade de dividir essa experiência acadêmica.

Agradeço ao Laboratório de Hematologia do HCFMB, por terem me acolhido e ensinado tanto. Foram 5 meses de muito aprendizado e desenvolvimento. Obrigada, Cristina, Juliana, Lázara, Phillipe, Fernanda, Evelyn, Júlia, Maria Helena, Fábio, Daise, Lia, Iracema e Valdir.

Agradeço aos meus amigos que tornaram a vivência universitária leve e ainda mais especial, com os quais obtive aprendizados que nenhuma graduação poderia me ensinar. Deixo meus agradecimentos especiais ao Guilherme, à Nicole e Bruna.

Agradeço à minha amiga e colega de apartamento, Poliana, por ter sido minha melhor companhia nestes 4 anos. Por todos os conselhos, experiências, ensinamentos, pelo companheirismo e pela amizade.

Agradeço aos projetos os quais fiz parte, CVU e IBB Jr., onde conheci integrantes excepcionais e pude crescer muito profissionalmente.

Por fim, agradeço à CNPq pela bolsa PIBIC concedida.

RESUMO

O câncer é uma doença complexa decorrente do acúmulo de diversas alterações moleculares, dentre elas, alterações epigenéticas que estão relacionadas com os perfis anormais de expressão gênica nas células anormais. A regulação epigenética da expressão gênica envolve diversos mecanismos que modulam a dinâmica da cromatina, incluindo a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas (que compreende mudanças bioquímicas como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, entre outros) e os RNAs não codificantes (ncRNAs), que podem ser classificados em RNAs curtos e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) dependendo do seu comprimento. Os lncRNAs caracterizam-se como transcritos com mais de 200 nucleotídeos que não codificam proteínas, porém atuam em diversos processos biológicos. Apesar de sua função biológica e suas interações ainda não serem bem elucidadas, diversos estudos evidenciaram sua importância na carcinogênese, podendo exercer papel como supressor tumoral ou como oncogene. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi descrever exemplos representativos de lncRNAs associados ao câncer e suas possíveis interações com outros componentes da maquinaria epigenética, de modo a evidenciar o seu papel funcional e relevância clínica como potenciais alvos para o desenvolvimento de estratégias inovadoras para a terapia epigenética. Para tanto, foi realizada a revisão da literatura pertinente e seleção de lncRNAs que apresentam interações com proteínas que removem ou adicionam modificações pós-traducionais em histonas, como as desacetilases de histonas (HDACs) e EZH2 (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*), a unidade catalítica do Complexo Repressivo *Polycomb 2* (PRC2), respectivamente. Desta forma, foram escolhidos três transcritos: H19, MEG3 e MROCKI. O lncRNA H19 é um RNA bem conhecido, expresso em altos níveis em diversos cânceres, agindo como um oncogene, estando altamente relacionado à transição epitélio-mesenquimal (EMT), proliferação, migração e invasão celular. O lncRNA MEG3 é um transcrito que se encontra silenciado principalmente devido a hipermetilação da sua região promotora; além das interações com modificadores de histonas, esse lncRNAs também interage com a proteína p53, supressora tumoral importante na regulação do ciclo celular, o que sugere que esse lncRNA exerce um papel como supressor tumoral. Por fim, o lncRNA MROCKI, que foi recentemente descrito, ainda tem suas interações moleculares pouco conhecidas. No entanto, sabe-se que esse transcrito é positivamente correlacionado com a HDAC2 e atua na regulação da proliferação celular e apoptose. No geral, esses lncRNAs emergem como biomarcadores, uma vez que muitos deles podem ser quantificados no plasma dos pacientes e são considerados alvos

terapêuticos. Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor elucidar as vias e processos controlados pelos complexos moleculares de que participam e seus mecanismos no câncer.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease characterized by the co-occurrence of multiple molecular alterations; among them, aberrant epigenetic marks that are associated with the differential expression of cancer-related genes. Epigenetic mechanisms change the chromatin dynamics and affect DNA-related processes such as transcription. These mechanisms include DNA methylation, histone post-translational modifications (acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation, and others), and non-coding RNAs (ncRNAs). LncRNAs are classified as short RNAs or long non-coding RNAs (lncRNAs). The second group of ncRNAs includes transcripts of at least 200nt that do not encode proteins, although show a plethora of functional properties. Overall, the biological functions and molecular interactions of lncRNAs are poorly understood. However, several studies have highlighted its importance in tumorigenesis, acting as a tumor suppressor or oncogene. In this context, this review describes representative examples of lncRNAs associated with cancer development and its possible interactions with other components of the epigenetic machinery, focusing on the functional impact in the hallmarks of cancer and their potential as targets new therapeutic strategies. Thus, three lncRNAs were selected based on its interactions with histone modifiers: proteins that act as writers (for example: EZH2 - Enhancer of Zest 2 polycomb repressive complex 2 subunit) or erasers (such as HDACs – Histone deacetylases) of post-translational modifications of histones. The gene H19 encodes a well-known long non-coding RNA, highly expressed in many cancers, acting as an oncogene, frequently related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT), cell proliferation, migration, and invasion. The promoter region of the gene encoding the lncRNA MEG3 is hypermethylated and downregulated in several cancers. This transcript is considered a tumor suppressor, especially due to its function of a positive regulator of p53, a tumor suppressor protein well-known to be important in cell cycle regulation and DNA damage repair. Few studies have investigated the molecular interactions of the recently identified lncRNA MROCK1. However, the expression of this transcript is positively correlated with the HDAC2 levels and has been implicated in the processes of cell proliferation and apoptosis. LncRNAs are emerging as tumor biomarkers since many of them were detected in liquid-biopsies from cancer patients and are also considered therapeutic targets. Nevertheless, new studies are needed to unravel the role of lncRNA in the chromatin-associated complexes and its impact cancer biology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Câncer e epigenética	9
1.2. Mecanismos Epigenéticos	10
1.2.1. Metilação do DNA	10
1.2.2. Modificações Pós-Traducionais (PTMs) das Histonas	11
1.2.3. RNAs não codificantes (ncRNAs)	14
2. OBJETIVOS	16
3. METODOLOGIA	16
4. H19- <i>Imprinted Maternally Expressed Transcript</i>	16
4.1. Informações Básicas	16
4.2. Regulação Epigenética	16
4.3. Papel no Câncer	17
4.4. Perspectivas	20
5. MEG3- <i>Maternally Expressed Gene 3</i>	21
5.1. Informações Básicas	21
5.2. Imprinting e Regulação Epigenética	21
5.3. Função como Supressor Tumoral	22
5.4. Perspectivas	23
6. MROCK1- MARCKS <i>cis-Regulating lncRNA Promoter of Cytokines and Inflammation</i>	24
6.1. Informações Básicas	24
6.2. Papel no Câncer	26
6.3. Perspectivas	27
7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer e epigenética

O câncer é uma doença heterogênea que apresenta diferentes alterações moleculares. Atualmente, existe um grande desafio acerca do tratamento dessa doença, principalmente devido a sua complexidade molecular e diferentes mecanismos regulatórios envolvidos na sua etiopatogenia; estes, afetam simultaneamente muitos processos biológicos e vias bioquímicas (DAWSON, 2017).

As alterações moleculares acumuladas nas células neoplásicas permitem a aquisição de novas habilidades, favorecendo a sua transformação ao fenótipo maligno, sendo essas características essenciais para a carcinogênese. A esse conjunto de habilidades, se deu o nome de “*hallmarks*” do câncer, como a evasão dos sinais supressores tumorais, resistência à morte celular programada ou apoptose, manutenção da sinalização da proliferação celular, imortalidade, angiogênese, capacidade de invasão e de dar origem à metástases, reprogramação do metabolismo celular, evasão do sistema imune, inflamação e instabilidade genômica e mutação (HANAHAN, 2022).

Acreditava-se que a iniciação tumoral se dava pela expansão clonal de células progenitoras que adquiriram mutações no DNA, atribuindo vantagem proliferativa. Porém, com o avanço da ciência, ficou evidente que muitas alterações presentes no câncer não afetam somente a sequência primária do DNA, mas também, outros componentes que fazem parte da maquinaria epigenética (DAWSON, 2017). O termo epigenética foi primeiramente sugerido em 1942, por Conrad Waddington, para descrever a área da biologia que estuda as interações entre os genes e seus produtos, de forma a produzirem o fenótipo de um indivíduo (ARMSTRONG, 2014). Atualmente, a epigenética possui uma definição mais abrangente, definida como o estudo de moléculas e mecanismos que regulam a atividade gênica, sem alterar a sequência do DNA (CAVALLI; HEARD, 2019).

Os mecanismos epigenéticos modulam, principalmente, os níveis de expressão gênica, auxiliando na determinação do fenótipo durante o desenvolvimento e diferenciação celular, que pode ser diferente, apesar de apresentarem o mesmo genótipo. As modificações bioquímicas da cromatina constituem a base dos mecanismos regulatórios que interligam a informação contida no genoma e os perfis de expressão gênica tecido-específicos. Logo, alterações nos mecanismos epigenéticos podem levar a níveis de expressão gênica aberrantes, que podem estar envolvidos no desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas o câncer (NEBBIOSO et al., 2018).

Alterações epigenéticas, da mesma forma que as mutações gênicas, podem levar à ativação oncogênica ou, mais frequentemente, à inativação de genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes são genes que, ao sofrerem alterações, apresentam níveis excessivos de expressão, tornando-se oncogenes ativados. Por outro lado, supressores tumorais são aqueles que, quando alterados, diminuem ou perdem sua atividade, sendo geralmente necessária a perda da função de ambos os alelos. Níveis de expressão gênica diferenciais em comparação com o tecido normal são características importantes para a carcinogênese e promovem um ambiente propício à origem e progressão do câncer (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

Nas últimas décadas, a epigenética tem ganhado notoriedade nos estudos acerca da biologia dos cânceres, ainda que o conhecimento sobre as alterações epigenéticas seja menor quando comparado ao conhecimento das alterações genéticas e genômicas. No entanto, os efeitos epigenéticos são fatores fundamentais para a aquisição dos *hallmarks*, de forma a contribuir para a iniciação e progressão tumoral (NEBBIOSO et al., 2018).

1.2. Mecanismos Epigenéticos

Os mecanismos epigenéticos são organizados em três grandes níveis de regulação que se sobrepõem à sequência do genoma: metilação do DNA, modificações nas histonas e RNAs não codificantes (ncRNAs), os quais serão apresentados a seguir.

1.2.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação bioquímica do DNA melhor estudada, no qual é adicionado um grupamento metil no carbono 5 da citosina (sendo, portanto, nomeado como 5mC). A reação de adição é catalisada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), principalmente pelas enzimas DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (BURE; NEMTSOVA; KUZNETSOVA, 2022).

A reversibilidade dessa marca epigenética é possível graças à retirada desse radical, por ação das enzimas da família TET (*Ten-Eleven Translocation*). Essas enzimas são responsáveis por oxidar a 5mC, convertendo-a para 5hmC, que posteriormente será removida pela TDG (*Thymine DNA Glycosylase*), e substituída por uma nova citosina não metilada (MOORE; LE; FAN, 2013).

A metilação do DNA está associada ao silenciamento quando ocorre em promotores gênicos, uma vez que essa marca recruta outros componentes da maquinaria epigenética que impedem a ligação de fatores transcripcionais e auxiliam na repressão gênica (MOORE; LE; FAN, 2013). Regiões denominadas de ilhas CpG são aquelas acima de 500 pares de base que

apresentam grande quantidade de dinucleotídeos CpG. São regiões susceptíveis à metilação, no entanto, normalmente se encontram não metiladas quando associadas à região regulatória de genes essenciais para as células normais. No câncer, o termo “hipermetilação” é comumente utilizado para indicar o silenciamento epigenético de genes supressores de tumor. Adicionalmente, as ilhas CpG também são importantes nas chamadas DMRs (*Differentially Methylated Regions*) dos genes regulados por *imprinting* genômico (MOORE; LE; FAN, 2013).

O *imprinting* é um mecanismo pelo qual apenas um dos alelos parentais é expresso, e geralmente é regulado por uma DMR que se encontra metilada em apenas um dos alelos. Esse padrão de metilação é estabelecido durante o desenvolvimento embrionário e é preservado ao longo das divisões celulares, sendo mantido, principalmente, pela enzima DNMT1. A perda do *imprinting* (*Loss of Imprinting- LOI*) é frequentemente detectada em uma variedade de tumores, sendo considerada uma alteração comum no câncer. Quando o padrão de metilação alelo-específico da DMR na região reguladora do *imprinting* é perdido, o alelo silenciado é re-expresso (perda de metilação da DMR) ou o alelo que deveria se expressar é silenciado (metilação bialélica da DMR) (JELINIC; SHAW, 2007).

1.2.2. Modificações Pós-Traducionais (PTMs) das Histonas

Estima-se que as 24 moléculas de DNA que constituem cada um dos 24 tipos de cromossomos humanos, se alinhadas, somariam aproximadamente 2 metros de comprimento. Essas moléculas de DNA são compactadas progressivamente em níveis hierárquicos de tal forma que o genoma se acomode no núcleo celular de aproximadamente 10µm de diâmetro, possibilitando seu armazenamento. Para tal compactação, a fita de DNA é enovelada ao redor de um octâmero de histonas, formado por um tetrâmero de duas unidades da histona H3 e duas da H4, e dois dímeros de H2A e de H2B. Essa estrutura é denominada nucleossomo, a qual constitui a unidade básica da cromatina (MILLÁN-ZAMBRANO et al., 2022).

A conformação da cromatina é dinâmica, e regiões particulares podem ser desenoveladas e, portanto, ficarem acessível à maquinaria de transcrição. As modificações pós-traducionais (PTMs, do inglês: *Post-Translational Modifications*) das histonas são importantes na regulação dessa dinamicidade da cromatina, uma vez que alteram a interação entre o DNA e as histonas, ao adicionar radicais covalentes nas histonas em suas caudas terminais (ARMSTRONG, 2014).

As PTMs são coordenadas por diferentes enzimas, sendo essas classificadas em três grupos: as “*writers*”, que catalisam a adição das modificações, as “*erasers*”, que possuem uma ação antagonista e catalisam a sua remoção, e a última classe são as proteínas denominadas “*readers*”, que são os complexos reguladores que fazem a leitura dessas modificações e se

ligam a regiões específicas no genoma, facilitando processos biológicos relacionados ao DNA, como replicação, reparo e transcrição (DAWSON, 2017). Dentre as PTMs melhores caracterizadas encontram-se a acetilação, metilação, ubiquitinação, sumoilação e fosforilação, sendo a acetilação e a metilação as modificações mais estudadas em diferentes tipos de cânceres (ARMSTRONG, 2014).

A acetilação é um processo dinâmico, ocorrendo nos resíduos de lisinas presentes na cauda terminal principalmente das histonas H3 e H4, e está correlacionada à regulação positiva da transcrição. Da mesma forma que um grupo acetil pode ser adicionado à lisina, também pode ocorrer a retirada desse radical (desacetilação), o que favorece a conformação mais condensada da cromatina e, conseqüentemente, à repressão da transcrição gênica (RUJITER et al., 2003).

A adição do radical acetil é catalisada pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs), da mesma forma que a desacetilação é catalisada pelas enzimas desacetilases de histonas (HDACs). A família das HDACs é dividida em quatro classes, sendo a classe I composta pelas HDACs 1, 2, 3 e 8, classe II, subdividida em IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10), classe III, chamadas de sirtuínas, e classe IV, composta pela HDAC11. As HDACs de classe I estão majoritariamente localizadas no núcleo, uma vez que a maior parte de seus substratos estão localizados neste compartimento; no entanto, algumas HDACs, como as de classe II e a HDAC3, são também detectadas no citoplasma, em resposta à sinalização celular específicas e possuem como substratos outras proteínas não-histônicas (RUJITER et al., 2003).

Apesar das funções e alvos específicos das HDACs ainda necessitarem de investigações mais detalhadas, é notável que essas enzimas possuem papel crucial nos cânceres humanos. A desacetilação anormal está associada à iniciação e progressão tumoral, sendo a expressão aumentada dos genes codificadores de *HDACs* associada a um pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes. Como essas enzimas podem reprimir a expressão de genes supressores tumorais foi sugerido que elas serviriam como subunidades catalíticas de complexos repressores maiores, o que indiretamente favoreceria a expressão de oncogenes (LI; SETO, 2016).

Os altos níveis de expressão das HDACs de classe I é comumente descrita nos cânceres humanos, principalmente da HDAC1 e 2, uma vez que essas são as que apresentam maior atividade catalítica (LI; SETO, 2016). Dessa forma, é crescente os estudos com enfoque na identificação de *epi-drugs* e a busca de fármacos inibidores de HDACs (HDACi), já existindo no mercado algumas drogas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration-USA*), como

o Vorinostat, Panobinostat e Romidepsina (RAMAIAH; TANGUTUR; MANYAM, 2021) para a terapia epigenética do câncer.

O tratamento com essa classe de fármacos resultou na inibição da invasão celular, aumento da apoptose de células tumorais e sua sensibilização à quimioterápicos, podendo ter valor na terapia combinada com outras modalidades, como quimio e/ou radioterapia e imunoterapia. Embora a maioria dessas drogas seja classificadas como inibidores pan-HDACs, ou seja, inibem todas as enzimas dessa família, o efeito dos HDACi é tumor-específico, podendo agir por diferentes mecanismos de ação, a depender do tipo de câncer (RAMAIAH; TANGUTUR; MANYAM, 2021).

A inespecificidade dos HDACi representa um problema, principalmente porque já foram relatados efeitos negativos e adversos após o uso de protocolos de tratamento contendo algumas dessas drogas. Por exemplo, a expressão reduzida de HDAC2 foi associada ao pior prognóstico em pacientes câncer colorrectal e em casos metastáticos. Um estudo *in vitro* utilizando linhagem celulares derivadas de câncer colorrectal demonstrou que a deleção ou o *knockdown* da *HDAC2* induziu a transição epitélio-mesenquimal (EMT), favorecendo o surgimento de metástases. Por esta razão, é importante o desenvolvimento de drogas mais seletivas, para amenizar possíveis efeitos colaterais (HU ET AL., 2020).

Outra PTM muito importante é a metilação. Esse mecanismo epigenético pode ocorrer tanto nos resíduos de arginina (R) quanto nos de lisina (K), sendo esta última a mais frequentemente estudada. Diferentemente da acetilação, a metilação é um processo mais complexo, já que seu efeito dependente do grau da metilação e da posição do resíduo de lisina; pode ocorrer uma monometilação, dimetilação ou trimetilação (ARMSTRONG, 2014), em diferentes posições ocupadas por lisinas, sendo as principais a H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, H4K20 (CICCONE; CHEN, 2009).

A metilação da H3K9, H3K27 e H4K20 está relacionada à condensação da cromatina e, portanto, à repressão gênica, enquanto a presença do radical metil na H3K4, H3K36 e H3K79 está relacionada à descondensação da cromatina e, portanto, à transcrição gênica ou mesmo ativação gênica, como no caso das lisinas 4 e 36. O processo de adição do radical metil é regulado pelas enzimas lisina metiltransferases (KMTs) e a retirada pela lisina demetilases (KDMs) (CICCONE; CHEN, 2009); porém, esse processo também pode ser mediado por alguns complexos, como o Complexo Repressivo Polycomb 2 (PRC2) que contém subunidades catalíticas (KIM; ROBERTS, 2016).

PRC2 é um complexo que realiza a trimetilação da lisina 7 da histona H3 (H3K27me3), formado por 4 subunidades: EED, SUZ12, RbAp46/48 e EZH2. A enzima EZH2 (*Enhancer of Zeste Homologue 2*) é a subunidade catalítica do complexo que promove ativamente a metilação, através de seu domínio SET. No tecido normal, a EZH2 é recrutada para *loci* específicos para silenciar a expressão de genes importantes durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação das células (KIM; ROBERTS, 2016).

Evidências do papel crucial dessa subunidade na iniciação e progressão tumoral emergiram dos estudos demonstrando a expressão aumentada do gene *EZH2* relacionada a um pior prognóstico e maior agressividade nos cânceres de próstata, mama, bexiga, endométrio e no melanoma. Em adição, mutações de ganho de função do gene *EZH2* foram relacionadas com o aumento da trimetilação da H3K27, o que facilitaria a transformação das células para o fenótipo maligno pelo bloqueio da sua diferenciação. Também foram encontradas mutações de perda de função em genes que antagonizam os efeitos de EZH2, favorecendo ainda mais sua atividade, no câncer (KIM; ROBERTS, 2016).

Apesar de muitos estudos focarem em apenas um componente da maquinaria epigenética, a maioria deles não age isoladamente, exercendo suas funções por meio de interações complexas entre si. Um dos complexos melhor descritos na literatura é o NURD (*Nucleosome Remodeling and Histone Deacetylation Complex*), no qual as HDAC1 e 2 fazem parte; esse complexo é recrutado para promotores que sofreram metilação pelas DNMTs, para assim desacetilá-los e coordenar o silenciamento gênico (ARMSTRONG, 2014).

1.2.3. RNAs não codificantes (ncRNAs)

No genoma humano, aproximadamente 2-3% da sequência foi associada a proteínas funcionais, sendo a sua maior parte (aproximadamente 80%) transcrita em RNAs não codificantes. O fato desses transcritos não codificarem proteínas não exclui a possibilidade de desempenharem funções importantes em diversos processos biológicos, principalmente devido à sua participação na regulação da expressão gênica (FURTADO et al., 2019).

Os ncRNAs podem ser classificados em RNAs curtos, que são transcritos contendo 19-31 nucleotídeos, ou RNAs longos não codificantes (lncRNAs), que são os maiores do que 200 nucleotídeos. Ambas classes estão envolvidas em uma diversidade de vias regulatórias, ao interagirem fisicamente com diferentes moléculas. Essas interações podem ter efeitos diferentes, a depender do alvo: ligações com RNA-DNA modulam a cromatina, regulando a expressão dos genes alvos; interações RNA-mRNA auxiliam na estabilidade e tradução das proteínas e

interações RNA-proteína regulam a manutenção e estabilidade dessa proteína (FURTADO et al., 2019).

Geralmente, os RNAs longos não-codificantes agem em complexos proteicos, podendo ter diversas funções. São capazes de agir como *scaffolds*, auxiliando no encaixe de proteínas em seus respectivos complexos; como *guides*, direcionando moléculas a *loci* específicos; como *decoys*, se ligando às proteínas e impedindo que essas interajam com seus alvos; como sinalizadores de sítios de ligação para complexos reguladores da transcrição gênica e, ainda, podem agir como competidores endógenos (ceRNA), atuando como uma “esponja” para outros transcritos como os microRNAs, impedindo que essas pequenas moléculas interajam com outros transcritos-alvo e exerçam suas funções biológicas (BURE; NEMTSOVA; KUZNETSOVA, 2022).

Deve ser destacado que lncRNAs interagem com outros componentes da própria maquinaria epigenética, como, por exemplo, os *writers*, *erasers* e *readers* das PTMs de histonas. Os lncRNAs podem auxiliar direcionando essas proteínas a *loci* específicos, e agirem como *scaffolds* para outros componentes reguladores da cromatina, de forma a combinar diferentes mecanismos epigenéticos em uma via (HANLY; ESTELLER; BERDASCO, 2018).

Apesar da pesquisa científica ter evoluído na identificação dos RNAs longos não codificantes, pouco se sabe sobre suas funções como regulador global ou suas interações. No entanto, sabe-se que a desregulação da expressão desses transcritos está envolvida em diversas doenças, como o próprio câncer. Essas moléculas podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais, sendo seus efeitos tecido-específico (FURTADO et al., 2019). Nesse contexto, foram selecionados três lncRNAs para exemplificar os diferentes papéis pelos quais os lncRNAs atuam na carcinogênese, evidenciando algumas de suas diversas interações.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi destacar os diferentes papéis que os RNAs longos não codificantes podem ter no câncer e evidenciar sua diversidade de interações com outros componentes da própria maquinaria epigenética.

3. METODOLOGIA

O estudo fundamenta-se em revisão da literatura, utilizando como palavras-chaves “lncRNA”, “cancer”, “HDAC” e “EZH2”, para a pesquisa personalizada no bancos de dados PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram selecionados artigos científicos que estavam disponíveis para *download* e escritos em língua inglesa e publicados em periódicos com reconhecida política editorial e revisão por pares. Ao final da busca, foram selecionados três transcritos, dois bem descritos na literatura (H19 e MEG3) possuindo funções biológicas antagônicas (como oncogene e supressor tumoral, respectivamente), e o MROCK1, que é um potencial oncogene, mas ainda pouco caracterizado.

4. H19- *Imprinted Maternally Expressed Transcript*

4.1. Informações Básicas

O gene *H19* (Gene ID: 283120), também conhecido pelos símbolos ASM, BWS, WT2, ASM1, D11S813E, MIR675HG, LINC00008 e NCRNA00008, está localizado no genoma humano no braço curto do cromossomo 11, na região 1, banda 5, sub-banda 5 (11p15.5) (HGNC Database), com um tamanho aproximado de 2.5kb, sendo composto por cinco éxons. Esse gene possui regulação por *imprinting* com expressão exclusiva do alelo materno na maioria dos tecidos humanos e está situado a 90kb de distância do gene codificador do fator de crescimento tipo-insulina 2 (*IGF2*) (GABORY et al., 2006), o qual apresenta expressão mono-alélica paterna (OMIM Database, 2022a).

O gene *H19* é expresso em altos níveis durante a fase embrionária, tendo funções importantes no desenvolvimento humano, pois faz parte de uma rede de genes “imprintados” que regula a expressão de outros genes vizinhos. Após o nascimento, os níveis de *H19* caem drasticamente, com exceção ao tecido muscular esquelético (LIM et al., 2021).

4.2. Regulação Epigenética

Como citado acima, o *H19* é um gene que sofre *imprinting* paterno. Ele possui regulação coordenada com o gene *IGF2*. Entre os elementos que atuam nesse controle encontra-se a

Região Diferencialmente Metilada (DMR), também chamada de Domínio Diferencialmente Metilado (DMD) que está localizada próxima ao sítio de início da transcrição do gene *H19* (GABORY et al., 2006).

A DMR é rica em dinucleotídeos CpG e se apresenta totalmente metilada no alelo paterno e não metilada no materno. Adicionalmente, o repressor transcricional CTCF se liga aos sítios não metilados do alelo materno, formando uma espécie de barreira física que impede a interação de *enhancers* aos promotores do gene *IGF2*, impedindo que seja expresso no alelo materno (ESTEVEES et al., 2005). Esses *enhancers* são comuns tanto ao gene *H19*, quanto ao *IGF2*, havendo a uma competição entre eles; no entanto, os *enhancers* apresentam preferência ao promotor do *IGF2* (CUI et al., 2022). Por isso, quando o CTCF, que apresenta ligação sensível à metilação, não interage com a DMR metilada do alelo paterno, os *enhancers* se ligam à região promotora do *IGF2*, promovendo sua expressão (ESTEVEES et al., 2005).

Quando a DMR está metilada, como no alelo paterno, o promotor do *H19* também é metilado, levando ao silenciamento desse gene. Portanto, a DMR possui funções distintas, que dependem do seu padrão de metilação; quando não metilada, repressor CTCF pode se ligar, inibindo a expressão do gene *IGF2* e favorecendo a expressão do *H19*. Quando metilada, o CTCF não ocupa essa região regulatória, permitindo a interação dos *enhancers* ao gene *IGF2*, levando à sua expressão, além de promover a metilação do promotor do gene *H19*, silenciando-o (GABORY et al., 2006). A deleção da DMR e/ou alterações no seu padrão de metilação leva à perda de *imprinting* (LOI), desregulando a expressão tanto do gene *H19*, quanto do *IGF2*, levando a acreditar que essa região é capaz de regular, em *cis*, genes vizinhos. Por essa razão, a DMR é considerada um “centro” de regulação (GABORY et al., 2006).

Adicionalmente à metilação, um outro mecanismo epigenético que regula a expressão do gene *H19* é a desacetilação das histonas, principalmente pela ação da HDAC2. Essa enzima é recrutada ao promotor metilado, catalisando a desacetilação do resíduo de lisina 27 da histona 3 (H3K27), o que contribui para a repressão da sua transcrição, pois impede a ligação de fatores transcricionais em sua região promotora (HU et al., 2020). Sendo assim, a expressão do gene *H19* pode ser regulada epigeneticamente em diferentes níveis, como por metilação de seu promotor ou da DMR, e por desacetilação mediada pela enzima HDAC2.

4.3. Papel no Câncer

Níveis anormais do lncRNA H19 estão associados a diversas doenças, como a síndrome de Beckwith-Wiedemann, diabetes, doenças cardiovasculares e o câncer (WANG et al., 2020). O aumento dos níveis desse lncRNA é observado em diversos tipos de tumores malignos, como

no fígado, bexiga, mama, pulmão, cólon e reto (LIM et al., 2021), sendo associado a um pior prognóstico (GHAFOURI-FARD; ESMAEILI; TAHERI, 2020).

Seu papel no câncer ainda não está bem elucidado e parece ser diverso, a depender do estágio clínico da doença e tipo histológico. Porém, sabe-se que está envolvido em diversos *hallmarks* do câncer, como proliferação, migração, crescimento e viabilidade celular, capacidade de migração e invasão, angiogênese, metabolismo da glicose, apoptose, além de quimiorresistência (YANG et al., 2021), e, principalmente, promoção da EMT e de metástases (GHAFOURI-FARD; ESMAEILI; TAHERI, 2020).

A promoção da EMT é importante para o surgimento de metástases, pois células com fenótipo mesenquimal possuem maior mobilidade e comportamento invasivo do que células com fenótipo epitelial. O lncRNA H19 parece favorecer esse processo, por meio de diferentes vias (LUO et al., 2013). Foi observado em linhagem celular derivada de câncer de bexiga que esse lncRNA interage com a subunidade EZH2, de tal forma a silenciar o gene codificador da E-caderina, uma molécula de adesão celular, cuja expressão diminuída favorece a EMT (LUO et al., 2013).

Além disso, em linhagem celular de câncer de esôfago, foi evidenciado um possível papel do lncRNA na regulação da expressão do gene *EZH2*. Foi observado que esse lncRNA aumenta a expressão do gene *STAT3*, que codifica um fator que promove a transcrição do gene *EZH2*, aumentando os níveis dessa proteína. Como consequência, há a ativação da via de sinalização SOX4/ β -catenina, levando ao aumento da expressão dos genes *CDH2*, *CTNNB1*, *SNAIL1* e *MMP1*, que codificam proteínas que são importantes para a EMT (CHEN et al., 2019).

O lncRNA H19 também pode regular a expressão de diferentes genes, por meio de interações RNA-RNA (YANG et al., 2021). Para isso, o H19 atua como um competidor endógeno (ceRNA) de micro-RNA, impedindo que esses pequenos transcritos exerçam sua função biológica (LIM et al., 2021). Em células derivadas de câncer colorretal foi observado que o lncRNA H19 serve como “esponja” para o miR-138 e miR-200a; o miR-138 é responsável por impedir a tradução do mRNA que irá codificar a vimentina, um marcador mesenquimal. O miR-200a, por sua vez, é responsável por diminuir os níveis de ZEB1 e ZEB2, que são proteínas que, dentre outras funções, interagem com a região promotora do gene *CDH1*, inibindo sua transcrição e diminuindo os níveis de E-caderina (LIANG et al., 2015) (Figura 1).

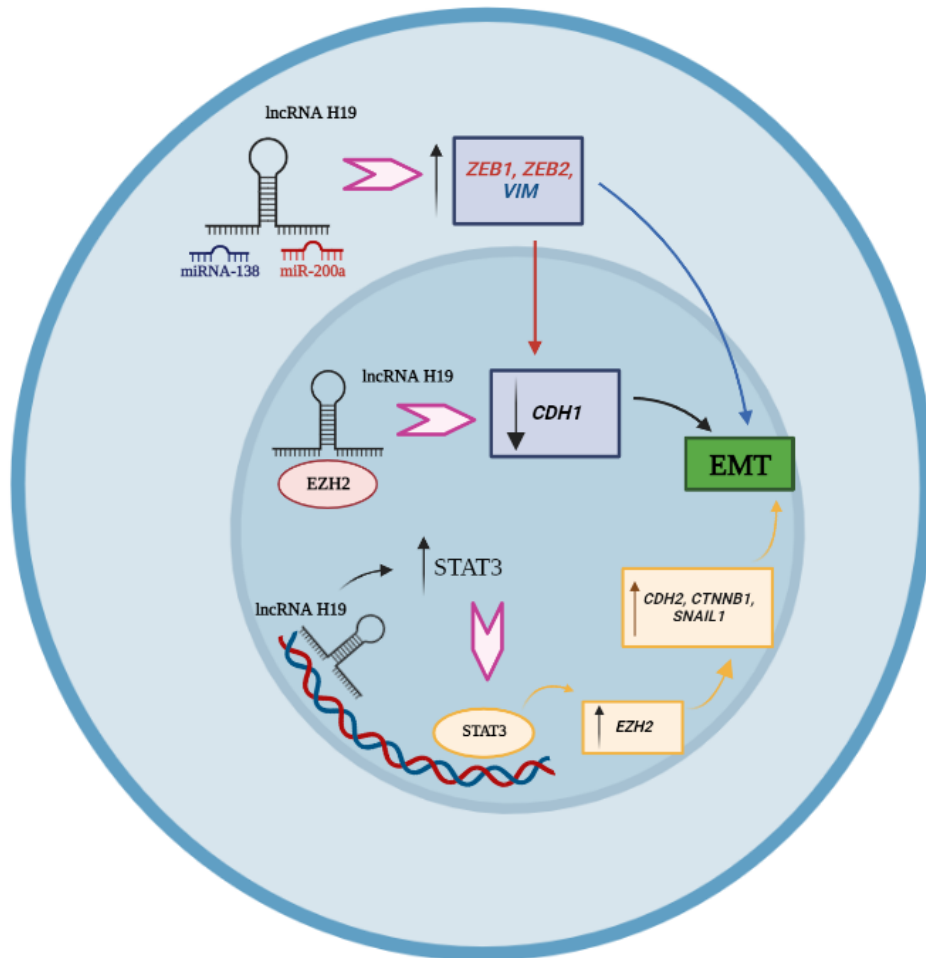


Figura 1. Diferentes interações do lncRNA H19 com outros componentes da maquinaria epigenética e seus efeitos na Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT). Interação RNA-RNA, com o lncRNA H19 agindo como ceRNA para os micro-RNAs miRNA-138 e miR-200a, impedindo que esses pequenos transcritos regulem os níveis dos mRNAs que codificarão as proteínas Vimentina e ZEB/ZEB2, respectivamente. Interação RNA-proteína com a subunidade catalítica EZH2 do complexo PRC2 e silenciamento do *CDH1*, gene codificador da E-caderina, uma proteína de adesão célula-célula, cuja diminuição dos níveis favorece a EMT. Interação RNA-DNA entre o lncRNA H19 e a região promotora do gene *STAT3*, aumentando a expressão desse gene codificador do fator que promove aumento da transcrição do gene *EZH2*. Com isso, há a ativação da via de sinalização SOX4/β-catenina, favorecendo a EMT (figura criada com Biorender, disponível em <https://biorender.com/>).

Uma outra característica importante dos RNAs longos não codificantes é que a maioria desses transcritos é também precursora de miRNAs que, por sua vez, desempenham funções biológicas diferentes do lncRNA de origem. Essa relação lncRNA/miRNA regula o padrão de expressão de diversos genes, podendo modular processos biológicos importantes ou estar implicados em processos patológicos quando desregulados (GABORY et al., 2006).

O transcrito H19 também é processado em microRNA (miR-675) a partir do 1º éxon. Um estudo com linhagens celulares de câncer de mama constatou a correlação positiva nos níveis desses dois transcritos; no entanto, enquanto o lncRNA H19 desempenhava funções oncogênicas, principalmente aumentando a proliferação celular e diminuindo a apoptose, o

miR-675 parecia não possuir efeitos nesses processos biológicos. É possível que o miR-675 atue na regulação da atividade do próprio lncRNA H19, apesar das evidências ainda serem insuficientes (MÜLLER et al., 2019).

Em contrapartida, o miR-675 parece contribuir para a proliferação celular em linhagens celulares de câncer de bexiga. Esse microRNA inibe a expressão do gene *TP53*, codificador da p53, uma proteína supressora tumoral conhecida como “guardiã do genoma”, cuja função principal é manter a integridade do DNA. Em diversos cânceres, são detectados baixos níveis dessa proteína, o que favorece a proliferação celular descontrolada e danos ao DNA (AL-RUGEEBAH; ALANAZI; PARINE, 2019). Ao regular pós-transcricionalmente esse gene, o miR-675 inibe a apoptose e promove a progressão do ciclo celular (LIU et al., 2016).

Apesar da maioria dos estudos relatarem a expressão aumentada do gene *H19* em diversos tipos de cânceres e provável função oncogênica, alguns grupos evidenciaram um possível papel como supressor tumoral (LIM et al., 2021). Moulton et al. mostrou que o silenciamento do gene *H19* pode estar envolvido no surgimento do tumor de Wilms, também conhecido como nefroblastoma, ainda que o mecanismo molecular ainda não esteja bem elucidado. Foi constatado que a maioria dos pacientes apresentavam hipermetilação na DMR, em ambos os alelos, levando assim à repressão bialélica do gene *H19*, ao contrário de pacientes controle que apresentaram altos níveis de expressão do lncRNAs H19 (MOULTON, 1994).

Sendo assim, acredita-se que o *H19* possa ser um gene “modificador”, o qual pode atuar como supressor tumoral ou oncogene, a depender de suas interações; no entanto, essa hipótese ainda é muito primária e necessita de maior embasamento científico (LIM et al., 2021).

4.4. Perspectivas

O transcrito do gene *H19* foi um dos primeiros lncRNA identificados e, atualmente, é um dos mais estudados, devido à variedade de interações e propriedades que essa molécula possui. Apesar disso, muitos mecanismos moleculares do lncRNA H19 permanecem desconhecidos e existem relatos descrevendo funções discrepantes na literatura. No entanto, esse transcrito possui grande potencial tanto para o diagnóstico do câncer, uma vez que pode ser detectado no plasma dos pacientes (GHAFOURI-FARD; ESMAEILI; TAHERI, 2020), quanto na terapia combinada, visto que foi observado que o silenciamento de *H19* possui efeito sinérgico com agentes antitumorais (HASHEMI et al., 2022).

5. MEG3- *Maternally Expressed Gene 3*

5.1. Informações Básicas

O gene *MEG3* (Gene ID: 55384), também conhecido como GTL2, FP504, prebp1, PRO0518, PRO2160, LINC00023, NCRNA00023 ou onco-lncRNA-83 (HGNC Database), localizado no braço longo do cromossomo 14, região 3, banda 2, sub-banda 2 (14q32.2), contém 10 éxons e, aproximadamente, 35kb de extensão. Assim como o gene *H19*, é regulado por *imprinting*, sendo transcrito somente a partir do alelo materno (AL-RUGEEBAH; ALANAZI; PARINE, 2019).

Esse gene é expresso no tecido normal, principalmente no cérebro, na hipófise, placenta adrenais, testículos, ovários, baço, glândulas mamárias e fígado (HE et al., 2017), e possui diversas isoformas. No total, são 12 isoformas, todas contendo os éxons 1-3 e 8-10, variando entre si apenas nos éxons 4-7. Essas isoformas são nomeadas de MEG3-MEG3k, sendo a MEG3 a isoforma mais comum, e todas são não codificadoras (BALIK et al., 2013).

A regulação da expressão do gene *MEG3* se assemelha com a do *H19*, e a perda de sua expressão devido à hipermetilação foi evidenciada em diferentes cânceres, sugerindo um papel como supressor tumoral. Esse transcrito interage com diversas outras moléculas e está envolvido em muitas vias, que serão discutidas a seguir (AL-RUGEEBAH; ALANAZI; PARINE, 2019).

5.2. *Imprinting* e Regulação Epigenética

O processo de *imprinting* paterno do gene *MEG3* se assemelha ao do *H19*. Sua região promotora é rica em dinucleotídeos CpG que podem sofrer metilação, conseqüentemente levando ao seu silenciamento (BALIK et al., 2013). Além disso, existem duas DMRs posicionadas *upstream* ao promotor do gene *MEG3*, sendo a principal a IG-DMR (Região Diferencialmente Metilada Intergênica), localizada a 13kb do sítio de início da transcrição (TSS, do inglês: *Transcription Start Site*) do gene *MEG3*, que se sobrepõe ao promotor (HE et al., 2017).

Em neuroblastoma foi evidenciado um possível mecanismo de regulação da expressão de *MEG3*, mediado por um complexo que possui elementos bem conhecidos da maquinaria epigenética, composto pelas enzimas EZH2, DNMT1 e HDAC1 (YE et al., 2022).

Além disso, em linhagem celular derivada de adenocarcinoma pancreático, foi observado que o gene *MEG3* também pode ser silenciado pelas enzimas EZH2 e HDAC3, por meio da ação do fator de transcrição Sp1. Esse fator se liga a sítios de interação localizados na região

promotora do *MEG3*, e recruta a EZH2 e HDAC3, contribuindo para a repressão desse gene (HAN et al., 2020).

5.3. Função como Supressor Tumoral

A diminuição significativa dos níveis do lncRNA *MEG3* foi relatada em vários estudos e em diversos tipos de cânceres, como no de mama, fígado, colorretal, cervical, gástrico, ovariano, pulmonar, glioma e osteosarcoma (AL-RUGEEBAH; ALANAZI; PARINE, 2019). Baixos níveis desse transcrito foram relacionados a um pior prognóstico e maior agressividade, principalmente quando associado à hipermetilação de sua região promotora (GHAFOURI-FARD; TAHERI, 2019).

A metilação aberrante é um dos principais mecanismos de silenciamento do gene *MEG3* no câncer, podendo ocorrer tanto na região promotora desse gene, quanto na IG-DMR. Também podem existir diferenças entre os mecanismos de *splicing* no tecido normal e no tecido tumoral, havendo maior ou menor expressão de algumas isoformas (BALIK et al., 2013).

Uma das principais funções do lncRNA *MEG3* é aumentar expressivamente os níveis da proteína p53, por meio de diferentes tipos de interações (OMIM Database, 2022 b). O lncRNAs *MEG3* faz essa regulação por meio de diferentes mecanismos: diminui os níveis de expressão do gene *MDM2*, que codifica a enzima ubiquitina ligase responsável pela degradação da proteína p53; pode se ligar diretamente aos domínios de ligação do gene *TP53*, aumentando sua atividade transcricional, ou aumenta a estabilidade da proteína e, conseqüentemente, seu nível nas células (GHAFOURI-FARD; TAHERI, 2019). Já foi relatado que essa interação *MEG3*-p53 também regula a atividade de outros supressores tumorais, como a p21 (HE et al., 2017).

Outra interação importante do lncRNA *MEG3* é com o complexo PRC2, via interação direta com a subunidade EZH2. Essa interação RNA-proteína parece ser guiada por regiões enriquecidas em GA, presentes nos sítios de ligação do lncRNA *MEG3*, que são importantes para a formação de estruturas triplex RNA-DNA nas regiões regulatórias dos genes alvos (MONDIAL et al., 2015). Essa estrutura recruta a EZH2, promovendo a marca de metilação na H3K27, favorecendo o silenciamento do gene alvo (LI; SYED; SUGIYAMA, 2016).

A interação *MEG3*-EZH2 é importante para a regulação negativa da via de sinalização do TGF- β , um fator de crescimento que, dentre outros genes envolvidos nessa via, auxilia na regulação dos níveis de *MDM2*. Sendo assim, menores níveis de *MEG3* levam à maior atividade da via de sinalização do TGF- β , aumentando os níveis de *MDM2* e,

consequentemente, a degradação da p53, favorecendo a proliferação celular (GHAFOURI-FARD; TAHERI, 2019) (Figura 2).

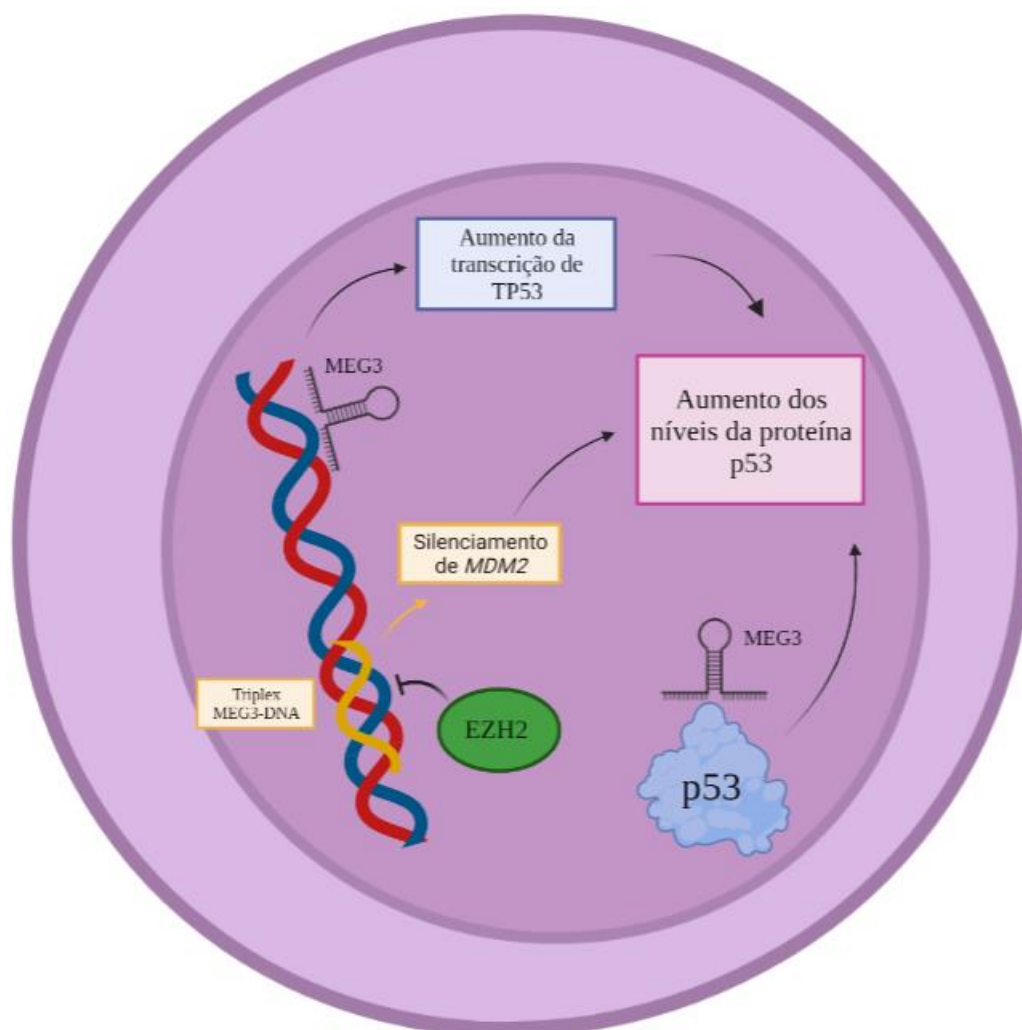


Figura 2. Diferentes mecanismos de regulação dos níveis da proteína supressora tumoral p53 mediados pelo lncRNA MEG3. Por meio de interações RNA-DNA, MEG3 pode se ligar diretamente aos domínios de ligação na região promotora do gene *TP53*, promovendo sua transcrição, ou formar estruturas triplex RNA-DNA, recrutando a enzima EZH2 levando a metilação da histona H3, e indiretamente diminuindo os níveis de MDM2 e silenciamento da via de sinalização TGF- β . A interação RNA-proteína, entre MEG3 e a própria p53, aumenta a sua estabilidade e seus níveis intracelulares (figura criada com Biorender, disponível em <https://biorender.com/>).

5.4. Perspectivas

Atualmente, a relevância e a função chave do lncRNA MEG3 em vários processos biológicos é indiscutível. A diminuição de seus níveis acarreta diversas consequências e favorece a carcinogênese em diferentes tecidos. Considerando o seu potencial como supressor tumoral, a indução da expressão do gene *MEG3* parece ser uma abordagem terapêutica promissora, apesar de ainda serem necessárias maiores investigações acerca dos *off-target*, uma vez que esse transcrito apresenta interações complexas.

Do ponto de vista diagnóstico, a quantificação dos níveis de expressão do lncRNAs MEG3 e a análise nos padrões de metilação do DNA é uma boa alternativa, uma vez que menores níveis de MEG3, associado à hipermetilação do DNA, está correlacionado com um pior prognóstico (HE et al., 2017).

6. MROCKI- MARCKS *cis*-Regulating lncRNA Promoter of Cytokines and Inflammation

6.1. Informações Básicas

O gene *MROCKI* (Gene ID: 285758), também conhecido pelos símbolos ROCKI, LINC01268 ou LOC285758, localizado no braço longo do cromossomo 6, região 2, banda 1 (6q21), possui aproximadamente 5kb, composto por 3 éxons (HGNC Database). Normalmente, é expresso em alguns tecidos, como o fígado, pulmão, intestino delgado e cólon, sendo sua função tecido-específica (JIN et al., 2021).

Uma de suas principais funções é regular negativamente a expressão de um gene vizinho, codificador da proteína MARCKS (*Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase*). O lncRNA MROCKI recruta a proteína APEX1 ao promotor do gene *MARCKS*, que, por sua vez, recruta a enzima HDAC1, promovendo a desacetilação do promotor e, conseqüentemente, diminuição da transcrição do gene *MARCKS*. Como consequência desse mecanismo, há um aumento na produção de citocinas inflamatórias e de quimiocinas, promovendo a resposta inflamatória (ZHANG et al., 2019).

Adicionalmente, foi observado em linhagem celular derivada de leucemia mieloide aguda, que o lncRNA MROCKI auxilia na regulação da expressão do gene codificador da HDAC2, atuando como um regulador positivo em *cis* (LEI et al., 2018) (Figura 3).

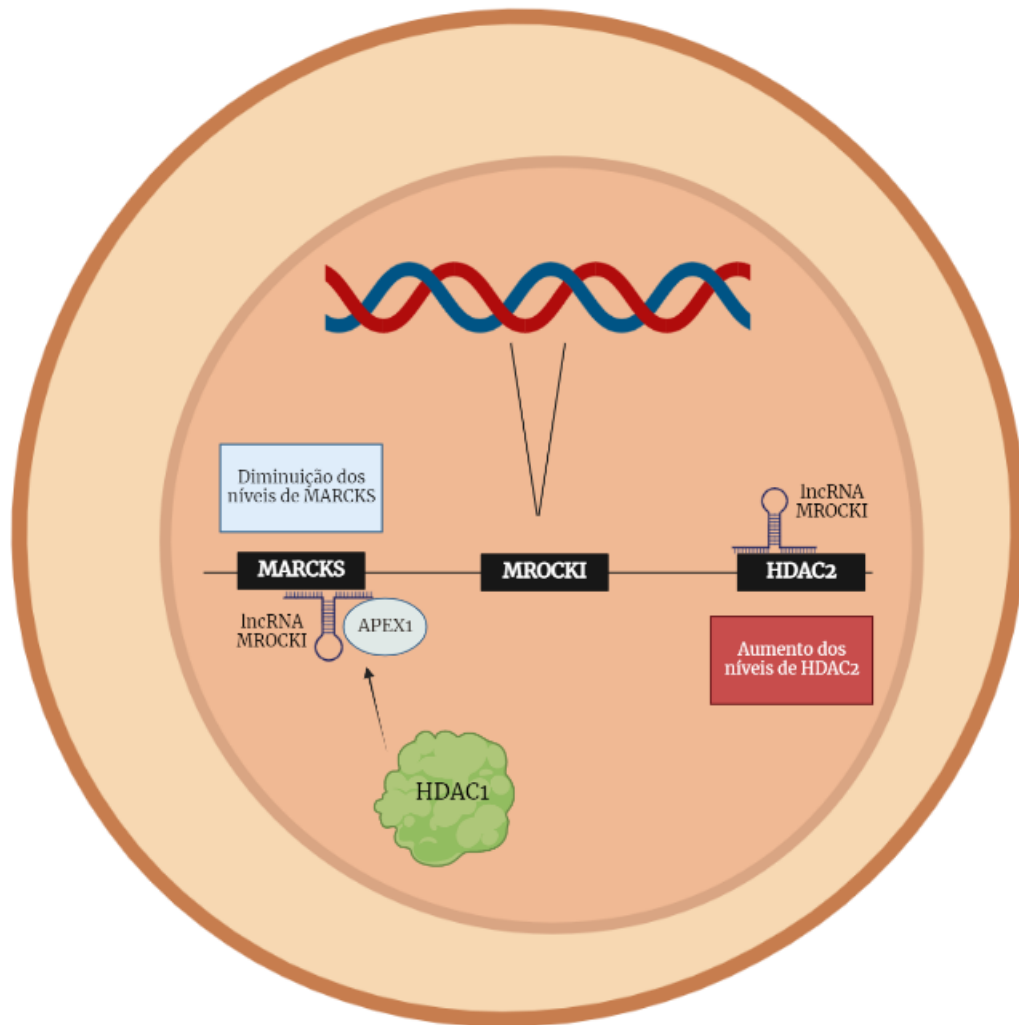


Figura 3. Papel do MROCKI como regulador em cis. Esse lncRNA, juntamente à proteína APEX1, se liga à região promotora do gene codificador da proteína MARCKS, uma supressora tumoral responsável pela regulação da resposta inflamatória. Essa interação recruta a enzima HDAC1, que catalisa a desacetilação do promotor, auxiliando no silenciamento desse gene. Por outro lado, o MROCKI age como regulador positivo do gene codificador da HDAC2, levando ao aumento da sua expressão e, conseqüentemente, o aumento dos níveis dessa enzima (figura criada com Biorender, disponível em <https://biorender.com/>).

Um estudo, utilizando amostras de gliomas, demonstrou que o gene *MROCK1* é regulado por metilação de seu promotor, sendo esta metilação inversamente correlacionada a sua expressão. Em tecidos normais, o promotor se encontra metilado, porém a diminuição ou perda desse padrão de metilação parece estar envolvida em diversas doenças, pois leva ao aumento da expressão do gene *MROCK1* (MATJASIC et al., 2017).

Recentemente, foi descrita a expressão aumentada de *MROCK1* em alguns tipos de cânceres, como no câncer de fígado, leucemia mieloide aguda e glioma, associada a vias importantes para a iniciação e progressão tumoral, que serão discutidas a seguir.

6.2. Papel no Câncer

Estudos com glioma mostraram que o promotor do gene *MROCK1* se encontra hipometilado ou desmetilado nas amostras dos pacientes com esse tumor cerebral, quando comparados ao tecido normal. O aumento dos níveis do lncRNA *MROCK1* leva à diminuição da proteína *MARCKS*, que foi recentemente reportada como uma supressora tumoral (MATJASIC et al., 2017); a diminuição dessa proteína acaba favorecendo a inflamação, que atualmente é reconhecida como um importante *hallmark* do câncer (HANAHAN, 2022).

Em adição, o lncRNA *MROCK1* possui um grande valor para o diagnóstico diferencial de glioblastoma, pois sua expressão é diferente entre os tipos de glioma, e o padrão de metilação do promotor do gene difere os gliomas primário e secundário. Essas características são extremamente relevantes, pois, morfológicamente, esses tumores são muito semelhantes, o que normalmente dificulta sua classificação (MATJASIC et al., 2017).

De forma semelhante, em carcinoma hepatocelular foi evidenciado que a expressão aumentada do gene *MROCK1* está associada a um pior prognóstico, especialmente nos estágios mais avançados da doença. Foram detectados altos níveis desse transcrito tanto no citoplasma, quanto no núcleo das células tumorais, o que sugere que ele esteja associado tanto à regulação transcricional quanto pós-transcricional (JIN et al., 2021).

Na leucemia mieloide aguda, altos níveis de *MROCK1* também foram associados a pior prognóstico, quando comparados a pacientes com baixos níveis desse transcrito. Estudos com linhagens celulares desse tipo de câncer evidenciaram que existe uma correlação negativa entre *MROCK1* e o miR-217, um micro-RNA que se encontra diminuído na medula óssea, em comparação ao tecido normal (CHEN et al., 2020).

O lncRNA *MROCK1* age como um ceRNA, servindo de “esponja” para o miR-217 e impedindo sua atividade. Esse miRNA é responsável por regular o nível de proteínas, ao se ligar a mRNAs alvos e promover sua degradação ou impedir sua tradução, como a proteína *SOS1* (CHEN et al., 2020).

A *SOS1* regula os níveis de proteínas da família *RAS* que, por sua vez, são importantes na transdução de sinais para estímulo da proliferação e diferenciação celular. Como o miR-217 se encontra em baixos níveis na leucemia mieloide aguda, há uma maior expressão de *SOS1* e, conseqüentemente, maior ativação das proteínas *RAS*, levando ao aumento na proliferação celular nas células com maior expressão do *MROCK1*. Sendo assim, o lncRNA *MROCK1* possui uma correlação negativa com o miR-217 e uma correlação positiva com a proteína *SOS1* (CHEN et al., 2020) (Figura 4).

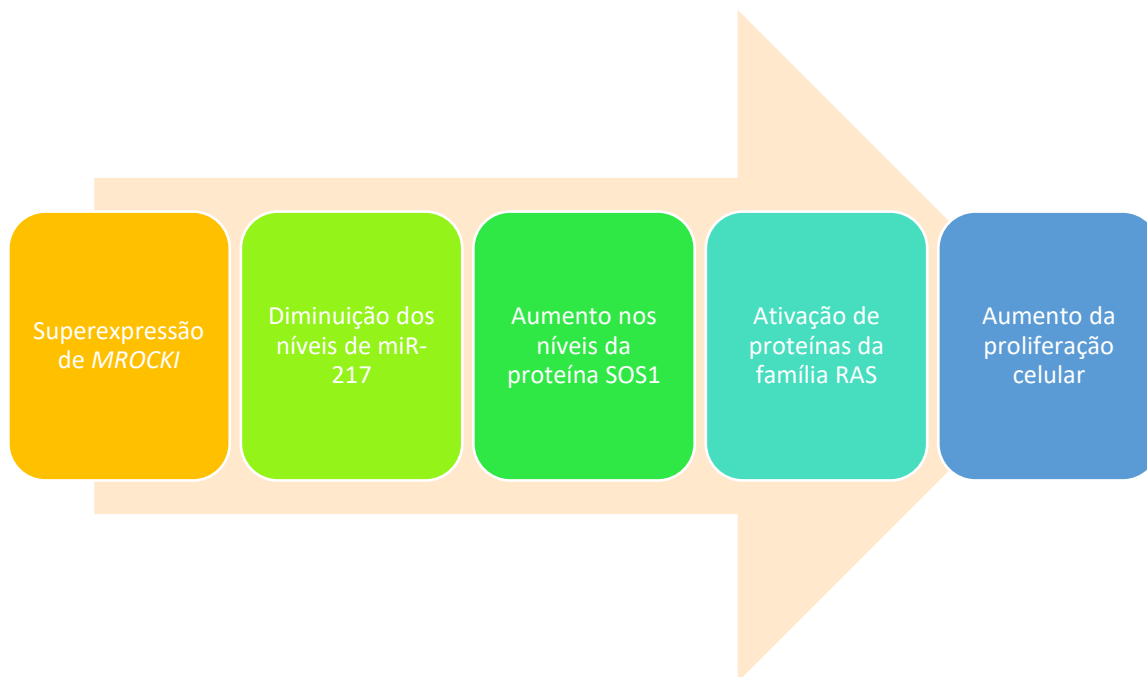


Figura 4. Esquema do processo de regulação da proliferação celular mediada pelo lncRNA MROCKI, via miR-217/SOS1. O MROCKI atua como um RNA competidor endógeno, servindo de esponja para o miR-217 (interação RNA-RNA), impedindo que exerça sua função de regulador da expressão de alvos, como a proteína SOS1, que está envolvida na ativação de proteínas que modulam a proliferação e diferenciação celular (figura criada com Biorender, disponível em <https://biorender.com/>).

6.3. Perspectivas

Apesar dos com enfoque no lncRNA MROCKI serem em tipos de cânceres que possuem características muito diferentes, o nível de expressão desse lncRNA encontra-se fortemente associado a importantes *hallmarks* do câncer, como o aumento da proliferação celular, diminuição da apoptose e promoção da inflamação. Apesar de ser um RNA longo não codificante ainda pouco estudado, é notável que o MROCKI possui envolvimento na carcinogênese, além de possivelmente ter valor diagnóstico e prognóstico. Por isso, são necessárias maiores investigações sobre esse lncRNA, a fim de compreender melhor suas interações e como seu nível de expressão afeta os processos biológicos de uma célula (CHEN et al., 2020).

7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As alterações epigenéticas possuem relevância para o surgimento de uma variedade de síndromes e doenças multifatoriais, como o câncer. Atualmente, o câncer é uma das doenças mais prevalentes e incidentes do mundo, e um dos maiores desafios para a comunidade científica transpor o conhecimento sobre a biologia básica do tumor para estratégias inovadoras de tratamento, visto que é bastante heterogênea e apresenta grande complexidade de alterações moleculares (DAWSON, 2017).

Os mecanismos epigenéticos são fundamentais para a regulação da expressão gênica e homeostasia celular. Nas últimas décadas, importantes avanços técnicos permitiram a identificação das diferentes modificações das histonas bem como a compreensão das suas funções em diversos processos biológicos fundamentais como a transcrição, replicação e reparo do DNA. Nesse contexto, a cromatina está implicada nas respostas dinâmicas a vários sinais e componentes celulares que estão corrompidos no câncer, sendo alvos de diversos estudos que visam uma melhor compreensão acerca das interações dos componentes da maquinaria epigenética já que essas moléculas estão frequentemente alteradas, tanto em função, quanto em níveis de expressão (NEBBIOSO et al., 2018).

Os RNAs longos não-codificantes entram como fatores centrais na iniciação e progressão tumoral, podendo adotar função como oncogenes ou como supressores tumorais. Alguns lncRNAs se encontram em níveis aumentados, adotando papel oncogênico, promovendo a proliferação, migração, crescimento e viabilidade celular, transição epitélio-mesenquimal e capacidade de migração e invasão, facilitando a formação de metástases (YANG et al., 2021). Interações, como entre a enzima HDAC2 e o promotor do gene *H19* exemplificam como fármacos, como os pan-HDACi, podem apresentar efeitos *off-targets*, e contribuir para a transição epitélio-mesenquimal (RAMAIAH; TANGUTUR; MANYAM, 2021).

Visto que, a HDAC2 contribui para o silenciamento do *H19*, ao inibi-la, há um aumento nos níveis do lncRNA *H19*, o que, por meio de diferentes vias, contribui para a aquisição do fenótipo mesenquimal, pelas células cancerígenas (GHAFOURI-FARD; ESMAEILI; TAHERI, 2020). Esse efeito apenas reforça a importância do desenvolvimento de drogas que tenham alvos mais específicos e dos estudos das interações entre os componentes da maquinaria epigenética.

Por outro lado, existem alguns transcritos que agem como supressores tumorais, sendo encontrados em baixos níveis em alguns tipos de cânceres, como o *MEG3*. Esse lncRNA apresenta interações com proteínas supressoras tumorais muito importantes, como a *p53*. Essa

interação promove o reparo do DNA, controle do ciclo celular e apoptose, e baixos níveis do MEG3 está associado à diminuição dos níveis de p53, característica importante para a carcinogênese (BALIK et al., 2013).

Por fim, o lncRNA MROCKI exemplifica que os estudos acerca dessa classe de transcritos ainda são escassos, apesar de possivelmente apresentarem um grande envolvimento no câncer. Em todos os estudos realizados, níveis aumentados desse lncRNA foram associados ao fenótipo de doença agressiva e pior prognóstico. Além disso, suas interações seguem um padrão similar a outros lncRNA melhor descritos, atuando como um ceRNA para miRNAs importantes para a regulação de processos biológicos, e fazendo interações RNA-DNA e RNA-proteína, alterando os níveis de transcrição e regulando a estabilidade das moléculas (JIN et al., 202; CHEN et al., 2019).

Sendo assim, são essenciais novas investigações acerca das funções e interações biológicas, não somente dos RNAs longos não codificantes, mas de todos os componentes da maquinaria epigenética, para um melhor entendimento da biologia tumoral, e possibilitar futuros estudos que visam a descoberta de novas abordagens terapêuticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-RUGEEBAH, A.; ALANAZI, M.; PARINE, N. R. MEG3: an Oncogenic Long Non-coding RNA in Different Cancers. **Pathology & Oncology Research**, v. 25, n. 3, p. 859–874, jul. 2019.
- ARMSTRONG, L. **Epigenetics**, Nova Iorque, NY, Garland Science, 2014.
- BALIK, V. et al. MEG3: a novel long noncoding potentially tumour-suppressing RNA in meningiomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 112, n. 1, p. 1–8, mar. 2013.
- BURE, I. V.; NEMTSOVA, M. V.; KUZNETSOVA, E. B. Histone Modifications and Non-Coding RNAs: Mutual Epigenetic Regulation and Role in Pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5801, 22 maio 2022.
- CAVALLI, G.; HEARD, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 489–499, jul. 2019.
- CHEN, B. et al. Long non-coding RNA LINC01268 promotes cell growth and inhibits cell apoptosis by modulating miR-217/SOS1 axis in acute myeloid leukemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 8, p. e9299, 2020.
- CHEN, M.-J. et al. LncRNA H19 promotes epithelial mesenchymal transition and metastasis of esophageal cancer via STAT3/EZH2 axis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 113, p. 27–36, ago. 2019.
- CICCONE, D. N.; CHEN, T. Histone lysine methylation in genomic imprinting. **Epigenetics**, v. 4, n. 4, p. 216–220, 16 maio 2009.
- CUI, H. et al. Loss of Imprinting in Colorectal Cancer Linked to Hypomethylation of H19 and IGF2. **Cancer Research**, v. 62, p. 6442-6446, 15 nov. 2002
- DAWSON, M. A. The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. **Science**, v. 355, n. 6330, p. 1147–1152, 17 mar. 2017.
- ESTEVEZ, L.I.C.V. et al. DNA Methylation in the CTCF-Binding Site I and the Expression Pattern of the H19 Gene: Does Positive Expression Predict Poor Prognosis in Early Stage Head and Neck Carcinomas? **Molecular Carcinogenesis**, v. 44, p. 102-110, out. 2005.
- FURTADO, C. L. M. et al. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2 dez. 2019.
- GABORY, A. et al. The *H19* gene: regulation and function of a non-coding RNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 113, n. 1–4, p. 188–193, 2006.
- GHAFOURI-FARD, S.; ESMAEILI, M.; TAHERI, M. H19 lncRNA: Roles in tumorigenesis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 123, p. 109774, mar. 2020.
- GHAFOURI-FARD, S.; TAHERI, M. Maternally expressed gene 3 (MEG3): A tumor suppressor long non coding RNA. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109129, out. 2019.
- HAN, T. et al. Coordinated silencing of the Sp1-mediated long noncoding RNA MEG3 by EZH2 and HDAC3 as a prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Biology and Medicine**, v. 17, n. 4, p. 953–969, 2020.
- HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

- HANLY, D. J.; ESTELLER, M.; BERDASCO, M. Interplay between long non-coding RNAs and epigenetic machinery: emerging targets in cancer? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1748, p. 20170074, 5 jun. 2018.
- HASHEMI, M. et al. Long non-coding RNA (lncRNA) H19 in human cancer: From proliferation and metastasis to therapy. **Pharmacological Research**, v. 184, p. 106418, out. 2022.
- HE, Y. et al. Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 73282–73295, 22 set. 2017.
- HU, X. et al. HDAC2 inhibits EMT-mediated cancer metastasis by downregulating the long noncoding RNA H19 in colorectal cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 270, dez. 2020.
- HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom www.genenames.org. (acesso em 06/02/2023)
- JELINIC, P.; SHAW, P. Loss of imprinting and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 211, n. 3, p. 261–268, fev. 2007.
- JIN, X. et al. High Expression of LINC01268 is Positively Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression via Regulating MAP3K7. **Oncotargets and Therapy**, v. Volume 14, p. 1753–1769, mar. 2021.
- KIM, K. H.; ROBERTS, C. W. M. Targeting EZH2 in cancer. **Nature Medicine**, v. 22, n. 2, p. 128–134, fev. 2016.
- LEI, L. et al. Genome-wide characterization of lncRNAs in acute myeloid leukemia. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 627–635, 20 jul. 2018.
- LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 10, p. a026831, out. 2016.
- LI, Y.; SYED, J.; SUGIYAMA, H. RNA-DNA Triplex Formation by Long Noncoding RNAs. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 11, p. 1325–1333, nov. 2016.
- LIANG, W.-C. et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 26, p. 22513–22525, 9 set. 2015.
- LIM, Y.W.S. et al. The double-edged sword of H19 lncRNA: Insights into cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 500, p. 253–262, mar. 2021.
- LIU, C. et al. H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. **Tumor Biology**, v. 37, n. 1, p. 263–270, jan. 2016.
- LUE, J. K. et al. Precision Targeting with EZH2 and HDAC Inhibitors in Epigenetically Dysregulated Lymphomas. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 17, p. 5271–5283, 1 set. 2019.
- LUO, M. et al. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. **Cancer Letters**, v. 333, n. 2, p. 213–221, jun. 2013.

- MATJASIC, A. et al. Expression of LOC285758, a potential long non-coding biomarker, is methylation-dependent and correlates with glioma malignancy grade. **Radiology and Oncology**, v. 51, n. 3, p. 331–341, 14 jan. 2017.
- MILLÁN-ZAMBRANO, G. et al. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 9, p. 563–580, set. 2022.
- MONDAL, T. et al. MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- β pathway genes through formation of RNA–DNA triplex structures. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7743, 24 jul. 2015.
- MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA Methylation and Its Basic Function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23–38, jan. 2013.
- MOULTON, T. et al. Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. **Nature Genetics**, v. 7, n. 3, p. 440–447, jul. 1994.
- MÜLLER, V. et al. Interplay of lncRNA H19/miR-675 and lncRNA NEAT1/miR-204 in breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 5, p. 1137–1149, maio 2019.
- NEBBIOSO, A. et al. Cancer epigenetics: Moving forward. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 6, p. e1007362, 7 jun. 2018.
- NUSSBAUM, R.L., MCINNES, R.R., WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, OMIM[®]. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 103280: Date last edited: 24 jun 2016: World Wide Web URL: <https://omim.org/> (acesso em 27 de dezembro de 2022 a).
- ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, OMIM[®]. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 605636: Date last edited: 07 Sept 2022 . World Wide Web URL: <https://omim.org/>(acesso em 27 de dezembro de 2022 b)
- RAMAIAH, M. J.; TANGUTUR, A. D.; MANYAM, R. R. Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy. **Life Sciences**, v. 277, p. 119504, jul. 2021.
- RUIJTER, A. J. M. DE et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, v. 370, n. 3, p. 737–749, 15 mar. 2003.
- WANG, B. et al. The Roles of H19 in Regulating Inflammation and Aging. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 579687, 26 out. 2020.
- YANG, J. et al. LncRNA H19: A novel oncogene in multiple cancers. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 12, p. 3188–3208, 2021.
- YE, M. et al. Downregulation of MEG3 and upregulation of *EZH2* cooperatively promote neuroblastoma progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 26, n. 8, p. 2377–2391, abr. 2022.
- ZHANG, Q. et al. The long noncoding RNA *ROCK1* regulates inflammatory gene expression. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 8, 15 abr. 2019.