

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0619755-8 A2



(22) Data de Depósito: 12/12/2006
(43) Data da Publicação: 18/10/2011
(RPI 2128)

(51) Int.CI.:
C12N 15/11
A61P 21/00

(54) Título: MICRORNAS QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE CÉLULAS MUSCULARES

(30) Prioridade Unionista: 12/12/2005 US 60/749.544

(73) Titular(es): The University Of North Carolina At Chapel Hill

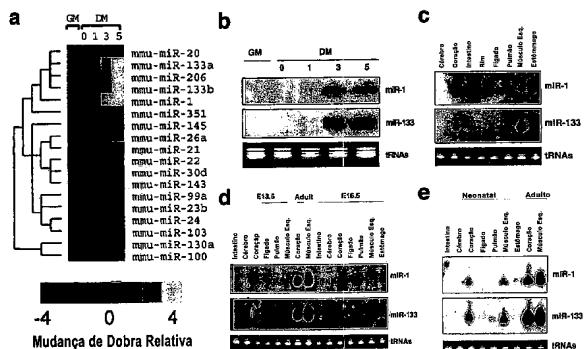
(72) Inventor(es): Da-zhi Wang, Jianfu Chen

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006047255 de
12/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/070483de
21/06/2007

(57) Resumo: MICRORNAS QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE CÉLULAS MUSCULARES. O assunto presentemente divulgado fornece métodos e composições para modular a expressão de gene em miócitos. São também fornecidas células compreendendo as composições do assunto presentemente divulgado.



MICRORNAS QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE
CÉLULAS MUSCULARES

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

O assunto presentemente divulgado reivindica vantagem
5 do Pedido de Patente Provisório U. S. de número 60/749.544,
depositado em 12 de dezembro de 2005, cuja divulgação está
aqui incorporada para referência integralmente.

DECLARAÇÃO DE CONCESSÃO

Este trabalho foi apoiado pela concessão R01-HL075251
10 do National Institutes of Health (Instituto Nacional de
Saúde). Desta forma, o governo dos Estados Unidos possui
certos direitos no assunto presentemente divulgado.

CAMPO TÉCNICO

O assunto presentemente divulgado relaciona-se,
15 geralmente, a métodos e composições para modular a
expressão de gene em um miócito. Mais particularmente, o
assunto presentemente divulgado relaciona-se a métodos de
uso dos micro-RNA's (miRNAs) para modular o nível de
expressão de um gene em um miócito, e a composições que
20 compreendem miRNAs.

FUNDAMENTOS

Compreender os mecanismos moleculares que regulam a
proliferação e diferenciação celular é um tema central da
biologia do desenvolvimento. Os micro-RNAs (miRNAs) são uma
25 classe recentemente descoberta de RNAs reguladores de ~22
nucleotídeos que regulam de forma pós-transcricional a
expressão do gene ^{1,2}. Evidência crescente tem apontado para
a função potencial dos miRNAs em uma variedade de processos
biológicos ³⁻⁸.

30 Entretanto, permanece uma necessidade antiga e

contínua na técnica pela caracterização da função ou funções dos miRNAs nos processos biológicos. O assunto presentemente divulgado direciona-se a esta e a outras necessidades na técnica.

5 **SUMÁRIO**

Este sumário lista várias modalidades do assunto presentemente divulgado, e em muitos casos lista as variações e permutações destas modalidades. Este sumário é meramente exemplar das numerosas e variadas modalidades.

10 Alusão a uma ou mais características representativas de uma dada modalidade é igualmente exemplar. Tal modalidade pode tipicamente existir com ou sem a(s) característica(s) mencionada(s), do mesmo modo, essas características podem ser aplicadas a outras modalidades do assunto presentemente

15 divulgado, se listado neste sumário ou não. Para evitar repetição excessiva, este sumário não lista ou sugere todas as combinações possíveis de tais características.

Em uma modalidade do assunto presentemente divulgado, é fornecido um método para tratar um dano em músculo em um indivíduo. Em algumas modalidades, o método compreende administrar a um local de dano muscular em um indivíduo uma quantidade efetiva de um miRNA ou um vetor codificando o miRNA de um inibidor de miRNA, onde o miRNA é objetivado para um gene em um miócito no local do dano muscular. Em algumas modalidades, o inibidor de miRNA é capaz de hibridizar a um miRNA alvo e em algumas modalidades, o miRNA alvo é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145. Em algumas modalidades particulares, um miRNA-133 e um inibidor de miRNA-1 são

administrados em combinação ao local de dano muscular em um momento e um miRNA-1 e um inibidor de miRNA-133 são administrados em combinação ao local de dano muscular em um segundo momento para, deste modo, tratar o dano muscular.

5 Em algumas modalidades, o dano muscular resulta de um trauma muscular mecânico, uma doença degenerativa muscular, um dano cardíaco, ou uma combinação deste. Em algumas modalidades, o indivíduo é um mamífero.

Em uma outra modalidade do assunto presentemente divulgado, é fornecido um método para modular a diferenciação e proliferação do miócito ou ambas. Em algumas modalidades, o método compreende contatar um miócito com um miRNA ou um vetor codificando o miRNA objetivado a um gene no miócito que pode modular a diferenciação e proliferação do miócito ou ambas. Em 15 algumas modalidades, a modulação é inibidora e em algumas modalidades, o miRNA inibe a tradução do gene.

Em ainda uma outra modalidade do assunto presentemente divulgado, é fornecido um método para modular a expressão de um gene em um miócito. Em algumas modalidades, o método compreende contatar um miócito com um miRNA ou um vetor codificando o miRNA objetivado a um gene no miócito. Em algumas modalidades, a modulação é inibidora e em algumas modalidades, o miRNA inibe a tradução do gene.

25 Em uma modalidade adicional do assunto presentemente divulgado, é fornecido um método para inibir a expressão de um gene em um miócito. Em algumas modalidades, o método compreende transformar o miócito com um vetor que codifica uma molécula de miRNA, onde a molécula de miRNA compreende 30 uma seqüência de nucleotídeo pelo menos 70% idêntica a uma

subseqüência de 17-24 nucleotídeos contígua, exceto que o miRNA irá compreender um uracil no lugar de quaisquer timidinas que serão encontradas no gene. Em algumas modalidades, o miRNA inibe a tradução do gene.

5 Em algumas modalidades dos métodos aqui divulgados, o miRNA empregado compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de qualquer Id. de Seq. nºs:1-11 e seqüências pelo menos 70% idênticas a qualquer uma das Id. de Seq. nºs:1-11. Em algumas
10 modalidades, o miRNA é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145. Também, em algumas modalidades, o miRNA é dirigido para uma região não traduzida 3' do gene.

15 Também, em algumas modalidades dos métodos, o gene objetivado pelo miRNA é selecionado a partir do grupo consistindo de um gene de diferenciação de miócito (por exemplo, um gene codificando um polipeptídeo histona desacetilase (HDAC4) ou uma proteína do receptor de
20 hormônio da tireóide 240 (TRAP240)), um gene de proliferação de miócito (por exemplo, um gene codificando um polipeptídeo de fator responsivo a soro (SRF)) e uma proteína relacionada a hormônio (por exemplo, um gene que codifica a proteína associada ao hormônio da tireóide 1
25 (Thrap1)).

Em uma outra modalidade do assunto presentemente divulgado, um vetor que codifica um miRNA é fornecido. Em algumas modalidades, o vetor compreende um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico
30 codificando a molécula de miRNA, e uma seqüência de

terminação de transcrição. Também, em algumas modalidades, o vetor é incorporado em um kit também compreendendo pelo menos um reagente para introduzir o vetor em um miócito. O kit, em algumas modalidades, também compreende instruções para introduzir o vetor em um miócito.

Conseqüentemente, é um objetivo do assunto presentemente divulgado fornecer um método para manipular a expressão do gene em um miócito usando uma abordagem mediada por miRNA. Este objetivo é alcançado totalmente ou 10 em parte pelo assunto presentemente divulgado.

Um objetivo do assunto presentemente divulgado tendo sido declarado acima, outros objetivos e vantagens tornar-se-ão aparente àqueles habilitados na técnica após um estudo da seguinte descrição do assunto presente divulgado 15 e exemplos não limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1a-1e descrevem dados para expressão do miR-1 e miR-133 em músculo cardíaco e esquelético durante o desenvolvimento.

20 A Figura 1a mostra os dados de expressão de arranjos de miRNA dos mioblastos C2C12 em cultura em meio de crescimento (GM) ou em meio de diferenciação (DM) para 0, 1, 3 e 5 dias, respectivamente. Os dados de log normalizados (base 2) foram hierarquicamente aglomerados 25 pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. A faixa de sinal era de -4 vezes a + 4 vezes. Amarelo denota alta expressão e azul denota baixa expressão, em relação ao mediano e apenas os nós de miRNA que são regulados em meio de diferenciação são mostrados.

30 A Figura 1b descreve uma análise de Northern blot da

expressão de miR-1 e miR-133 usando-se o RNA total isolado de mioblastos C2C12 em cultura em GM ou em DM para 0, 1, 3 e 5 dias, respectivamente. TRNAs foram usados como um controle de carga.

5 A Figura 1c descreve uma análise de Northern blot da expressão de miR-1 e miR-133 em tecidos de camundongo adulto.

10 A Figura 1d descreve uma análise de Northern blot da expressão de miR-1 e miR-133 em tecidos de camundongo de dia embriônico 13,5 (E13,5) e 16,5 (E16,5).

15 A Figura 1e descreve uma análise de Northern blot da expressão de miR-1 e miR-133 em tecidos de camundongo neonatal. A mesma quantidade de RNAs total de músculo do coração e esquelético adulto foi carregada em manchas para servir como uma comparação com RNA embriônico e neonatal (Figuras 1d e 1e).

20 As Figuras 2a-2j descreve dados que mostram a regulação da proliferação e diferenciação de mioblasto por miR-1 e miR-133. Os mioblastos C2C12 em cultura em meio de crescimento (GM) foram eletroporados com dúplices de miRNA de filamento duplo para miR-1, miR-133 e GFP como um controle.

25 As Figuras 2a-2e mostram resultados de experimento onde as células foram continuamente colocadas em cultura em GM por 24 horas após a transfecção, então transferidas ao meio de diferenciação (DM) por 12 horas antes da mancha imunohistoquímica para miogenina (Figura 2a) ou 36 horas antes da mancha imunohistoquímica para MHC (Figura 2b). Os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram eletroporados com 30 dúplices de miRNA de filamento duplo para miR-1, miR-133

(ou seus mutantes conforme indicado), ou miR-208 e GFP como controle e colocados em cultura por 24 horas antes: Northern blot usando o anticorpo indicado (Figura 2c), as células foram transferidas a DM por 24 horas e RT-PCR para os genes indicados foi executado (Figura 2d), ou células foram transferidas ao DM por 24 horas e Northern blot usando-se os anticorpos indicados (Figura 2e).

As Figuras 2f-2h mostram os resultados de experimentos onde os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram eletroporados com os inibidores de oligonucleotídeo anti-sentido 2'-o-metil para miR-1, miR-133 ou miR-208 e GFP como controles. As células foram colocadas em cultura em GM por 24 horas após a transfecção e então transferidas em DM por: 12 horas antes da mancha imunohistoquímica para fosfo-histona H3 (Figura 2f); 24 horas antes de executar RT-PCR para os genes indicados (Figura 2g) ou por 24 horas antes de Northern blot usando-se os anticorpos indicados (Figura 2h).

As Figuras 2i e 2j mostram resultados de experimentos onde os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram eletroporados com os dúplices de miRNA ou com os inibidores de oligonucleotídeo anti-sentido 2'-o-metil conforme indicado. As células foram colocadas em cultura em GM por 24 horas após a transfecção, então foram transferidas em DM por 12 horas antes da mancha imunohistoquímica para miogenina (Figura 2i) ou fosfo-histona H3 (Figura 2j). Células com manchas positivas foram contadas e os dados são apresentados como o nível de expressão relativo ao controle de GFP (100%).

As Figuras 3a-3k descrevem dados mostrando o controle

de desenvolvimento de músculo cardíaco e esquelético pelo miR-1 e miR-133 *in vivo*.

As Figuras 3a-3h mostram dados de experimentos do embrião *Xenopus*. Os embriões *Xenopus* derivados de embriões não injetados (Figuras 3a e 3b), GFP RNA controle-injetado (Figures 3c e 3d), miR-1-injetado (Figures 3e e 3f), ou miR-133-injetado (Figures 3g e 3h) manchados com anti-tropomiosina e mostraram no estágio 32 sob campo luminoso (Figures 3a, 3c, 3e e 3g) ou fluorescência (Figures 3b, 3d, 3f e 3h). Note a ausência de mancha para o tecido do coração (Figura 3b e 3d, setas H) e a ruptura de somito segmentado (Figuras 3f e 3h, setas S).

As Figuras 3i-3k mostram dados de seções transversais do embrião *Xenopus*. As seções transversais dos embriões *Xenopus* correspondem à posição do coração no estágio 32 de embriões não injetados (Figura 3i), miR-1 injetados (Figura 3j) ou miR-133 injetado (Figura 3k) corados com anti-tropomiosina para visualizar os monitos (setas S) e tecido cardíaco (setas H) e anti-fosfohistona H3 (vermelho) para visualizar as células na fase S. Cada conjunto de injeções foi conduzido pelo menos duas vezes independentemente, e o fenótipo foi observado em pelo menos 90% de um mínimo de 50 embriões registrados por mancha imunohistoquímica integral.

As Figuras 4a-4i descrevem os dados que mostram a identificação de genes alvo miR-1 e miR-133 no músculo esquelético.

A Figura 4a descreve os dados que mostram a repressão de SRF e HDAC4 das UTRs 3' por miR-133 e miR-1. Os repórteres de luciferase contendo ou sítios complementares

de miR-133 de SRF da UTR 3' de camundongo (SRF-3'-UTR), sítios complementares de miR-1 de HDAC4 da UTR 3' de camundongo (HDAC4-3'-UTR) ou seqüências anti-sentido perfeitas de miR-133 (miR-133-luc) ou miR-1 (miR-1-luc) foram co-transfetados com os vetores de expressão de miRNA indicados ou seus mutantes. A atividade de luciferase foi determinada 48 horas após a transfecção. Os dados representam o desvio padrão \pm médio de pelo menos três experimentos independentes em duplicata (*P < 0,05).

A Figura 4b descreve os dados que mostram os resultados de repórteres de luciferase SRF-3'-UTR, HDAC4-3'-UTR e MCK-luc transfetados em mioblastos C2C12. As células foram mantidas em GM por 24 horas (GM) ou transferidas em DM por 1 dia (DM1) ou três dias (DM3) antes da atividade da luciferase ser determinada.

As Figuras 4c-4e descrevem dados mostrando os resultados de mioblastos C2C12 em cultura com GM e foram eletroporados com os dúplices de miRNA de filamento duplo indicados (ou seus mutantes) ou miR-208 e GFP como controles. As células foram colocadas em cultura em GM por 24 horas após a transfecção inicial: Northern blot usando anticorpos anti-SRF e anti-HDAC4 (Figura 4c), as células foram transferidas a DM por 24 horas e RT-PCR para os genes indicados foi executado (Figura 4d); as células foram transferidas em DM por 24 horas e Northern blot usando-se os anticorpos indicados. Os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram eletroporados com os inibidores de oligonucleotídeo anti-sentido 2'-O-metil indicado.

As Figuras 4f e 4g descrevem os dados mostrando os resultados de células em cultura com GM por 24 horas após a

transfecção, então foram transferidas em DM por 24 horas antes: RT-PCR para os genes indicados foi executado (Figura 4f), e a Northern blot usando-se os anticorpos indicados (Figura 4g).

5 A Figura 4h descreve dados mostrando os resultados de mioblastos C2C12 em cultura com GM e foram eletroporados com os dúplices de miRNA de filamento duplo indicados e/ou a expressão de plasmídeos para SRF ou HDAC4, conforme indicado. As células foram colocadas em cultura em GM por
10 24 horas após a transfecção. A Northern blot foi executada 24 horas após a transferência para DM usando-se os anticorpos indicados.

15 A Figura 4i descreve os dados mostrando os resultados de mioblastos C2C12 em cultura com GM ou DM para os dias 0, 1, 3 ou 5. A Northern blot foi executada usando-se os anticorpos indicados.

A Figura 5 mostra um modelo de regulação mediada por miR-1 e miR-133 de proliferação e diferenciação de músculo esquelético.

20 A Figura 6 mostra os dados de análise dos dados de expressão de arranjos de miRNA dos mioblastos C2C12 em cultura em meio de crescimento (GM) ou em meio de diferenciação (DM) para 0, 1, 3 e 5 dias, respectivamente. Os dados de log normalizados (base 2) foram
25 hierarquicamente aglomerados pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. A faixa de sinal era de -4 vezes a + 4 vezes. Sombreamento claro denota alta expressão e sombreamento escuro denota baixa expressão, em relação ao valor médio.

30 As Figuras 7a-7d mostram dados de expressão de miR-1,

miR-133 e genes marcadores de diferenciação de músculo esquelético em células C2C12.

As Figuras 7a e 7b mostram uma análise de Northern blot da expressão de miR-1 (Figura 7a) e miR-133 (Figura 7b) usando-se o RNA total isolado de mioblastos C2C12 em cultura em GM ou em meio de diferenciação (DM) para 0, 1, 3 e 5 dias, respectivamente. Ambos os miRNAs maduros e seus precursores (Pre) são indicados. tRNAs foram usados como um controle de carregamento.

A Figura 7c mostra a análise por RT-PCR semiquantitativa de genes marcadores de diferenciação de músculo esquelético. GAPDH foi usado como um controle para carregamento igual.

A Figura 7d mostra a expressão de marcadores de diferenciação de músculo esquelético. Os mioblastos C2C12 foram colocados em cultura em meio de crescimento (GM) ou em meio de diferenciação (DM) para 0, 1, 3 e 5 dias, e Northern blot foram executadas com extratos de célula usando-se os anticorpos indicados. β -tubulina serve como um controle de carregamento.

As Figuras 8a-8f mostram dados de expressão de miR-1 e miR-133 em músculo cardíaco e esquelético em camundongo adulto durante o desenvolvimento. A análise de Northern blot é mostrada para a expressão do miR-1 (Figura 8a) e miR-133 (Figura 8d) em tecidos de camundongo adulto. A análise de Northern blot é mostrada para a expressão do miR-1 (Figura 8b) e miR-133 (Figura 8e) em tecidos de camundongo do dia 13.5 (E13.5) e 16.5 (E16.5) embriônico. A mesma quantidade de RNA total de músculo do coração e esquelético adulto foi também carregada na mancha para

servir como uma comparação. A análise de Northern blot é mostrada para a expressão do miR-1 (Figura 8c) e miR-133 (Figura 8f) em tecidos de camundongo neonatal. A mesma quantidade de RNA total de músculo do coração e esquelético adulto foi também carregada na mancha para servir como uma comparação. Ambos os miRNAs maduros e seus precursores (Pre) são indicados. tRNAs foram usados como um controle de carregamento.

As Figuras 9a-9e mostram dados para expressão de transcrições primárias de miR-1 e miR-133 em músculo cardíaco e esquelético.

A Figura 9a é um diagrama mostrando os genes de miR-1 e miR-133 agrupados nos cromossomos de camundongo 2 e 18. Os marcadores usados para as Northern blot nas Figuras 9b-9e são indicados.

As Figuras 9b-9e mostram dados de análise de Northern blot da expressão de transcrições primárias para miR-1 (Figuras 9c e 9e) e miR-133 (Figuras 9b e 9d) do cromossomo 2 (Figuras 9d e 9e) e cromossomo 18 (Figuras 9b e 9c). 20 μ g do RNA total dos tecidos de camundongo adulto indicado foram usados.

As Figuras 10a-10g fornecem dados que mostram o melhorador de miR-1 e miR-133 melhorador de miR-133 pode direcionar a expressão do gene repórter em músculo cardíaco e esquelético.

A Figura 10a mostra dos dados de *Xenopus laevis* transgênico para seqüência genômico de miR-1 e miR-133 de camundongo ligada ao dsRed ilustrando expressão de somito (S, setas) no estágio 28.

30 A Figura 10b mostra *Xenopus laevis* transgênico (Tg)

portando um transgene contendo miR-1 e miR-133 no estágio 46 (embrião inferior) e controle negativo (não transgênico, Ct, embrião superior) sob campo luminoso.

5 A Figura 10c é uma fotografia do mesmo embrião conforme mostrado na Figura 10b sob fluorescência.

A Figura 10d é uma fotomicrografia com magnificação de potência alta do embrião transgênico na Figura 10b sob campo luminoso mostrando a expressão do transgene no coração (H, setas) e arcos branquiais (BA, setas).

10 A Figura 10e é uma fotomicrografia com magnificação de potência alta do embrião transgênico na Figura 10b sob campo luminoso mostrando a expressão do transgene no coração (H, setas) e arcos branquiais (BA, setas).

15 A Figura 10f é uma fotomicrografia com magnificação de potência alta para um embrião transgênico de estágio 46 mostrando a expressão do transgene nos somitos (S, setas).

A Figura 10g mostra as seqüências de DNA genômicas (Id. de Seq. n°:82) de melhorador de miR-1/133 do cromossomo 2 de camundongo. Um suposto sítio de MEF2 e box 20 CarG estão marcados, e as mutações introduzidas nestes sítios são indicadas.

As Figuras 11a-11h mostram dados que demonstram a repressão de um sensor de miR-133 por miR-133 em células C2C12. Células C2C12 expressando de maneira estável o 25 sensor de miR-133 foram transfectadas com vetores de expressão para GFP (controle), miR-133 tipo selvagem (miR-133), miR-133 mutante (miR-133mut) em que a seqüência "semente" foi mudada, ou uma combinação do vetor de expressão de miR-133 e oligos anti-sentido 2'-o-metil (miR-30 133 + 2'-o-metil). As células foram transfectadas em meio

de diferenciação por 12 horas e as imagens foram obtidas usando-se fase/contraste (P/C) (Figuras 11a-11d) ou fluorescência para mostrar expressão do gene repórter dsRed (Figuras 11e-11h). As células de cada condição foram 5 colhidas e a expressão do gene repórter dsRed foi quantificada usando-se análise de FACS (painéis inferiores). A área aberta sob a linha denota a autofluorescência da célula e a área hachurada sob a linha indica a expressão de dsRed.

10 A Figura 12 mostra seqüências dos sítios alvo de miR-1 e miR-133 na UTR 3' de genes HDAC4 e SRF. Painel superior: seqüências de UTR 3' de HDAC4 de espécie vertebrada humana conservada (Id. de Seq. nº:24), chimpanzé (Id. de Seq. nº:25), camundongo (Id. de Seq. nº:26), rato (Id. de Seq. nº:27), cachorro (Id. de Seq. nº:28) e galinha (Id. de Seq. nº:29), e seu alinhamento com miR-1 (Id. de Seq. nº:1) e miR-206 (Id. de Seq. nº:3). Painel inferior: seqüências de UTR 3' de SRF de humano (Id. de Seq. nºs:30 e 31) e rato (Id. de Seq. nºs:32 e 33) e seu alinhamento com miR-133. 15 20 Seqüências de nucleotídeo conservadas estão listadas em caixa alta.

A Figura 13 descreve um modelo de biogênese de miRNA. (A) pri-miRNAs são transcritos no núcleo pela RNA polimerase II e (B) são processados por Drosha a pre-miRNAs 25 contendo uma haste-alça. (C) Exportina-5 reconhece a projeção 3' esquerda por Drosha e exporta os pre-miRNAs para dentro do citoplasma, onde (D) Dicer cliva os pre-miRNAs abaixo da haste-alça para produzir um díplice de ~22 nucleotídeos. (E) Um único filamento é incorporado no RISC, 30 o qual (F) reconhece as seqüências complementares dentro

das regiões 3' não traduzidas de mRNAs e regula a expressão de gene por supressão traducional ou clivagem de mRNA.

As Figuras 14a-14c descrevem o genoma de miR-208. A Figura 14a mostra que uma seqüência de miR-208 precursora de camundongo (Id. de Seq. nº:34) é dobrado usando-se mFold e com a seqüência de miR-208 madura (Id. de Seq. nº:4) à direita. A Figura 14b mostra um alinhamento de seqüência de seqüências de miR-208 precursoras de camundongo (Id. de Seq. nº:35), de rato (Id. de Seq. nº:36) e de humano (Id. de Seq. nº:37). A seqüência de miR-208 madura é mostrada no lado superior direito da Figura 14A. Os asteriscos denotam perfeita conservação de seqüência. A Figura 14c mostra que miR-208 origina-se de um íntron de alfa-MHC. O miR-208 de camundongo está localizado dentro de 29 íntron de α -MHC. Similarmente, o miR-208 humano está localizado dentro de 28 íntron de α -MHC.

As Figuras 15a-15c mostram os dados que demonstram que miR-208 é regulado de maneira desenvolvida. RNA total de diferentes tecidos de camundongo foi corado e marcado com um oligodeoxinucleotídeo radiomarcado na posição 5' complementar a miR-208. Carregamento igual do RNA total no gel foi verificado por coloração de brometo de etídio antes da transferência.

A Figura 15a mostra os dados que demonstram que miR-208 é cadíaco-específico. O sinal superior é a transcrição pre-miR-208, enquanto o sinal inferior é a forma de 22 nt madura.

A Figura 15b mostra os dados da expressão de miR-208 em tecidos de camundongo neonatal em relação ao músculo do coração e esquelético adulto.

A Figura 15c mostra os dados da expressão de miR-208 em vários tecidos de camundongo E13.5 e E16.5 em relação ao músculo do coração e esquelético adulto.

As Figuras 16a e 16b mostram dados da expressão de 5 miR-208 ectópica em cardiomiócitos. A Figura 16^a mostra uma Northern blot preparada a partir de cardiomiócitos infectados com Ad-GFP ou Ad-208 marcado usando-se oligonucleotídeo anti-sentido de miR-208 radiomarcado. A Figura 16b mostra micrografias epifluorescentes de 10 cardiomiócitos infectados em MOIs 1 e 10.

A Figura 17 mostra um diagrama de um sistema transgênico condicional divulgado aqui. Duas linhas independentes de linhas transgênicas de camundongos são utilizadas: uma expressando a produto de fusão tTA-VP16 sob 15 o controle, o promotor α -MHC e uma segunda linha abrigando o transgene miR-208 sob o controle de um promotor mínimo do CMV. O promotor mínimo do CMV possui várias repetições do operon da tetraciclina (tetO) localizado diretamente acima. As duas linhas são geradas juntas e produzidas, assumindo 20 um padrão de herança Mendeliana, 1 em 4 camundongos são duplo transgênicos. Se a doxiciclina (DOX) é administrada a um camundongo duplo transgênico, a proteína tTA-VP16 é ligada por DOX e a transcrição do miR-208 é inibida. Se a DOX está ausente, a proteína tTA liga-se ao concatâmero 25 tetO que permite que o domínio de VP16 induza a transcrição de miR-208 a partir do promotor mínimo do CMV. A expressão Fórmula gene alvo cardíaco-específico pode ser ligada ou desligada pela adição ou retirada de DOX. Adapatado de James e outros, Am J Physiol 273: H2105-H2118, aqui 30 incorporado por referência).

As Figuras 18A-18C são gráficos e um alinhamento de seqüência mostrando os dados que demonstram os miR-208 alveja o Thrapl. Os repórteres de luciferase com uma seqüência de miR-208 anti-sentido (sensor de miR-208) ou 5 UTRs 3' de Hemoglobina-β (Hbb) e hormônio da tireoide associado à proteína 1 (Thrap1) (Figura 18A) ou quatro cópias de sítios de ligação de miR-208 suposto de Thrap 1 da UTR 3' (Figura 18B) foram fixados diretamente a jusante 10 do gene luciferase e foram co-transfetados com quantidades crescentes de miR208 pCDNA3.1 em células 293T. O sensor de miR208, os repórteres de Thrapl e 4x Thrapl eram ambos reprimidos de uma maneira dependente da dose, enquanto o CSNK de controle negativo não foi mudado de forma 15 significativa. A Figura 18C mostra a seqüência de miR-208 madura (Id. de Seq. nº:4) ligado ao sítio alvo de miR-208 previsto dentro da UTR 3' do gene Thrap1 de humano (Id. de Seq. nº:38) e camundongo (Id. de Seq. nº:39). Note a 20 região de semente alvo perfeitamente conservada dentro de ambos os alvos previstos (o 2º e 8º nucleotídeos na extremidade 5' de miR-208).

A Figura 19 mostra um modelo de regulação de miR-208 da troca de isoforma de cadeia pesada de miosina cardíaca. Os receptores nucleares de hormônio da tireoide (TR) ligam- 25 se às seqüências dos Elementos Receptores da Tireoide (TREs) dentro dos promotores dos genes α-MHC e β-MHC. O promotor de α-MHC contém uma ligação de TRE-completa por dois TRs, enquanto que o β-MHC possui sua ligação por um único TR em uma metade de TRE. Os monômeros de TR e dímeros 30 podem ambos heterodimerizar com o complexo de TRAP, um cofator de TR. O hormônio da tireoide (T_3) liga TRs e inibe

a transcrição de β -MHC enquanto induz a expressão de α -MHC. MiR-208 é concorrentemente expressado com uma proteína α -MHC e é previsto para regular a tradução de Thrap1, a maior subunidade do complexo de TRAP. Acredita-se que o miR-208 é 5 um componente de um ciclo de reação negativa que regula a expressão da isoforma de cadeia pesada de miosina cardíaca através da inibição da sinalização do T₃.

As Figuras 20A e 20B mostram dados da análise de arranjo de miRNA de músculo esquelético danificado 10 /regenerado. A Figura 20A mostra dos dados de miRNAs que são regulados para baixo em músculo danificado. A Figura 20B mostra dos dados de miRNAs que são regulados para cima em músculo danificado.

A Figura 21 lista as seqüências exemplares para Id. de 15 Seq. n°^s:6-9. 6-9.

A Figura 22 mostra os dados que demonstram a expressão de miR-1 na diferenciação de células satélites de músculo esquelético usando um sensor de miRNA. As células satélites expressando estavelmente o sensor de miRNA (dsRed::miR-1) 20 ou o sensor de mutante (dsRed::miR-1-Muteína) foram induzidas para diferenciar através de transferência em meio de diferenciação, em que bFGF foi removido, e imagens foram obtidas usando-se fluorescência para mostrar a expressão do gene repórter dsRed (dsRed::miR-1) ou da cadeia pesada de 25 miosina do gene marcador de diferenciação do músculo (MF20). Baixa expressão de dsRed nas células de diferenciação expressada do sensor indica a expressão de miR-1 naquelas células. DAPI mancha o núcleo celular.

As Figuras 23A e 23B mostram dados que demonstram o 30 estabelecimento do sistema de expressão de miR-1/206

(Figura 23^A) e sensor de miR-1/206 (Figura 23B). A Figura 23A mostra um diagrama da construção da expressão para a expressão do miR-1/206 e proteína GFP (Figura 23A, painel esquerdo). A análise de Northern blot mostra a expressão de 5 miR-1 (Figura 23a, painel direito). A Figura 23B demonstra a repressão de um sensor de miR-1/206 por miR-1 em 293 células. 293 células expressando de forma estável o sensor de miR-1/206 foram transfectadas com vetor de expressão para miR-1/206 (SDSA::miR-1) e as imagens foram obtidas 10 usando-se contraste de fase (293 células) ou fluorescência para mostrar a expressão no gene repórter dsRed (dsRed::miR-1) ou miRNA::GFP (SDSA::miR-1) ou sobreposição de ambos (sobreposição). Note que a expressão do sensor de dsRed e miR-1 é exclusiva, indicando que miR-1 reprime 15 especificamente a expressão do repórter do sensor.

As Figuras 24A e 24B descrevem os dados mostrando a repressão de UTRs 3' de Pax7 e BDNF por miR-1/206. A Figura 24A é um alinhamento de seqüência de UTR de Pax7 de camundongo (Id. de Seq. n°:40-41) com miR-1 (Id. de Seq. n°:1) e miR-206 (Id. de Seq. n°:3). A Figura 24B divulga gráficos mostrando que os repórteres de luciferase contendo ou UTR 3' de Pax7 de camundongo ((Luc-Pax7::UTR) ou seu mutante (Luc-Pax7::UTR-M) ou UTR 3' de BDNF (Luc-BDNF::UTR) ou seu mutante (Luc-BDNF::UTR-M) foram cotransfetados com 20 os vetores de expressão de miRNA indicados. A atividade de luciferase foi determinada 48 horas após a transfeção. Os dados representam o desvio padrão ± médio de pelo menos três experimentos independentes em duplicata. Note que miR-1/206 reprime fortemente a expressão de repórteres de UTR 25 3' de Pax7 e BDNF. 30

As Figuras 25A-25C mostram que a miR-1/206 inibe a expressão de Pax7, mas não de Pax3, em células satélites. A Figura 25A é uma análise de Northern blot da expressão de Pax7, demonstrando que os níveis de transcrições de mRNAs de Pax7 não são inibidos por UTRs 3'. A Figura 25B é uma análise de Northern blot demonstrando que o nível de proteína de Pax7, mas não de Pax3, é menor em células satélites superexpressadas de miR-1/206. A Figura 25C mostra imagens obtidas usando-se contraste de fase (painéis fase/contraste) ou fluorescência para mostrar a expressão das proteínas Pax7 ou Pax3 (painéis de Pax7 e Pax3) ou miRNA::GFP (painéis SDSA::miR-1/206) ou sobreposição (painéis sobrepostos) em células satélites de músculo esquelético. Note que a expressão de Pax7, mas não aquela de Pax3, é inibida por miR-1/206.

A Figura 26 mostra que a miR-1/206 inibe a expressão de BDNF, mas não de GDNF, em células satélites. As imagens foram obtidas usando-se contraste de fase (painéis fase/contraste) ou fluorescência para mostrar a expressão das proteínas BDNF ou GDNF (painéis de BDNF e GDNF) ou miRNA::GFP (painéis SDSA::miR-1/206) ou sobreposição (painéis sobrepostos) em células satélites de músculo esquelético. Note que a expressão de BDNF, mas não de GDNF, é inibida por miR-1/206.

As Figuras 27A e 27B mostram que miR-1/206 inibe a proliferação de célula satélite. A Figura 27A mostra as imagens de célula satélite obtidas usando-se contraste de fase ou fluorescência para mostrar o índice de proliferação celular conforme sinalizado por BrdU (painéis de BrdU) ou miRNA::GFP (painel de SDSA::miR-1+206). Menos células

positivas para BrdU foram observadas em células satélites superexpressadas de miR-1/206. A Figura 27B é um gráfico mostrando os resultados de experimentos onde as células manchadas positivas para BrdU foram contadas em controle e 5 células satélites superexpressadas de miR-1/206 e os dados são apresentados como a relação de células positivas para BrdU contra as células totais.

As Figuras 28A e 28B mostram que miR-1/206 melhora a diferenciação de célula satélite. As Figuras 28A e 28B 10 mostram os resultados de experimentos onde as células satélites superexpressam de forma estável ou miR-1/206 (SDSA-miR-1+206) ou GFP (controle), então são transferidas ao meio de diferenciação, onde bFGF foi removido, por 24 horas (Figura 28A) ou 48 horas (Figura 28B) antes da mancha 15 imunohistoquímica para cadeia pesada de miosina (MyHC). Note a mancha de MyHC melhorada em células superexpressadas de miR-1/206. DAPI marca o núcleo celular.

A Figura 29 é um gráfico mostrando os resultado de experimentos onde a superexpressão de miR-1/206 melhora a 20 cinética de diferenciação de célula satélite. As células satélites ou superexpressam miR-1/206 (■) ou GFP (controle, ▲) onde foram postas em cultura em meio de crescimento ou transferidas ao meio de diferenciação, onde bFGF foi removido, em diferentes momentos (0, 12, 24, 36 e 48 horas) 25 e as células positivas para cadeia pesada de miosina (MyHC) foram pontuados. Os resultados foram apresentados como relações de células positivas para MyHC contra células totais.

A Figura 30 mostra um modelo para miR-1/206 na 30 regulação da proliferação e diferenciação de célula

satélite de músculo esquelético.

BREVE DESCRIÇÃO DAS TABELAS

A Tabela 1 é uma lista de abreviações de nucleotídeo de uma letra aqui usada.

5 A Tabela 2 mostra o efeito na proliferação e diferenciação miogênica por miR-1 e miR-133. Os mioblastos C2C12 em cultura em meio de crescimento (GM) foram eletroporados com dúplices de miRNA de filamento duplo ou oligos anti-sentido de 2'-o-metil para miR-1, miR-133 ou 10 GFP como um controle negativo. 36 horas mais tarde, GM foi substituído com meio de diferenciação (DM) por 8, 12 e 24 horas e as células foram fixadas para análise de imunohistoquímica usando-se anticorpos contra miogenina, fosfo-histona H3 e cadeia pesada de miosina (MHC). As 15 células positivas foram contadas a partir de 5.000 células coradas com DAPI de um campo aleatoriamente escolhido. Os ensaios foram executados três vezes independentemente com resultados comparáveis.

20 A Tabela 3 lista os nomes e seqüências dos oligonucleotídeos aqui divulgados.

BREVE DESCRIÇÃO DA LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

A Listagem de Seqüência divulga, entre outras coisas, as seqüências de vários miRNAs, especificamente miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-25 128, miR-143 e miR-145 (Id. de Seq. nºs: 1-11, respectivamente) assim como as seqüências de polinucleotídeo adicionais aqui divulgadas. Em alguns casos as seqüências de RNA são apresentadas na forma de DNA (isto é, com timidina presente em vez de uracila), é compreendido 30 que estas seqüências são também objetivadas para

corresponder às transcrições de RNA destas seqüências de DNA (isto é, com cada T substituído por um U).

DESCRICAÇÃO DETALHADA

Está aqui divulgado a determinação que miRNAs particulares podem modular a expressão de genes específicos em miócitos que afetam a diferenciação e/ou proliferação dos miócitos. Esta descoberta possui aplicações terapêuticas, conforme aqui divulgado, incluindo o tratamento de dano muscular possuindo uma ampla variedade de causas, tais como, por exemplo, trauma muscular mecânico, doenças degenerativas musculares e ataques cardíacos. A aplicação das descobertas divulgadas aqui também inclui modular a expressão de um ou mais genes específicos em miócitos utilizando miRNAs possuindo especificidade para os genes, e em seguida, modular a funcionalidade dos miócitos, tal como, por exemplo, diferenciação e/ou proliferação dos miócitos. miRNAs não limitantes exemplares úteis com o assunto presentemente divulgado incluem miRNA-1, miRNA-133, miRNA-206 e miRNA-208.

Por exemplo, miRNA-1 (miR-1) e miRNA-133 (miR-133), que estão agrupados no mesmo loci cromossomial, são transcritos juntos de uma maneira tecido-específica durante o desenvolvimento. miR-1 e miR-133, cada um, executa uma função diferente na modulação da proliferação e diferenciação de músculo esquelético em mioblastos em cultura *in vitro* e em embrião *Xenopus in vivo*. miR-1 promove a miogênese tendo como alvo a histona desacetilase 4 (HDAC4), um repressor transcripcional da expressão do gene do músculo. Contrariamente, miR-133 melhora a proliferação

de mioblasto reprimindo o fator de resposta do soro (SRF). Os resultados revelam, para o primeiro momento, que dois miRNAs maduros, derivados do mesmo policístron de miRNA e transcrito junto, pode executar funções biológicas 5 distintas. A presente divulgação fornece desta forma mecanismos moleculares em que os miRNAs participam em circuitos transcricionais que controlam a expressão do gene do músculo e o desenvolvimento embriônico.

Um outro exemplo não limitante, a expressão de *Thrap1* 10 é provavelmente regulada por miR-208. A UTR 3' de *Thrap1* contém dois sítios de ligação de miR-208 previstos (Figura 18). Os dois alvos estão localizados ~80 bp a jusante do códon de parada de *Thrap1* e estão separados entre si por apenas ~50 bp. Ambos os alvos são perfeitamente 15 complementares com a região de semente de miR-208. O gene *Thrap1* codifica para TRAP240, uma subunidade de 240 kd do complexo de TRAP (proteína receptora de hormônio da tireoíde) que é ubiqüitariamente expressado. TRAP é um complexo de proteína de multisubunidade que é um coativador 20 para receptores nucleares e os membros da família de TRAP são importantes para o desenvolvimento adequado. Assim, miR-208 pode regular a produção de TRAP240 e promovem a diferenciação de cardiomiócito dependente de hormônio.

1. Considerações Gerais

25 Descobriu-se que primeiro miRNA descrito, o gene lin-4, que controla o tempo de desenvolvimento da larva *C. elegans*, produz de forma inesperada um RNA não codificador 4 longo de 21 nucleotídeos que suprime a expressão da proteína *lin-14* sem afetar de forma visível os níveis de 30 mRNA *lin-14*. Descobriu-se que este pequeno RNA tem como

alvo sítios complementares na região não traduzida 3' (UTR 3') de *lin-14*^{49,50}. Embora este fenômeno tenha sido inicialmente tratado como uma singularidade genética e efetivamente ignorada, é agora calculado que existem 5 centenas de pequenos RNAs, agora chamados de miRNAs, similares a *lin-4* nos genomas de espécies divergentes e regulam a tradução de mRNAs complementares. Embora relatos recentes sugiram funções para alguns miRNAs nos processos biológicos notavelmente diversos, a maioria permanece 10 amplamente não caracterizada.

1A. Biogênese & Mecanismo de miRNA

Um modelo geral para a biogênese de miRNA é descrito na Figura 13. miRNAs maduros são ~22 nucleotídeos (nt) de comprimento que foram processados a partir de transcrições 15 mais longas^{51,52}. miRNAs primários (pri-miRNAs) podem ser transcritos por RNA Pol II como unidades transcripcionais independentes ou podem originar-se de ítrons unidos de genes hospedeiros⁵³. A rota de processamento de miRNA pode começar com a clivagem nuclear de pri-miRNA por 20 endonuclease RNase III Drosha, que produz um miRNA-precursor intermediário longo de ~70 nt (pre-miRNA) que possui uma estrutura de haste-alça⁵⁴. A exportina-5 reconhece o corte escalonado deixado pela clivagem de Drosha e exporta o pre-miRNA ao citoplasma de uma maneira 25 dependente de Ran-GTP⁵⁴⁻⁶⁰. Uma vez no citoplasma, ambos os filamentos do pre-miRNA podem ser clivados por Dicer, uma outra enzima RNase II, aproximadamente duas voltas helicoidais distante da base da haste-alça⁶¹⁻⁶³. O díplice de RNA de ~22 mer resultante é liberado por Dicer e um 30 braço de haste único pode ser incorporado no RISC (complexo

de silenciamento induzido por RNA). RISC é um complexo de ribonucleoproteína que contém elementos da família da proteína Argonauta e fatores acessórios, junto com um miRNA e mRNA alvo. As estabilidades térmicas relativas do díplice de braço de haste são pensadas para determinar que o filamento torna-se incorporada em RISC: o filamento que entra no RISC é freqüentemente aquele que a extremidade 5' é menos estável^{64,65}. A inibição da tradução é mediada pela complementaridade de miRNA à(s) seqüência(s) alvo dentro da 10 UTR 3' do mRNA alvo por um mecanismo ainda desconhecido^{66,67}. Geralmente, a complementaridade imperfeita resulta na supressão da tradução enquanto a complementaridade perfeita ou quase perfeita resulta na clivagem de mRNA⁶⁸. Muitos aspectos da biogênese de miRNA, 15 trânsito, montagem de RISC e o mecanismo de função do RISC esperam esclarecimento, entretanto estudos funcionais de miRNAs específicos e análises genética e bioquímica dos componentes da rota de miRNA mostraram que os miRNAs são 20 importantes em diversos processos biológicos.

20 1B. miRNAs em Desenvolvimento

O desenvolvimento de um organismo multicelular requer controle espacial e temporal das rotas genéticas. miRNAs são propostos para controlar ou focar aquelas rotas genéticas do complexo por regulação pós-transcricional de 25 genes alvo. Um método para determinar a necessidade de miRNAs no desenvolvimento animal tem sido criar mutações em Dicer, uma enzima a montante requerida para o processamento de miRNAs a sua forma ativa madura. Acredita-se que os vertebrados tenham apenas uma única cópia de Dicer, que é 30 provavelmente exigida para processar completamente todos os

miRNAs de vertebrado^{62,63,69}. Em camundongos, a ablação da função Dicer resultou em letalidade próxima ao dia embriônico (E) 7.5⁶⁹. O camundongo inválido Dicer não expressa o marcador de linha primitiva T (*brachyury*), indicando que o desenvolvimento era provavelmente impedido antes do corpo ser configurado durante a gastrulação. Tamanho de membro diminuído e morte de célula programada aumentada resultaram da perda condicional da função de Dicer especificamente no mesoderma do membro do camundongo⁷⁰. O bloqueio de forma completa da formação de miRNA em peixe zebra tornando-se os mutantes de *Dicer* maternal-zigótico revelou que a perda de miRNAs não afeta a formação do eixo ou a padronização de muitos tipos de célula nos embriões. Entretanto, a morfogênese durante a gastrulação, formação de cérebro, somitogênese e desenvolvimento do coração todos provaram ser anormais e resultou em letalidade. Coletivamente, a análise genética da função de *Dicer* sugere que os miRNAs maduros são exigidos para o desenvolvimento adequado. Estudos que removem todas as funções de miRNA são informativos, entretanto eles são também ferramentas diretas e não fornecem percepção dentro das funções precisas de miRNAs específicos.

1C. Funções Biológicas de miRNAs Específicos

Há uma quantidade crescente de evidências que sugerem que os miRNAs participam em diversos processos biológicos. Em células das ilhotas pancreáticas, a superexpressão de miR-375 supriu a secreção da insulina induzida por glicose, embora a inibição de miR-375 endógeno melhorou a secreção de insulina⁷². Uma superexpressão similar e

estratégia de inibição identificaram uma função para o miR-143 na diferenciação de adipócito através da regulação da expressão de proteína ERK5⁷³. Em um outro exemplo, um gene de miRNA policistrônico codificando para 5 miRNAs foi ligado à tumorigênese⁷⁴. Outras funções para os miRNAs foram propostas em hematopoiese⁷⁵, diferenciação neuronal^{76,77} e a regulação da expressão do gene *Hox*^{78,79}.

Há agora mais de 300 miRNAs humanos conhecidos, entretanto apenas a um punhado tem sido designada uma função biológica. Estudos de miRNAs específicos são exigidos para a compreensão da prevalência e importância da regulação mediada por miRNA no desenvolvimento e patologia. O assunto presentemente divulgado fornece para um primeiro momento uma função para miRNAs na regulação da diferenciação e proliferação muscular.

1D. miRNAs no Desenvolvimento do Coração

A cardiogênese requer o controle preciso de programas genéticos diferentes, assim é intrigante especular que os miRNAs cardíacos-enriquecidos expressos de maneira diferencial podem ajudar a regular aquelas rotas do complexo. Tais padrões de expressão tecido-específico são divulgados aqui pelo assunto presentemente divulgado para vários miRNAs. miR-1 e miR-133 são expressados em ambos os tecidos de músculo esquelético e cardíaco, embora o miR-208 seja detectado somente em tecido do músculo cardíaco. Antes da presente divulgação, as funções destes miRNAs músculo-específico não eram claras.

1E. Identificação do miRNA alvo

A identificação dos miRNAs alvos específicos facilita a compreensão de sua função precisa nas rotas reguladoras.

A maior parte dos miRNAs animais são imperfeitamente complementares a seu sítio alvo, que frustra o uso de pesquisas de homologia simples para identificar os sítios alvos do miRNA animal. Para superar este obstáculo, vários 5 métodos computacionais foram desenvolvidos os quais incorporam a conservação da seqüência e as características de miRNA alvo conhecidos como critérios para predizer novos alvos de miRNA animal⁸⁰⁻⁸⁵. Por exemplo, alguns algoritmos levam em conta que a maioria dos miRNAs exibiu alta 10 complementaridade entre o segundo e o oitavo nucleotídeo dentro de sítios alvo validados, o qual é chamado de região de "semente". Outros algoritmos não o fazem, uma vez que, em alguns casos, a complementaridade na extremidade 3' de um miRNA pode compensar a fraca ligação da extremidade 5'. 15 Estes algoritmos também classificam prognósticos pela conservação da seqüência alvo através de duas ou mais espécies em relação às regiões de flanqueamento. Estes tipos de métodos computacionais têm previsto de forma bem sucedida alguns sítios alvo de miRNA de mamífero. As 20 previsões produzidas para qualquer miRNA particular quase certamente contêm falsos positivos. Entretanto, as previsões são extremamente úteis como geradores de hipótese. Qualquer previsão pode ser verificada experimentalmente e situada dentro de um contexto biológico 25 relevante.

1F. Importância

Há correntemente várias áreas ativas na pesquisa de miRNA que procuram compreender os mecanismos moleculares precisos por trás da repressão direcionada a miRNA, para 30 desenvolver melhores ferramentas para analisar a expressão

de miRNA e identificação de sítios alvo, e para determinar as funções biologicamente relevantes para miRNAs específicos dentro de rotas reguladoras.

O desenvolvimento do coração e a patologia estão intimamente ligados à regulação das complexas rotas genéticas, e muito esforço tem sido feito na tentativa de compreender estas rotas. Muitos estudos têm focado na função dos fatores de transcrição e seqüências melhoradoras regulatórias exigidas para a transcrição do gene cardíaco.

5 Foi provado que a regulação da expressão do gene cardíaco é bastante complexa, com genes cardíacos individuais sendo controlados por múltiplos melhoradores independentes que direcional padrões de expressão muito restritos no coração.

10 Potencialmente, os miRNAs aumentaram dramaticamente esta complexidade ainda mais se adicionando uma outra camada de regulação no nível pós-transcricional. O assunto presentemente divulgado fornece, em parte, uma nova compreensão de como a expressão do gene do músculo cardíaco e esquelético é regulada e divulga aplicações terapêuticas

15 20 e de pesquisa para das descobertas. Também, as descobertas relacionadas ao controle de miRNA da diferenciação e proliferação do músculo aqui divulgadas servem como um modelo para compreensão da função dos miRNAs em outras rotas também.

25 II. Definições

Por conveniência, certos termos empregados na especificação, exemplos e reivindicações em anexo estão aqui coletados. Embora se acredite que os seguintes termos sejam bem compreendidos por qualquer um habilitado na

30 técnica, as seguintes definições são expostas para

facilitar a explicação do assunto presentemente divulgado.

A menos que de outra forma definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui possuem os mesmos significados conforme comumente compreendido por qualquer 5 um habilitado na técnica à qual o assunto presentemente divulgado pertence. Embora quaisquer métodos, dispositivos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste do assunto presentemente divulgado, os métodos, dispositivos e 10 materiais representativos são agora descritos.

Seguindo a antiquada convenção da lei de patente, os termos "um", "uma", e "o/a" refere-se a "um ou mais" quando usado neste pedido, incluindo as reivindicações. Assim, os artigos, "um", "uma", e "o/a" são usados aqui para se 15 referir a um ou a mais de um (isto é, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. Por meio de exemplo, "um elemento" refere-se a um elemento ou a mais de um elemento.

Conforme aqui usado, o termo "aproximadamente", quando se referindo a um valor ou a uma quantidade de massa, peso, 20 tempo, volume, concentração ou percentagem pretende abranger variações em algumas modalidades \pm 20% ou \pm 10%, em algumas modalidades \pm 5%, em algumas modalidades \pm 1%, em algumas modalidades \pm 0.5%, e em algumas modalidades \pm 0.1% da quantidade especificada, como tal as variações são 25 apropriadas para praticar o assunto presentemente divulgado. A menos que de outra forma indicado, todos os números que expressam quantidades de ingredientes, condições de reação e assim por diante, usados na especificação e reivindicações são para serem compreendidos 30 como sendo modificados em todos os exemplos pelo termo

"aproximadamente". Conseqüentemente, a menos que indicado de modo contrário, os parâmetros numéricos expostos nesta especificação e reivindicações em anexo são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas 5 objetivadas para serem obtidas pelo assunto presentemente divulgado.

Conforme aqui usado, os termos "aminoácido" e "resíduo de aminoácido" são usados de forma intercambiável e referem-se a qualquer um dos vinte aminoácidos que ocorrem 10 naturalmente, assim como análogos, derivados e congêneros destes; os análogos de aminoácido possuindo cadeias laterais variadas; e todos os estereoisômeros de qualquer um dos precedentes. Assim, o termo "aminoácido" é objetivado para abranger todas as moléculas, se naturais ou 15 sintéticas, que incluem tanto uma funcionalidade de aminoácido quanto uma funcionalidade de ácido e são capazes de ser incluídas em um polímero de aminoácidos que ocorrem naturalmente.

Um aminoácido pode ser formado sob digestão química 20 (hidrólise) de um polipeptídeo nas suas ligações de peptídeo. Os resíduos de aminoácido aqui descritos estão, em algumas modalidades, na forma isomérica "L". Entretanto, resíduos na forma isomérica "D" podem ser substituídos por qualquer resíduo de aminoácido na forma L 25 (L-aminoácido), contanto que a propriedade funcional desejada seja mantida pelo polipeptídeo. NH₂ refere-se a um grupo amino livre presente na terminação amino de um polipeptídeo. COOH refere-se a um grupo carboxi livre presente na terminação carboxi de um polipeptídeo. De 30 acordo com a nomenclatura de polipeptídeo padrão, as

abreviações para os resíduos de aminoácido são mostradas na forma de tabela apresentada aqui acima.

Nota-se que todas as seqüências de resíduo de aminoácido aqui representadas pelas fórmulas possuem uma orientação da esquerda para direita na direção convencional da terminação amino para a terminação carboxi. Além disso, as expressões "aminoácido" e "resíduo de aminoácido" são amplamente definidas para incluir aminoácidos modificados e não usuais.

Além disso, nota-se que um traço no início ou extremidade de uma seqüência de resíduo de aminoácido indica uma ligação de peptídeo a uma seqüência adicional de um ou mais resíduos de aminoácido ou uma ligação covalente a um grupo terminal amino tal como NH₂ ou acetil ou a um grupo terminal carboxi tal como COOH.

Conforme aqui usado, o termo "célula" é usado em seu sentido biológico usual. Em algumas modalidades, a célula está presente em um organismo, por exemplo, um indivíduo vertebrado. A célula pode ser eucariótica (por exemplo, um miócito, tal como um miócito esquelético ou um miócito cardíaco) ou procariótica (por exemplo, uma bactéria). A célula pode ser de origem somática ou de linha de germe, totipotente, pluripotente ou diferenciada em qualquer grau, em divisão ou não. A célula pode também ser derivada de ou pode compreender um gameta ou embrião, uma célula tronco, ou uma célula completamente diferenciada.

Conforme aqui usados, os termos "células hospedeiras" e "células hospedeiras recombinantes" são usados de forma intercambiável e referem-se a células (por exemplo, miócitos) dentro das quais as composições do assunto

presentemente divulgado (por exemplo, um vetor de expressão codificando um miRNA) podem ser introduzidas. Além disso, os termos referem-se não apenas à célula particular dentro das quais uma construção de expressão é inicialmente 5 introduzida, mas também à geração ou geração potencial de tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações subseqüentes devido à mutação ou influências ambientais, tal geração não pode, de fato, ser idêntica à célula mãe mas ainda está inclusa no escopo do termo 10 conforme aqui usado.

Conforme aqui usado, o termo "gene" refere-se a um ácido nucleico que codifica um RNA, por exemplo, seqüências de ácido nucleico incluindo, mas não limitadas, aos genes estruturais codificando um polipeptídeo. O termo "gene" 15 também se refere a qualquer segmento de DNA associado com uma função biológica. Como tal, o termo "gene" abrange seqüências incluindo mas não limitadas a: uma seqüência codificadora; uma região promotora; uma seqüência reguladora transcricional; um segmento de DNA não expressado que é uma seqüência de reconhecimento específica 20 para as proteínas reguladoras; um segmento de DNA não expressado que contribui para expressão do gene, tal como, por exemplo, um segmento de DNA que pode ser transcrito em uma região não traduzida 3' de um mRNA, que é em seguida 25 obtido como alvo e ligado por miRNAs do assunto presentemente divulgado; um segmento de DNA designado para ter os parâmetros desejados; ou combinações destes. Um gene pode ser obtido por uma variedade de métodos, incluindo clonagem a partir de uma amostra biológica, síntese baseada em 30 informação de seqüência conhecida ou prevista, e derivação

recombinante a partir de uma ou mais seqüências existentes.

Como é compreendido na técnica, um gene compreende tipicamente um filamento codificador e um filamento não codificador. Conforme aqui usado, os termos "filamento codificador" e "filamento sentido" são usados de forma intercambiável, e referem-se a uma seqüência de ácido nucleico que possui a mesma seqüência de nucleotídeos de um mRNA do qual o produto do gene é traduzido. Como é também compreendido na técnica, quando o filamento codificador 5 e/ou o filamento senso é usado para se referir a uma molécula de DNA, o filamento codificador/sentido inclui resíduos de timidina em vez dos resíduos de uridina encontrados no mRNA correspondente. Adicionalmente, quando 10 usado para se referir a uma molécula de DNA, o filamento codificador/sentido pode também incluir elementos adicionais não encontrados no mRNA incluindo, mas não limitados a promotores, melhoradores e íntrons. 15 Similarmente, os termos "filamento modelo" e "filamento anti-sentido" são usados de forma intercambiável e referem- 20 se a uma seqüência de ácido nucleico que é complementar ao filamento codificador/sentido. Deve-se notar, entretanto, que para aqueles genes que não codificam produtos de polipeptídeo, por exemplo, um gene de miRNA, o termo "filamento codificador" é usado para se referir ao 25 filamento compreendendo o miRNA. Neste uso, o filamento compreendendo o miRNA é um filamento sentido com relação ao precursor de miRNA, mas será anti-sentido com relação ao seu RNA alvo (isto é, o miRNA hibridiza para o RNA alvo porque ele compreende uma seqüência que é anti-sentido ao 30 RNA alvo).

Conforme aqui usado, os termos "complementaridade" e "complementar" refere-se a um ácido nucleico que pode formar uma ou mais ligações de hidrogênio com uma outra seqüência de ácido nucleico por Watson-Crick tradicional ou 5 outros tipos de interações não tradicionais. Com referência às moléculas nucleicas do assunto presentemente divulgado, a energia livre de ligação para uma molécula de ácido nucleico com sua seqüência complementar é suficiente para permitir que a função relevante do ácido nucleico proceda, 10 em algumas modalidades, a atividade da ribonuclease. Por exemplo, o grau de complementaridade entre os filamentos sentido e anti-sentido de um precursor de miRNA pode ser o mesmo ou diferente do grau de complementaridade entre o 15 filamento contendo miRNA de um precursor de miRNA e a seqüência de ácido nucleico alvo. A determinação das energias livres de ligação para as moléculas de ácido nucleico é bem conhecida na técnica. Veja, por exemplo, Freier e outros, 1986³¹; Turner e outros, 1987³².

Conforme aqui usado, a expressão "complementaridade 20 percentual", "identidade percentual" e "indêntico percentual" são usados de forma intercambiável aqui se referem ao percentual de resíduos contíguos em uma molécula de ácido nucleico que podem formar ligações de hidrogênio (por exemplo, pares de base de Watson-Crick) com uma 25 segunda seqüência de ácido nucleico (por exemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 sendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% complementares). Os termos "100% complementares", "totalmente complementar" e "perfeitamente complementar" indicam que todos os resíduos contíguos de uma seqüência de 30 ácido nucleico podem fazer ligação de hidrogênio com o

mesmo número de resíduos contíguos em uma segunda seqüência de ácido nucleico. Como miRNAs são aproximadamente 17-24 nt, e até 5 não emparelhados (por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5 não emparelhados) são tipicamente tolerados durante a modulação direcionada por miRNA da expressão do gene, uma complementaridade percentual de pelo menos cerca de 70% entre um miRNA e o RNA ao qual ele é dirigido deve ser suficiente para o miRNA modular a expressão do gene a partir do qual o RNA alvo foi derivado.

O termo "expressão do gene" geralmente refere-se aos processos celulares pelos quais um polipeptídeo biologicamente ativo é produzido a partir de uma seqüência de DNA e exibe uma atividade biológica em uma célula. Como tal, a expressão do gene envolve os processos de transcrição e tradução, mas também envolve processos pós-transcpcionais e pós-tradução que podem influenciar uma atividade biológica de um gene ou produto de gene. Estes processos incluem, mas não estão limitados à síntese de RNA, processamento e transporte, assim como à síntese de polipeptídeo, transporte e modificação pós-traducional de polipeptídeos. Adicionalmente, os processos que afetam as interações proteína-proteína dentro da célula podem também afetar a expressão do gene como definido aqui.

Entretanto, no caso de genes que não codificam produtos de proteína, por exemplo, os genes de miRNA, o termo "expressão de gene" refere-se aos processos pelos quais um precursor de miRNA é produzido a partir do gene. Tipicamente, este processo é referido como transcrição, embora diferente da transcrição dirigida pela RNA polimerase II para os genes codificando proteína, os

produtos da transcrição de um gene de miRNA não são traduzidos para produzir uma proteína. Apesar de tudo, a produção de miRNA maduro a partir de um gene de miRNA é abrangida pelo termo "expressão do gene" como aquele termo

5 é aqui usado.

Conforme aqui usado, o termo "isolado" refere-se a uma molécula substancialmente livre de outros ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, carboidratos e/ou outros materiais com os quais ela está normalmente associada, tal associação

10 sendo ou no material celular ou em um meio de síntese. Assim, o termo "ácido nucleico isolado" refere-se a uma molécula de ácido ribonucleico ou uma molécula de ácido desoxiribonucleico (por exemplo, um DNA genômico, cDNA, mRNA, miRNA, etc.) de origem natural ou sintética ou alguma

15 combinação destes, que (1) não está associada à célula na qual o "ácido nucleico isolado" é encontrado na natureza, ou (2) está operativamente ligada a um polinucleotídeo ao qual ela não está ligada na natureza. Similarmente, o termo "polipeptídeo isolado" refere-se a um polipeptídeo, em

20 algumas modalidades preparados a partir de DNA ou RNA recombinante, ou de origem sintética, ou alguma combinação destes, que (1) não está associado com proteínas que ele é normalmente encontrado na natureza, (2) é isolado da célula em que ele normalmente ocorre, (3) é isolado livre de

25 outras proteínas da mesma fonte celular, (4) é expressado por um a célula de uma espécie diferente, ou (5) não ocorre na natureza.

O termo "isolado", quando usado no contexto de uma "célula isolada", refere-se a uma célula que foi removida

30 de seu ambiente natural, por exemplo, como uma parte de um

órgão, tecido ou organismo.

Conforme aqui usado, os termos "marcador" e "marcado" refere-se à fixação de uma metade, capaz de detecção por métodos espectroscópicos, radiológicos ou outros métodos, a 5 uma molécula marcadora. Assim, os termos "marcador" ou "marcado" refere-se à incorporação ou fixação, opcionalmente de forma covalente ou não covalente, de um marcador detectável em uma molécula, tal como um polipeptídeo. Vários métodos de marcação de polipeptídeo 10 são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcadores para polipeptídeos incluem, mas não estão limitados aos seguintes: radioisótopos, marcadores fluorescentes, átomos pesados, marcadores enzimáticos ou genes repórteres, grupos quimioluminescentes, grupos 15 biotinil, epitopos de polipeptídeo pré-determinados reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de par de zíperes de leucina, sítios de ligação para anticorpos, domínios de ligação metálica, tags de epitopo). Em algumas modalidades, os marcadores são fixados 20 por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial.

Conforme aqui usado, o termo "modular" refere-se a um aumento, diminuição, ou outra alteração de qualquer, ou todas, as atividades ou propriedades químicas e biológicas 25 de uma entidade bioquímica. Por exemplo, o termo "modular" pode se referir a uma mudança no nível de expressão de um gene ou um nível de uma molécula de RNA ou moléculas de RNA equivalentes codificando uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína; ou a uma atividade de uma ou mais 30 proteínas ou subunidades de proteína que é regulada para

cima ou para baixo, tal que a expressão, nível ou atividade seja maior que ou menor que aqueles observados na ausência do modulador. Por exemplo, o termo "modular" pode significar "inibir" ou "suprimir", mas o uso da palavra 5 "modular" não está limitado a esta definição.

O termo "modulação" conforme aqui usado refere-se tanto à regulação para cima (isto é, ativação ou estimulação) e regulação para baixo (isto é, inibição ou supressão) de uma resposta. Assim, o termo "modulação", 10 quando usado com referência a uma propriedade funcional ou atividade biológica ou processo (por exemplo, atividade de enzima ou ligação de receptor), refere-se à capacidade de regular para cima (por exemplo, ativar ou estimular), regular para baixo (por exemplo, inibir ou suprimir), ou de 15 outra forma mudar uma qualidade de tal propriedade, atividade ou processo. Em certos exemplos, tal regulação pode ser dependente da ocorrência de um evento específico, tal como a ativação de uma rota de transdução de sinal, e/ou pode ser manifestada apenas em tipos de célula 20 particulares.

O termo "modulador" refere-se a um polipeptídeo, ácido nucleico, macromolécula, complexo, molécula, molécula pequena, composto, espécies ou semelhantes (ocorrendo naturalmente ou não naturalmente), ou um extrato feito de 25 materiais biológicos tais como bactérias, plantas, fungos, ou células ou tecidos animais, que podem ser capazes de causar a modulação. Os moduladores podem ser avaliados para atividade potencial como inibidores ou ativadores (diretamente ou indiretamente) de uma propriedade 30 funcional, atividade ou processos biológicos, ou uma

combinação destes (por exemplo, agonista, antagonista parcial, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, agentes antimicrobianos, inibidores de infecção ou proliferação microbiana, e etc.) pela inclusão em ensaios.

5 Em tais ensaios, muitos moduladores podem ser selecionados de uma vez. A atividade de um modulador pode ser conhecida, desconhecida ou parcialmente conhecida.

Os moduladores podem ser seletivos ou não seletivos.

Conforme aqui usado, o termo "seletivo" quando usado no 10 contexto de um modulador (por exemplo, um inibidor) refere-se a uma diferença mensurável ou de outra forma biologicamente relevante na forma que o modulador interage com uma molécula (por exemplo, um RNA alvo de interesse) contra uma outra molécula similar mas não idêntica (por 15 exemplo, um RNA derivado de um elemento da mesma família do gene como o RNA alvo de interesse).

Deve ser compreendido que para um modulador ser considerado um modulador seletivo, a natureza de sua interação com um alvo não necessita inteiramente excluir 20 sua interação com outras moléculas relacionadas ao alvo (por exemplo, transcrições dos membros da família que não o próprio alvo). Afirmado de uma outra forma, o termo modulador seletivo não é objetivado para ser limitado àquelas moléculas que apenas se ligam às transcrições de 25 mRNA de um gene de interesse e não para àquelas dos membros da família relacionada. O termo é também objetivado para incluir moduladores que podem interagir com transcrições de genes de interesse e de membros da família relacionada, mas para a qual é possível projetar condições sob as quais as 30 interações diferenciais com os alvos contra os membros da

família possui um efeito biologicamente relevante. Tais condições podem incluir, mas não estão limitadas às diferenças no grau de identidade de seqüência entre o modulador e os membros da família, e o uso do modulador em 5 um tecido específico ou tipo de célula que expressa alguns mas não todos os elementos da família. Sob o último conjunto de condições, um modulador pode ser considerado seletivo para um dado alvo em um dado tecido se ele interage com o alvo para causar um efeito biologicamente relevante apesar do fato de que em um outro tecido que 10 expressa membros da família adicionais, o modulador e o alvo não irão interagir para causar um efeito biológico de modo algum porque o modulador será "encharcado" do tecido pela presença de outros membros da família.

15 Quando um modulador seletivo é identificado, o modulador liga-se a uma molécula (por exemplo, uma transcrição de mRNA de um gene de interesse) de uma maneira que é diferente (por exemplo, mais forte) da maneira que ele se liga a uma outra molécula (por exemplo, uma 20 transcrição de mRNA de um gene relacionado ao gene de interesse). Conforme aqui usado, diz-se que modulador apresenta uma "ligação seletiva" ou "ligação preferencial" à molécula a qual ele se liga mais fortemente quando comparado a alguma outra molécula possível à qual o 25 modulador pode se ligar.

Conforme aqui usado, os termos "inibir", "suprimir", "regular para baixo" e variantes gramaticais destes são usados de forma intercambiável e referem-se a uma atividade 30 pela qual o produto do gene (por exemplo, um polipeptídeo), expressão de um gene, atividade de um polinucleotídeo, tal

como por exemplo um miRNA, ou um nível de um RNA codificando um ou mais produto(s) do gene são reduzidos abaixo daqueles observados na ausência de uma implementação de um métodos do assunto presentemente divulgado.

5 Em algumas modalidades, a inibição com uma molécula de miRNA resulta em uma diminuição no nível de expressão do estado estável de um RNA alvo. Em algumas modalidades, a inibição com uma molécula de miRNA resulta em um nível de expressão de um gene alvo que está abaixo daquele nível 10 observado na presença de uma molécula inativa ou atenuada que é incapaz de regular para baixo o nível de expressão do alvo. Em algumas modalidades, a inibição da expressão do gene com uma molécula de miRNA do assunto presentemente divulgado é maior na presença da molécula de miRNA que em 15 sua ausência. Em algumas modalidades, a inibição da expressão do gene está associada com uma taxa melhorada de degradação do mRNA codificado pelo gene (por exemplo, pela inibição mediada por miRNA da expressão do gene). Em algumas modalidades, a inibição com uma molécula de miRNA 20 do assunto presentemente divulgado resulta em um nível de expressão de um produto de gene a partir de um gene alvo que está abaixo daquele nível observado na ausência do miRNA.

Em algumas modalidades, um miRNA, tal como, por 25 exemplo, um miRNA endógeno, pode ser inibido por um inibidor de miRNA, resultando em um aumento na expressão de um gene tido como alvo pelo miRNA, comparado ao nível de expressão do gene (por exemplo, a produção de um produto de gene) quando o miRNA não é inibido. Conforme aqui usado, os 30 termos "inibidor de miRNA" refere-se a uma molécula que

inibe a atividade de um miRNA.

Em algumas modalidades, um inibidor de miRNA é um polinucleotídeo que hibridiza a um miRNA alvo particular sob condições específicas, inibindo assim a atividade do miRNA alvo. As condições sob as quais o inibidor de miRNA pode hibridizar ao miRNA alvo incluem, por exemplo, condições fisiológicas. O inibidor de miRNA pode se hibridizar ao miRNA alvo a um grau maior ou menor com base na complementaridade da seqüência de polinucleotídeo do inibidor de miRNA ao polinucleotídeo do miRNA alvo. Em algumas modalidades, o miRNA pode ser totalmente complementar a todos ou a uma porção do miRNA alvo, ou menos de totalmente complementar, incluindo por exemplo, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80% ou 70% complementar ao miRNA alvo, dependendo da aplicação particular e da necessidade por especificidade, como será geralmente compreendido por qualquer um habilitado na técnica. O inibidor de miRNA necessita apenas compartilhar a complementaridade com o miRNA alvo uma vez que é necessário inibir uma quantidade desejada da atividade do miRNA alvo sob um conjunto particular de condições. Exemplos de inibidores de miRNA úteis com o assunto presentemente divulgado incluem, mas não estão limitados a, polinucleotídeos modificados tal como 2'-o-metil polinucleotídeos. Exemplos representativos não limitantes são expostos nas Tabelas 2 e 3, e incluem 2'-o-metil-miR-1, 2'-o-metil-miR-133 e 2'-o-metil-miR-208, que podem especificamente inibir a atividade de miR-1, miR-133 ou miR-208, respectivamente.

Conforme aqui usado, o termo "mutação" carrega sua

conotação tradicional e refere-se a uma mudança, herdada, ocorrendo naturalmente ou introduzida, em um ácido nucleico ou seqüência de polipeptídeo, e é usado em seu sentido como geralmente conhecido daqueles habilitados na técnica.

5 Conforme aqui usado, o termo "miócito" refere-se amplamente a todas as classificações de células musculares em todos os estágios de desenvolvimento. Assim, "miócito" abrange tanto células musculares não diferenciadas, tais como, por exemplo, mioblastos, quanto células musculares 10 diferenciadas, tais como, por exemplo, miotubos diferenciados terminalmente. "Miócito" também abrange células musculares de tipos histológicos variados, incluindo mas não limitado às células do músculo estriado (por exemplo, células do músculo esquelético), células do 15 músculo liso (por exemplo, células do músculo intestinal) e células do músculo cardíaco. Também, "miócito" conforme aqui usado não é específico à espécie.

 O termo "ocorrendo naturalmente", como aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que um objeto pode ser 20 encontrado na natureza. Por exemplo, uma seqüência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que está presente em um organismo (incluindo bactérias) que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório está ocorrendo naturalmente. 25 Deve-se compreender, entretanto, que qualquer manipulação pela mão do homem pode tornar um objeto "ocorrendo naturalmente", um objeto "isolado" conforme aquele termo é aqui usado.

 Conforme aqui usado, os termos "ácido nucleico", 30 "polinucleotídeo" e "molécula de ácido nucleico" referem-se

a qualquer um entre ácido desoxiribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), oligonucleotídeos, fragmentos gerados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e fragmentos gerados por qualquer um entre ligação, cisão, ação de 5 endonuclease e ação de exonuclease. Ácidos nucleicos podem compreender monômeros que são nucleotídeos ocorrendo naturalmente (tal como desoxiribonucleotídeos e ribonucleotídeos), ou análogos de nucleotídeos ocorrendo naturalmente (por exemplo, formas α -enancioméricas de 10 nucleotídeos ocorrendo naturalmente), ou uma combinação de ambos. Os nucleotídeos modificados podem ter modificações nas metades do açúcar e/ou nas metades da base de pirimidina ou purina. As modificações do açúcar incluem, por exemplo, substituição de um ou mais grupos hidroxi com 15 halogênios, grupos alquil, aminas e grupos azido, ou os açúcares podem ser funcionalizados como éteres ou ésteres. Além disso, a metade inteira do açúcar pode ser substituída com estruturas similares estericamente e eletronicamente, tal como aza-açúcares e análogos de açúcar carboxílico. 20 Exemplos de modificações em uma metade da base incluem purinas e pirimidinas alquiladas, purinas ou pirimidinas aciladas ou outros substitutos heterocíclicos bem conhecidos. Monômeros de ácido nucleico podem ser ligados por ligações de fosfodiéster ou análogos de tais ligações. 25 Análogos de ligações de fosfodiéster incluem fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato, e etc. O termo "ácido nucleico" também inclui os chamados "ácidos peptídeo nucleico", que compreendem bases de ácido nucleico 30 que ocorrem naturalmente ou modificadas fixadas a uma

estrutura de poliamida. Os ácidos nucleicos podem ser de filamento único ou de filamento duplo.

O termo "operativamente ligado", quando descrevendo a relação entre as duas regiões de ácido nucleico, refere-se a uma justaposição onde as regiões estão em uma relação que as permite funcionar da sua maneira objetivada. Por exemplo, uma seqüência de controle "operativamente ligada" a uma seqüência codificadora pode ser ligada de tal forma que a expressão da seqüência codificadora seja alcançada sob condições compatíveis com as seqüências de controle, tal como quando moléculas apropriadas (por exemplo, indutores e polimerases) são ligadas à(s) seqüência(s) de controle ou reguladora(s). Assim, em algumas modalidades, a expressão "operativamente ligado" refere-se a um promotor conectado a uma seqüência codificadora de tal forma que a transcrição daquela seqüência codificadora seja controlada e regulada por aquele promotor. Técnicas para operativamente ligar um promotor a uma seqüência codificadora são conhecidas na técnica; a orientação e localização precisas em relação a uma seqüência codificadora de interesse é dependente, entre outras coisas, da natureza específica do promotor.

Assim, o termo "operativamente ligado" pode se referir a uma região do promotor que está conectada a uma seqüência de nucleotídeo de tal forma que a transcrição daquela seqüência de nucleotídeo seja controlada e regulada por aquela região do promotor. Similarmente, diz-se que uma seqüência de nucleotídeo está sob "controle transcripcional" de um promotor ao qual ela está operativamente ligada. As técnicas para ligar operativamente uma região de promotor a

uma seqüência de nucleotídeo são conhecidas na técnica.

Assim, o termo "operativamente ligado" pode também se referir a uma seqüência de terminação de transcrição que está conectada a uma seqüência de nucleotídeo de tal forma 5 que a finalização da transcrição daquela seqüência de nucleotídeo seja controlada pela seqüência de terminação de transcrição. Em algumas modalidades, uma seqüência de terminação de transcrição compreende uma seqüência que causa a transcrição por uma RNA polimerase III para 10 finalizar no terceiro ou quarto "T" na seqüência de terminação, TTTTTT. Portanto, a pequena transcrição nascente tipicamente possui 3 ou 4 "U's" na terminação 3'.

As expressões "identidade percentual" e "% idêntico", no contexto de dois ácidos nucleicos ou seqüências de 15 proteína, referem-se a duas ou mais seqüências ou subseqüências que têm em algumas modalidades pelo menos 60%, em algumas modalidades pelo menos 70%, em algumas modalidades pelo menos 80%, em algumas modalidades pelo menos 85%, em algumas modalidades pelo menos 90%, em 20 algumas modalidades pelo menos 95%, em algumas modalidades pelo menos 96%, em algumas modalidades pelo menos 97%, em algumas modalidades pelo menos 98% e em algumas modalidades pelo menos 99% de identidade de nucleotídeo ou resíduo de aminoácido, quando comparadas e alinhadas para máxima 25 correspondência, conforme medido usando-se um dos algoritmos de comparação de seqüência a seguir ou por inspeção visual. A identidade percentual existe em algumas modalidades sobre uma região das seqüências que possui pelo menos cerca de 10 resíduos de comprimento, em algumas 30 modalidades sobre uma região que possui pelo menos cerca de

20 resíduos de comprimento, em algumas modalidades sobre uma região das seqüências que possui pelo menos cerca de 50 resíduos de comprimento, em algumas modalidades sobre uma região de pelo menos cerca de 100 resíduos, e em algumas 5 modalidades a identidade percentual existe sobre pelo menos cerca de 150 resíduos. Em algumas modalidades, a identidade percentual existe sobre o comprimento inteiro de uma dada região, tal como uma região codificadora ou um miRNA inteiro.

10 Para comparação de seqüência, tipicamente uma seqüência atua como uma seqüência de referência à qual seqüências de teste são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de seqüência, as seqüências de teste e de referência são introduzidas em um computador, os 15 coordenados da subseqüência são designados se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo da seqüência são apontados. O algoritmo de comparação de seqüência então calcula o percentual de identidade de seqüência para a(s) seqüência(s) de teste com relação à seqüência de 20 referência, com base nos parâmetros do programa apontados.

O alinhamento ideal das seqüências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local descrito em Smith & Waterman, 1981³³, pelo algoritmo de alinhamento de homologia descrito em Needleman 25 & Wunsch, 1970³⁴, pela procura por um método de similaridade descrito em Pearson & Lipman, 1988³⁵, pelas implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no GCG® WISCONSIN PACKAGE®, disponível a partir de Accelrys, Inc., San Diego, 30 California, United States of America), ou por inspeção

visual. Veja geralmente, Ausubel e outros, 1989³⁶.

Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinação do percentual de identidade de seqüência e similaridade de seqüência é o algoritmo BLAST, que está descrito em Altschul e outros, 1990³⁷. O software para executar a análise por BLAST está publicamente disponível através de *National Center for Biotechnology Information* através de *World Wide Web*. Este algoritmo envolve primeiro identificar pares de seqüência de alto ganho (HSPs) através da identificação de palavras curtas de comprimento W na seqüência *query*, que ou emparelha ou satisfaz algum ganho de limite avaliado positivo T quando alinhado com uma palavra do mesmo tamanho em uma seqüência de dados. T é referido como o limite do ganho da palavra vizinha³⁷. Estes acertos da palavra vizinha iniciais atuam como sementes para iniciar pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo as mesmas. Os acertos da palavra são então estendidos em ambas as direções ao longo de cada seqüência até que o ganho de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Os ganhos cumulativos são calculados usando-se, para seqüências de nucleotídeo, os parâmetros M (ganho de recompensa para um par de resíduos emparelhados; sempre > 0) e N (ganho de penalidade para resíduos não emparelhados; sempre < 0). Para as seqüências de aminoácido, a matriz de ganho é usada para calcular o ganho cumulativo. A extensão dos acertos de palavra em cada direção é suspensa quando o ganho de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X a partir de seu valor máximo alcançado, o ganho cumulativo vai até zero ou abaixo devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de ganho negativo, ou a extremidade

de uma ou outra seqüência é alcançada. Os parâmetros do algoritmo BLAST, W, T e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para seqüências de nucleotídeo) usa como padrões um comprimento 5 de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um corte de 100, M = 5, N = -4 e uma comparação de ambos os filamentos. Para as seqüências de aminoácido, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e uma matriz de ganho 10 BLOSUM62³⁸.

Além disso, para calcular a identidade de seqüência percentual, o algoritmo BLAST também executa uma análise estatística da similaridade entre duas seqüências. Veja, por exemplo, Karlin & Altschul 1993³⁹. Uma medida de 15 similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual um emparelhamento entre dois nucleotídeos ou seqüências de aminoácido irá ocorrer por acaso. Por exemplo, uma seqüência de ácido nucleico de 20 teste é considerada similar a uma seqüência de referência se a menor probabilidade da soma em uma comparação da seqüência de ácido nucleico de teste e a seqüência de ácido nucleico de referência é em algumas modalidades menor que cerca de 0,1, em algumas modalidades menor que cerca de 25 0,01, e em algumas modalidades menor que cerca de 0,001.

As expressões "substancialmente idêntico" no contexto de duas seqüências de nucleotídeo, referem-se a duas ou mais seqüências ou subseqüências que têm em algumas modalidades pelo menos 70% de identidade de nucleotídeo, em 30 algumas modalidades pelo menos 75% de identidade de

nucleotídeo, em algumas modalidades pelo menos 80% de identidade de nucleotídeo, em algumas modalidades pelo menos 85% de identidade de nucleotídeo, em algumas modalidades pelo menos 90% de identidade de nucleotídeo, em 5 algumas modalidades pelo menos 95% de identidade de nucleotídeo, em algumas modalidades pelo menos 97% de identidade de nucleotídeo e em algumas modalidades pelo menos 99% de identidade de nucleotídeo, quando comparadas e alinhadas para máxima correspondência, conforme medido 10 usando-se um dos algoritmos de comparação de seqüência a seguir ou por inspeção visual. Em um exemplo, a identidade substancial existe nas seqüências de nucleotídeo de pelo menos 17 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 18 resíduos, em algumas 15 modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 19 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 20 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 21 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de 20 nucleotídeo de pelo menos cerca de 22 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca 25 de 23 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 24 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 25 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 26 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca 30 de 27 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 30 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca

de 50 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 75 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 100 resíduos, em algumas modalidades na seqüência de nucleotídeo de pelo menos cerca de 150 resíduos, e em ainda um outro exemplo nas seqüências de nucleotídeo compreendendo seqüências codificadoras completas. Em algumas modalidades, as seqüências polimórficas podem ser seqüências substancialmente idênticas. O termo "polimórfico" refere-se à ocorrência de duas ou mais seqüências alternativas determinadas geneticamente ou alelos em uma população. Uma diferença alélica pode ser tão pequena quanto um par de base. Todavia, qualquer um habilitado na técnica irá reconhecer que as seqüências polimórficas correspondem ao mesmo gene.

Uma outra indicação de que duas seqüências de nucleotídeo são substancialmente idênticas é as duas moléculas hibridizam-se especificamente ou substancialmente entre si sob condições severas. No contexto de hibridização de ácido nucleico, duas seqüências de ácido nucleico sendo comparadas podem ser designadas como uma "seqüência marcadora" e uma "seqüência de teste". Uma "seqüência marcadora" é uma molécula de ácido nucleico de referência, e uma "seqüência de teste" é uma molécula de ácido nucleico de teste, muitas vezes encontradas dentro de uma população heterogênea de moléculas de ácido nucleico.

Uma seqüência de nucleotídeo exemplar empregada para os estudos de hibridização ou ensaios incluem seqüências marcadora que são complementares a ou imitam em algumas modalidades pelo menos cerca de 14 a 40 seqüências de

nucleotídeo de uma molécula de ácido nucleico do assunto presentemente divulgado. Em um exemplo, os marcadores compreendem de 14 a 20 nucleotídeos, ou até mesmo mais onde desejado, tal como 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 ou 500 5 nucleotídeos ou até o comprimento total de um dado gene. Tais fragmentos podem ser facilmente preparados através, por exemplo, da sintetização de forma direta do fragmento por síntese química, pela aplicação de tecnologia de amplificação de ácido nucleico, ou pela introdução de 10 seqüências selecionadas em vetores recombinantes para produção recombinante.

A expressão "dirigido para" inclui "hibridizar especificamente a", que se refere à ligação, duplexação ou hibridização de uma molécula apenas a uma seqüência de 15 nucleotídeo particular sob condições severas quando essa seqüência está presente em uma mistura de ácido nucleico complexo (por exemplo, DNA ou RNA celular total).

Por meio de exemplo não limitante, a hibridização pode ser executada em 5x SSC, 4x SSC, 3x SSC, 2x SSC, 1x SSC ou 20 0.2x SSC por pelo menos cerca de 1 hora, 2 horas, 5 horas, 12 horas ou 24 horas (ver, Sambrook & Russell, 2001, para uma descrição de tampão de SSC e outras condições de hibridização). A temperatura da hibridização pode ser aumentada para ajustar a severidade da reação, por exemplo, 25 a partir de 25°C (temperatura ambiente), a cerca de 45°C, 50°C, 55°C, 60°C ou 65°C. A reação de hibridização pode também incluir um outro agente que afeta a severidade; por exemplo, a hibridização conduzida na presença de 50% de formamida aumenta a severidade da hibridização a uma 30 temperatura definida.

A reação de hibridização pode ser seguida por uma única etapa de lavagem, ou duas ou mais etapas de lavagem, que pode ser à mesma temperatura e salinidade ou ambas diferentes. Por exemplo, a temperatura da lavagem pode ser 5 aumentada para ajustar a severidade de cerca de 25°C (temperatura ambiente), a cerca de 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ou superior. A etapa de lavagem pode ser conduzida na presença de um detergente, por exemplo, SDS. Por exemplo, a hibridização pode ser seguida por duas etapas de lavagem a 10 65°C, cada uma, por cerca de 20 minutos em 2x SSC, SDS 0,1%, e opcionalmente duas etapas de lavagem adicionais a 65°C, cada uma, por cerca de 20 minutos em 0,2x SSC, SDS 0,1%.

Os seguintes são exemplos de condições de hibridização 15 e lavagem que podem ser usadas para clonar seqüências de nucleotídeo homólogas que são substancialmente idênticas às seqüências de nucleotídeo de referência do assunto presentemente divulgado: uma seqüência de nucleotídeo marcadora hibridiza-se em uma exemplo a uma seqüência de 20 nucleotídeo alvo em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) 1 mM a 50°C seguido por lavagem em 2x SSC, SDS 0,1% a 50°C; em algumas modalidades, uma seqüência marcadora e de teste hibridizam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO₄ 25 0,5M, EDTA 1 mM a 50°C seguido por lavagem em 1x SSC, SDS 0,1% a 50°C; em algumas modalidades, uma seqüência marcadora de teste hibridizam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1 mM a 50°C seguido por lavagem em 0,5x SSC, SDS 0,1% a 50°C; em algumas 30 modalidades, uma seqüência marcadora de teste hibridizam-se

em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1 mM a 50°C seguido por lavagem em 0,1x SSC, SDS 0,1% a 50°C; em ainda um outro exemplo, uma seqüência marcadora de teste hibridizam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO₄ 5 0,5M, EDTA 1 mM a 50°C seguido por lavagem em 0,1x SSC, SDS 0,1% a 65°C.

Condições de hibridização severas exemplares adicionais incluem hibridização durante a noite a 42°C em uma solução compreendendo ou consistindo de formamida 50%, 10 10x Denhardt's (Ficoll 0,2%, polivinilpirrolidona 0,2%, albumina sérica bovina 0,2%) e 200 mg/L de DNA transportador desnaturado, por exemplo, DNA de esperma de salmão cortado, seguido por duas etapas de lavagem a 65°C, cada uma, por cerca de 20 minutos em 2x SSC, SDS 0,1%, e 15 duas etapas de lavagem a 65°C, cada uma, por cerca de 20 minutos em 0,2x SSC, SDS 0,1%.

A hibridização pode incluir hibridizar dois ácidos nucleicos em solução, ou um ácido nucleico em solução a um ácido nucleico fixado a um suporte sólido, por exemplo, um 20 filtro. Quando um ácido nucleico está em um suporte sólido, uma etapa de pré-hibridização pode ser conduzida antes da hibridização. A pré-hibridização pode ser executada por pelo menos cerca de 1 hora, 3 horas ou 10 horas na mesma solução e à mesma temperatura da hibridização (mas sem o 25 filamento de polinucleotídeo complementar).

Assim, sob uma revisão da presente divulgação, as condições de severidade são conhecidas daqueles habilitados na técnica ou podem ser determinadas pelo técnico habilitado sem experimentação indevida^{36, 40-44}.

30 A expressão " hibridizar substancialmente a" refere-se

à hibridização complementar entre uma molécula de ácido nucleico marcadora e uma molécula de ácido nucleico alvo e abrange menos desemparelhamentos que podem ser ajustados reduzindo-se a severidade do meio de hibridização para 5 alcançar a hibridização desejada.

O termo "fenótipo" refere-se à constituição física, bioquímica e fisiológica totais de uma célula ou um organismo, por exemplo, possuindo qualquer traço ou qualquer grupo de traços. Como tal, os fenótipos resultam 10 da expressão dos genes dentro de uma célula ou organismo, e relacionam-se aos traços que são potencialmente observáveis ou avaliáveis.

Conforme aqui usado, os termos "polipeptídeo", "proteína" e "peptídeo", que são usados de forma 15 intercambiável aqui, referem-se a um polímero dos 20 aminoácidos de proteínas, ou análogos de aminoácido, sem considerar seu tamanho ou função. Embora "proteína" seja freqüentemente usada com referência aos polipeptídeos relativamente grandes, e "peptídeo" seja freqüentemente 20 usado com referência a pequenos polipeptídeos, o uso destes termos na técnica sobrepõe-se e varia. O termo "polipeptídeo" conforme aqui usado refere-se aos peptídeos, polipeptídeos e proteínas, a menos que de outra forma notado. Conforme aqui usado, os termos "proteína", 25 "polipeptídeo" e "peptídeo" são usados de forma intercambiável aqui quando se referindo a um produto do gene. O termo "polipeptídeo" abrange proteínas de todas as funções, incluindo enzimas. Assim, polipeptídeos exemplares incluem produtos de gene, proteínas que ocorrem 30 naturalmente, homólogos, ortólogos, parólogos, fragmentos e

outros equivalentes, variantes e análogos dos precedentes.

Os termos "fragmento de polipeptídeo" ou "fragmento", quando usado com referência a um polipeptídeo de referência, refere-se a um polipeptídeo em que os resíduos de aminoácido são deletados conforme comparados ao próprio polipeptídeo de referência, mas onde a seqüência de aminoácido restante é freqüentemente idêntica às posições correspondentes no polipeptídeo de referência. Tais deleções podem ocorrer na terminação amino ou na terminação carboxi do polipeptídeo de referência, ou alternativamente em ambas. Os fragmentos tipicamente possuem pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, pelo menos 20, 30, 40 ou 50 aminoácidos de comprimento, pelo menos 75 aminoácidos de comprimento ou pelo menos 100, 150, 200, 300, 500 ou mais aminoácidos de comprimento. Um fragmento pode reter uma ou mais atividade(s) biológica(s) do polipeptídeo de referência. Também, os fragmentos podem incluir um sub-fragmento de uma região específica, este sub-fragmento retém uma função da região da qual ele é derivado.

Conforme aqui usado, o termo "iniciador" refere-se a uma seqüência compreendendo em algumas modalidades dois ou mais desoxiribonucleotídeos ou ribonucleotídeos, em algumas modalidades mais de três, em algumas modalidades mais de oito e em algumas modalidades pelo menos cerca de 20 nucleotídeos de uma região exônica ou intrônica.

Tais oligonucleotídeos possuem em algumas modalidades entre dez e trinta bases de comprimento.

O termo "purificado" refere-se a uma espécie objetivada que é a espécie predominante presente (isto é,

em uma base molar é mais abundante que qualquer outra espécie individual na composição). Uma "fração purificada" é uma composição onde a espécie objetivada compreende pelo menos cerca de 50 por cento (em uma base molar) de todas as espécies presentes. Ao se fazer a determinação da pureza de uma espécie em solução ou dispersão, o solvente ou matriz na qual a espécie é dissolvida ou dispersada não é freqüentemente incluída em tal determinação, em vez disso, apenas a espécie (incluindo aquela de interesse) dissolvida ou dispersada é levada em consideração. Geralmente, uma composição purificada terá uma espécie que compreende mais de cerca de 80% de todas as espécies presentes na composição, mas de cerca de 85%, 90%, 95%, 99% ou mais de todas as espécies presentes. A espécie objetivada pode ser purificada para homogeneidade essencial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais) onde a composição consiste essencialmente de uma espécie única. A pureza de um polipeptídeo pode ser determinada por vários métodos conhecidos daqueles habilitados na técnica, incluindo, por exemplo, análise de seqüência de aminoácido com terminal amino, eletroforese em gel e análise de espectrometria de massa.

Uma "seqüência de referência" é uma seqüência definida como uma base para uma comparação de seqüência. Uma seqüência de referência pode ser um subconjunto de uma seqüência maior, por exemplo, como um segmento de um nucleotídeo de comprimento total ou seqüência de aminoácido, ou pode compreender uma seqüência completa. Porque duas proteínas podem, cada uma, (1) compreender uma

seqüência (isto é, uma porção da seqüência de proteína completa) que é similar entre as duas proteínas, e (2) pode também compreender uma seqüência que é divergente entre as duas proteínas, as comparações de seqüência entre duas (ou mais) proteínas são tipicamente executadas comparando-se as seqüências de duas proteínas sobre uma "janela de comparação" (definida abaixo) para identificar e comparar as regiões locais da similaridade de seqüência.

O termo "seqüência reguladora" é um termo genérico usado através da especificação para se referir às seqüências de polinucleotídeo, tais como sinais de iniciação, melhoradores, reguladores, promotores e seqüências de terminação, que são necessários ou desejáveis para afetar a expressão das seqüências codificadoras e não codificadoras às quais eles são operativamente ligados. Seqüências reguladoras exemplares são descritas em Goeddel, 1990⁴⁵, e incluem, por exemplo, os promotores inicial e posterior do vírus simian 40 (SV40), promotor inicial imediato de adenovírus ou citomegalovírus, o promotor mínimo de CMV, o sistema lac, o sistema trp, o sistema TAG ou TRC, o promotor T7 cuja expressão é direcionada por T7 RNA polimerase, as principais regiões operadoras e promotoras de fago lâmbda, as regiões de controle para a proteína de cobertura fd, o promotor para 3-fosfoglicerato quinase ou outras enzimas glicolíticas, os promotores de fosfatase ácida, por exemplo, Pho5, os promotores dos fatores de acasalamento de levedura, o promotor de poliedro do sistema baculovírus e outras seqüências conhecidas para controlar a expressão de genes de células procariotas ou eucariotas ou seus vírus, e várias combinações destes. A

natureza e o suu de tais seqüências de controle podem diferir dependendo do organismo hospedeiro. Em procariotas, tais seqüências reguladoras geralmente incluem promotor, sítio de ligação ribossomal e seqüências de terminação de transcrição. O termo "seqüência reguladora" é objetivado para incluir, no mínimo, componentes, a presença dos quais pode influenciar a expressão, e pode também incluir componentes adicionais, a presença dos quais é vantajosa, por exemplo, seqüências líderes e seqüências associadas de fusão.

Em certas modalidades, a transcrição de uma seqüência de polinucleotídeo está sob controle de uma seqüência promotora (ou outra seqüência reguladora) que controle a expressão do polinucleotídeo em um tipo de célula em que a expressão é objetivada. Será também compreendido que o polinucleotídeo pode estar sob o controle de seqüências reguladoras que são as mesmas ou diferentes daquelas seqüências que controlam a expressão da forma que ocorre naturalmente do polinucleotídeo. Em algumas modalidades, uma seqüência promotora é selecionada a partir do grupo consistindo de um promotor mínimo de CMV, creatinina quinase muscular (MCK), e um promotor de cadeia pesada de α -miosina (MHC). Por exemplo, o promotor de creatinina quinase muscular (MCK) que direciona a expressão do gene no músculo esquelético, pode ser usado para expressar miRNAs, tal como por exemplo, miR-1, miR-133 ou miR-206 em tecido, incluindo o músculo esquelético correntemente disponível a partir de técnicas transgênicas. É compreendido que o promotor inteiro identificado por qualquer promotor (por exemplo, os promotores listados aqui) não necessitam ser

empregados, e que um derivado funcional deste pode ser usado. Conforme aqui usada, a expressão "derivado funcional" refere-se a uma seqüência de ácido nucleico que comprehende seqüência suficiente para direcionar a 5 transcrição de uma outra molécula de ácido nucleico operativamente ligada. Como tal, um "derivado funcional" pode funcionar como um promotor mínimo, conforme aquele termo é aqui definido.

O término da transcrição de uma seqüência de 10 polinucleotídeo é tipicamente regulado por uma seqüência de término de transcrição operativamente ligada (por exemplo, uma seqüência de término de RNA polimerase III). Em certos exemplos, os terminadores transcripcionais são também responsáveis pela poliadenilação de mRNA correta. A 15 seqüência de DNA reguladora não transcrita em 3' inclui, em algumas modalidades, de cerca de 50 a cerca de 1.000, e em algumas modalidades de cerca de 100 a cerca de 1.000 pares de base de nucleotídeo e contém seqüências de término de transcrição e tradução. Em algumas modalidades, uma 20 seqüência de término de RNA polimerase III comprehende as seqüência de nucleotídeo TTTTTT.

O termo "gene repórter" refere-se a um ácido nucleico 25 comprehendendo uma seqüência de nucleotídeo codificando uma proteína que é facilmente detectável ou pela sua presença ou atividade, incluindo, mas não limitada à luciferase, proteína fluorescente (por exemplo, proteína fluorescente verde), cloranfenicol acetil transferase, β -galactosidase, fosfatase alcalina placentária secretada, β -lactamase, hormônio do crescimento humano e outros repórteres de 30 enzimas secretadas. Geralmente, um gene repórter codifica

um polipeptídeo não diferente produzido pela célula hospedeira, que é detectável pela análise da(s) célula(s), por exemplo, por análise fluorimétrica direta, análise radioisotópica ou espectrofotométrica da(s) célula(s) e tipicamente sem a necessidade de matar as células para análise de sinal. Em certos exemplos, um gene repórter codifica uma enzima, que produz uma mudança nas propriedades fluorimétricas da célula hospedeira, que é detectável pela função qualitativa, quantitativa ou semiqualitativa ou ativação transcricional. Enzimas exemplares incluem esterases, β -lactamase, fosfatases, peroxidases, proteases (ativador de plasminogênio do tecido ou uroquinase) e outras enzimas cuja função possa ser detectada pelos substratos cromogênico ou fluorogênico conhecidos daqueles habilitados na técnica ou desenvolvidos no futuro.

Conforme aqui usado, o termo "seqüenciamento" refere-se à determinação da seqüência linear ordenada de ácidos nucleicos ou aminoácidos de uma amostra alvo de DNA, RNA ou proteína, usando-se técnicas laboratoriais manuais ou automatizadas convencionais.

Conforme aqui usado, o termo "substancialmente puro" refere-se àquele polinucleotídeo ou polipeptídeo que é substancialmente livre das seqüências e moléculas com as quais ele está associado em seu estado natural, e aquelas moléculas usadas no procedimento de isolamento. O termo "substancialmente livre" refere-se àquela amostra que é em algumas modalidades pelo menos 50%, em algumas modalidades pelo menos 70%, em algumas modalidades 80% e em algumas modalidades 90% livre dos materiais e compostos com os

quais ela está associada na natureza.

Conforme aqui usado, o termo "célula alvo" refere-se a uma célula na qual é desejado inserir uma seqüência de ácido nucleico ou polipeptídeo, ou de outra forma efetuar 5 uma modificação das condições conhecidas como sendo padrões na célula não modificada. Uma seqüência de ácido nucleico introduzida em uma célula alvo pode ser de comprimento variável. Adicionalmente, uma seqüência de ácido nucleico pode entrar em uma célula alvo como um componente de uma 10 plasmídio ou outro vetor ou como uma seqüência aberta.

Conforme aqui usado, o termo "gene alvo" refere-se a uma gene que é tido como alvo para a modulação usando-se os métodos e composições do assunto presentemente divulgado. Um gene algo, portanto, compreende uma seqüência de ácido 15 nucleico cujo nível de expressão, ou no nível de mRNA ou de polipeptídeo, é regulado para baixo por um miRNA. Similarmente, os termos "RNA alvo" ou "mRNA alvo" referem-se à transcrição de um gene alvo ao qual objetiva-se que o miRNA ligue-se, levando à modulação da expressão do gene 20 alvo. O gene alvo pode ser um gene derivado de uma célula, um gene endógeno, um transgene ou genes exógenos tais como genes de um patógeno, por exemplo, um vírus, que está presente na célula após a infecção desta. A célula contendo o gene alvo pode ser derivada de ou contida em qualquer 25 organismo, por exemplo, uma planta, animal, protozoário, vírus, bactéria ou fungo.

Conforme aqui usado, o termo "transcrição" refere-se a um processo celular envolvendo a interação de uma RNA polimerase com um gene que direciona a expressão como RNA 30 da informação estrutural presente nas seqüências

codificadoras do gene. O processo inclui, mas não está limitado às seguintes etapas: (a) a iniciação da transcrição, (b) prolongamento da transcrição, (c) união da transcrição, (d) capeamento da transcrição, (e) término da 5 transcrição, (f) poliadenilação transcrição, (g) exportação nuclear da transcrição, (h) correção da transcrição e (i) estabilização da transcrição.

Conforme aqui usado, o termo "fator de transcrição" refere-se a uma proteína citoplasmica ou nuclear que se 10 liga a um gene, ou se liga a uma transcrição de RNA de um gene, ou se liga a uma outra proteína que se liga a um gene ou uma transcrição de RNA ou a uma outra proteína que sucessivamente se liga a uma gene ou uma transcrição de RNA, de maneira que module assim a expressão do gene. Tal 15 modulação pode adicionalmente ser alcançada por outros mecanismos, a essência de um "fator de transcrição para um gene" pertence a um fator que altera o nível de transcrição do gene de alguma forma.

O termo "transfecção" refere-se à introdução de um 20 ácido nucleico, por exemplo, um vetor de expressão, em uma célula receptora, que em certos exemplos envolve a transferência de gene mediada por ácido nucleico. O termo "transformação" refere-se a um processo em que um genótipo da célula é mudado como um resultado da captura celular do 25 ácido nucleico exógeno. Por exemplo, uma célula transformada pode expressar um miRNA do assunto presentemente divulgado.

Conforme aqui usado, "significância" ou "significante" relaciona-se a uma análise estatística da probabilidade que 30 haja uma associação não aleatória entre duas ou mais

entidades. Para determinar se uma relação é ou não é "significante" ou se possui ou não "significância", manipulações estatísticas dos dados podem ser executadas para calcular uma probabilidade, expressada como um "valor-p". Aqueles valores-p que estejam abaixo de um ponto de corte definido pelo usuário são tratados como significantes. Em um exemplo, um valor-p menor que ou igual a 0,05, em algumas modalidades menor que 0,01, em algumas modalidades menor que 0,005 e em algumas modalidades menor que 0,001, é tratado como significante.

Conforme aqui usada, a expressão "RNA alvo" refere-se a uma molécula de RNA (por exemplo, uma molécula de RNA codificando um produto de gene) que é um alvo para modulação. Em algumas modalidades, o RNA alvo é codificado por um gene alvo. Similarmente, a expressão "sítio alvo" refere-se a uma seqüência dentro de um RNA alvo que é "tida como alvo" para clivagem mediada por uma construção de miRNA que contém seqüências dentro de seu filamento anti-sentido que são complementares ao sítio alvo.

Também similarmente, a expressão "célula alvo" refere-se a uma célula que expressa um RNA alvo e dentro da qual um miRNA é objetivado para ser introduzido. Uma célula alvo é, em algumas modalidades, um miócito.

Um miRNA é "tido como alvo para" uma molécula de RNA se ela possuir similaridade de nucleotídeo suficiente às moléculas de RNA que se espera que modulem a expressão da molécula de RNA sob condições suficientes para que o miRNA e a molécula de RNA interajam. Em algumas modalidades, a interação ocorre dentro de um miócito. Em algumas modalidades, a interação ocorre sob condições fisiológicas.

Conforme aqui usado, a expressão "condições fisiológicas" refere-se às condições *in vivo* dentro de um miócito, se aquele miócito é parte de um indivíduo ou um tecido do indivíduo, ou se aquele miócito está sendo desenvolvido *in vitro*. Assim, conforme aqui usado, a expressão "condições fisiológicas" refere-se às condições dentro de um miócito sob quaisquer condições que o miócito possa ser exposto a, ou como parte de um organismo ou quando desenvolvido *in vitro*.

Conforme aqui usado, a expressão "nível detectável de clivagem" refere-se a um grau de clivagem do RNA alvo (e formação dos RNAs de produto clivado) que é suficiente para permitir a detecção dos produtos da clivagem acima da base dos RNAs produzidos por degradação aleatória do RNA alvo. A produção de produtos de clivagem mediada por miRNA de pelo menos 1-5% do RNA alvo é suficiente para permitir a detecção acima da base para maior parte dos métodos de detecção.

Os termos "microRNA" e "miRNA" são usados de forma intercambiável e referem-se a uma molécula de ácido nucleico de cerca de 17-24 nucleotídeos que é produzida a partir de um pri-miRNA, um pre-miRNA ou um equivalente funcional. Os miRNAs devem ser contrastados com RNAs interferentes curtos (siRNAs), embora no contexto de miRNAs e siRNAs fornecidos de forma exógena, esta distinção pode ser de um pouco artificial. A distinção para manter em mente é que um miRNA é necessariamente o produto da atividade da nuclease em uma molécula em forma de grampo tal como foi aqui descrito, e um siRNA pode ser gerado a partir de uma molécula de RNA de filamento duplo ou uma

molécula em forma de grampo. Informação adicional relacionada aos miRNAs geralmente, assim como uma base de dados de miRNAs publicados conhecidos e ferramentas de pesquisa para exploração da base de dados, pode ser encontrada em Wellcome Trust Sanger Institute *miRBase::Sequences Website*, aqui incorporado para referência. Veja também, *The microRNA Registry*, Griffiths-Jones S., NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111, aqui incorporado para referência.

Conforme aqui usado, o termo "RNA" refere-se a uma molécula compreendendo pelo menos um resíduo de ribonucleotídeo. Por "ribonucleotídeo" pretende-se dizer um nucleotídeo com um grupo hidroxi na posição 2' de uma metade β -D-ribofuranose. Os termos abrangem RNA de filamento duplo, RNA de filamento único, RNAs com regiões tanto de filamento duplo quanto de filamento único, RNA isolado tal como RNA parcialmente purificado, RNA essencialmente puro, RNA sintético e RNA produzido de forma recombinante. Assim, os RNAs incluem, mas não estão limitados às transcrições de mRNA, precursores de miRNAs e miRNA, e siRNAs. Conforme aqui usado, o termo "RNA" é também objetivado para abranger RNA alterado ou RNA análogo, que são RNAs que diferem do RNA que ocorre naturalmente pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleotídeos. Tais alterações podem incluir adição de material que não seja nucleotídeo, tal como à(s) extremidade(s) do RNA ou internamente, por exemplo, em um ou mais nucleotídeos do RNA. Os nucleotídeos nas moléculas de RNA do assunto presentemente divulgado podem também compreender nucleotídeos não padronizados,

tais como nucleotídeos que ocorrem de forma não natural ou nucleotídeos quimicamente sintetizados ou desoxinucleotídeos. Estes RNAs alterados podem ser referidos como análogos ou análogos de um RNA que ocorre naturalmente.

Conforme aqui usada, a expressão "RNA de filamento duplo" refere-se a uma molécula de RNA onde pelo menos uma parte dela está em pareamento de base de Watson-Crick formando um díplice. Como tal, o termo deve ser compreendido para abranger uma molécula de RNA que ou completamente ou apenas parcialmente de filamento duplo. RNAs de filamento duplo exemplares incluem, mas não estão limitados a moléculas compreendendo pelo menos dois filamentos de RNA distintos que são ou parcialmente ou completamente duplexados por hibridização intermolecular. Adicionalmente, o termo é objetivado para incluir uma molécula de RNA única que por hibridização intramolecular pode formar uma região de filamento duplo (por exemplo, um em forma de grampo). Assim, conforme aqui usadas, as expressões "hibridização intermolecular" e "hibridização intramolecular" referem-se às moléculas de filamento duplo para as quais os nucleotídeos envolvidos na formação do díplice estão presentes em moléculas diferentes ou na mesma molécula, respectivamente.

Conforme aqui usada, a expressão "região de filamento duplo" refere-se a qualquer região de uma molécula de ácido nucleico que está em uma conformação de filamento duplo através de uma ligação de hidrogênio entre os nucleotídeos incluindo, mas não limitado à ligação de hidrogênio entre citosina e guanosina, adenosa e timidina, adenosa e

uracila, e qualquer outro díplice de ácido nucleico como será compreendido por qualquer um habilitado na técnica. O comprimento da região de filamento duplo pode variar de cerca de 15 pares de base consecutivos a vários milhares de 5 pares de base. Em algumas modalidades, a região de filamento duplo possui pelo menos 15 pares de base, em algumas modalidades entre 15 e 300 pares de base e em algumas modalidades entre 15 e cerca de 60 pares de base. Conforme descrito aqui acima, a formação da região de 10 filamento duplo resulta da hibridização dos filamentos de RNA complementares (por exemplo, um filamento sentido e um filamento anti-sentido) ou através de uma hibridização intermolecular (isto é, envolvendo 2 ou mais moléculas de RNA distintas) ou através de uma hibridização 15 intramolecular, esta última pode ocorrer quando uma molécula de RNA única contém regiões auto-complementares que são capazes de se hibridizarem entre si na mesma molécula de RNA. Estas regiões auto-complementares são tipicamente separadas por um estiramento curto de 20 nucleotídeos (por exemplo, cerca de 5-10 nucleotídeos) de forma que o evento da hibridização intramolecular forme o que é chamado na técnica como "em forma de grampo" ou "estrutura haste-alça"

III. Ácidos Nucleicos

25 As moléculas de ácido nucleico empregadas de acordo com o assunto presentemente divulgado incluem moléculas de ácido nucleico codificando um produto do gene de miócito, assim como as moléculas de ácido nucleico que são usadas de acordo com o assunto presentemente divulgado para modular a 30 expressão de um gene de miócito (por exemplo, uma molécula

de ácido nucleico de miRNA). Assim, as moléculas de ácido nucleico empregadas de acordo com o assunto presentemente divulgado incluem, mas não estão limitadas às moléculas de ácido nucleico aqui descritas. Por exemplo, as moléculas de ácido nucleico empregadas aqui incluem, mas não estão limitadas a miR-1 (UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA, Id. de Seq. n°: 1), miR-133 (UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU, Id. de Seq. n°:2), miR-206 (UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG, Id. de Seq. n°:3), miR-208 (AUAAGACGAGCAAAAGCUUGU, Id. de Seq. n°:4), miR-22 (AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU, Id. de Seq. n°:5), miR-26 (UUCAAGUAAUyCAGGAUAGGy(U), Id. de Seq. n°:6), miR-29 (UAGCACCAUyUGAAAUCrGU(kUU), Id. de Seq. n°:7), miR-30 (ykUwmAswysshhsywUvnvv(bC), Id. de Seq. n°:8), miR-128 (UCACAGUGAACCGGUCUCUUUy, Id. de Seq. n°:9), miR-143 (UGAGAUGAAGCACUGUAGCUA, Id. de Seq. n°:10) e miR-145 (GUCCAGUUUUUCCAGGAAUCCUU, Id. de Seq. n°:11), seqüências substancialmente idênticas àquelas aqui descritas (por exemplo, em algumas modalidades, seqüências pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas a qualquer Id. de Seq. n°: 1-11), e subseqüências e seqüências alongadas destas. O assunto presentemente divulgado também abrange genes, cDNAs, genes quiméricos e vetores compreendendo as seqüências de ácido nucleico divulgadas.

Códigos de nucleotídeo de uma letra são usados acima e em qualquer lugar aqui e estão de acordo com o Padrão WIPO ST.25 (1998), Apêndice 2, Tabela 1, (M.P.E.P. 2422, Tabela 1), aqui incorporado para referência. Particularmente, os códigos de uma letra a seguir representa, o(s) nucleotídeo(s) exposto(s) na Tabela 1. O(s) nucleotídeo(s)

entre parênteses (por exemplo, (n)) é/são objetivado(s) para significar que o(s) nucleotídeo(s) pode(m) estar presente(s) ou ausente(s). Também, a Figura 21 lista as seqüências individuais possíveis para Id. de Seq. n°s: 5-11 5 com base nas permutações de nucleotídeos expostas em Id. de Seq. n°s: 5-11.

Tabela 1 - Abreviações de Nucleotídeo de Uma Letra

A	adenina
G	guanina
C	citosina
T	timina
U	uracila
k	G ou U/T
w	U/T ou A
m	C ou A
s	G ou C
h	A, C ou U/T
v	G, A ou C
b	C, G ou U/T
n	A, G, C ou U/T
y	C ou T/U

Uma seqüência de nucleotídeo exemplar empregada nos métodos aqui divulgados compreendem seqüências que são 10 complementares entre si, as regiões complementares sendo capazes de formar um díplice de, em algumas modalidades, pelo menos 15 a 300 pares de base, e em algumas

modalidades, pelo menos cerca de 15-24 pares de base. Um filamento do díplice compreende uma seqüência de ácido nucleico de pelo menos 15 bases contíguas possuindo uma seqüência de ácido nucleico de uma molécula de ácido nucleico do assunto presentemente divulgado. Em um exemplo, um filamento do díplice compreende uma seqüência de ácido nucleico compreendendo 15, 16, 17 ou 18 nucleotídeos, ou mesmo mais longas onde desejado, tal como 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos, ou até o comprimento total de qualquer um daquelas seqüências de ácido nucleico aqui descritas. Tais fragmentos podem ser facilmente preparados através, por exemplo, da sintetização de forma direta do fragmento por síntese química, pela aplicação de tecnologia de amplificação de ácido nucleico, ou pela introdução de seqüências selecionadas em vetores recombinantes para produção recombinante. A expressão "hibridizar especificamente a" refere-se à ligação, duplexação ou hibridização de uma molécula apenas a uma seqüência de nucleotídeo particular sob condições severas quando essa seqüência está presente em uma mistura de ácido nucleico complexo (por exemplo, DNA ou RNA celular total).

O termo "subseqüência" refere-se a uma seqüência de uma molécula de ácido nucleico ou molécula de aminoácido que compreende uma parte de uma seqüência de ácido nucleico ou aminoácido mais longa. Uma subseqüência exemplar é uma seqüência que compreende parte de uma região duplexada de um pri-miRNA ou um pre-miRNA ("precursores de miRNA", incluindo, mas não limitada aos nucleotídeos que se tornam miRNA maduro após a ação da nuclease ou uma região de filamento único em um precursor de miRNA.

O termo "seqüência alongada" refere-se a uma adição de nucleotídeos (ou outras moléculas análogas) incorporados no ácido nucleico. Por exemplo, uma polimerase (por exemplo, uma DNA polimerase) pode adicionar seqüências na terminação 5 3' da molécula de ácido nucleico. Além disso, a seqüência de nucleotídeo pode ser combinada com outras seqüências de DNA, tais como promotores, regiões promotoras, melhoradores, sinais de poliadenilação, seqüências intrônicas, sítios de enzima de restrição adicionais, 10 sítios de clonagem múltipla e outros segmentos de codificação.

Os ácidos nucleicos do assunto presentemente divulgado podem ser clonados, sintetizados, recombinantemente alterados, mutagenizados ou sujeitados a combinações destas 15 técnicas. DNA recombinante padrão e técnicas de clonagem molecular usadas para isolar ácidos nucleicos são conhecidos na técnica. Métodos não limitantes exemplares são descritos por Silhavy e outros, 1984⁴⁶, Ausubel e outros, 1989³⁶, Glover & Hames, 1995⁴⁷ e Sambrook & Russell, 2001⁴⁰. Mutagênese sítio-específica para criar mudanças, 20 deleções ou pequenas inserções de par de base é também conhecida na técnica conforme exemplificado pela publicações (veja, por exemplo, Adelman e outros, 1983⁴⁸; Sambrook & Russell, 2001⁴⁰).

25 IV. Vetores de Expressão de miRNA

Em algumas modalidades do assunto presentemente divulgado, as moléculas de miRNA ou moléculas precursoras de miRNA são expressadas a partir das unidades de transcrição inseridas nos vetores de ácido nucleico 30 (alternativamente referido aqui geralmente como "vetores

recombinantes" ou "vetores de expressão"). Um vetor pode ser usado para entregar uma molécula de ácido nucleico codificando um miRNA em um miócito para ter como alvo um gene específico. Os vetores recombinantes podem ser, por exemplo, plasmídios de DNA ou vetores virais. Uma variedade de vetores de expressão são conhecidos na técnica. A seleção do vetor de expressão apropriado pode ser feita com base em vários fatores, mas não limitados ao tipo de célula onde se deseja a expressão.

O termo "vetor" refere-se a um ácido nucleico capaz de transportar um outro ácido nucleico ao qual ele foi ligado. Os vetores incluem aqueles capazes de replicação e expressão autônoma dos ácidos nucleicos aos quais eles estão ligados. Vetores capazes de direcionar a expressão dos genes ao quais eles estão operativamente ligados são referidos aqui como "vetores de expressão". Em geral, os vetores de expressão de utilidade em técnicas recombinantes estão freqüentemente na forma de plasmídios. Entretanto, o assunto presentemente divulgado é objetivado para incluir outras formas de vetores de expressão que apresentam funções equivalentes e que se tornam conhecidas na técnica subseqüentemente até aqui.

O termo "vetor de expressão" conforme aqui usado refere-se a uma seqüência de nucleotídeo capaz de direcionar a expressão de uma seqüência de nucleotídeo particular em uma célula hospedeira apropriada, compreendendo um promotor operativamente ligado à seqüência de nucleotídeo de interesse que está operativamente ligada às seqüências de término de transcrição. Ele também compreende tipicamente seqüências exigidas para a tradução

adequadas da seqüência de nucleotídeo. A construção compreendendo a seqüência de nucleotídeo de interesse pode ser química. A construção pode também ser uma que ocorra naturalmente mas que tenha sido obtida em uma forma recombinante útil para expressão heteróloga. A seqüência de nucleotídeo de interesse, incluindo quaisquer seqüências adicionais determinadas para efetuar a expressão adequada das seqüências de nucleotídeo, pode também ser referida como um "cassete de expressão".

Os termos "gene heterólogo", "seqüência de DNA heterólogo", "seqüência de nucleotídeo heterólogo", "molécula de ácido nucleico exógena" ou "segmento de DNA exógeno", conforme aqui usados, cada um, refere-se a uma seqüência que origina-se de uma fonte alheia a uma célula hospedeira objetivada ou, se da mesma fonte, é modificada de sua forma original. Assim, um gene heterólogo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular mas foi modificada, por exemplo por mutagênese ou por isolamento das seqüências reguladoras transpcionais nativas. Os termos também incluem cópias múltiplas que não ocorrem naturalmente de uma seqüência ocorrendo naturalmente. Assim, os termos podem se referir a um segmento de DNA que é alheio ou heterólogo à célula, ou homólogo à célula mas em uma posição dentro do ácido nucleico da célula hospedeira onde o elemento não é encontrado de forma ordinária.

O termo "promotor" ou "região promotora", cada uma refere-se a uma seqüência de nucleotídeo dentro de um gene que é está na posição 5' em relação a uma seqüência codificadora e funciona para direcionar a transcrição da

seqüência codificadora. A região promotora compreende um sítio de início transcripcional, e pode adicionalmente incluem um ou mais elementos reguladores transcricionais. Em algumas modalidades, um método do assunto presentemente 5 divulgado emprega um promotor de RNA polimerase III.

Um "promotor mínimo" é uma seqüência de nucleico que possui os elementos mínimos exigido para permitir que a transcrição a nível basal ocorra. Como tal, os promotores mínimos não são promotores completos mas em vez disso são 10 sub-seqüências de promotores que são capazes de direcionar um nível bases de transcrição de uma construção repórter em um sistema experimental. Os promotores mínimos incluem mas não estão limitados ao promotor mínimo de citomegalovírus (CMV), promotor mínimo de timidina quinase do vírus do 15 herpes simplex (HSV-tk), promotor mínimo do vírus simian 40 (SV40), promotor mínimo de β -actina humana, promotor mínimo de EF2 humano, promotor mínimo de E1B de adenovírus e o promotor mínimo de proteína de choque térmico 70 (hsp). Os promotores mínimos são freqüentemente aumentados com um ou 20 mais elementos reguladores transcricionais para influenciar a transcrição de um gene operativamente ligado. Por exemplo, os elementos reguladores transcricionais específicos ao tipo de célula ou específicos a tecido podem ser adicionados aos promotores mínimos para criar 25 promotores recombinantes que direcionam a transcrição de uma seqüência de nucleotídeo operativamente ligada de uma maneira específica ao tipo de célula ou específica a tecido. Conforme aqui usado, o termo "promotor mínimo" também abrange um derivado funcional de um promotor 30 divulgado aqui, incluindo, mas não limitado a um promotor

de RNA polimerase III (por exemplo, um promotor H1, 7SL, 5S ou U6), um promotor de adenovírus VA1, um promotor Vault, um promotor de RNA telomerase e um promotor do gene de tRNA.

5 Promotores diferentes possuem combinações diferentes de elementos reguladores transcricionais. Se um gene é ou não expresso em uma célula depende da combinação dos elementos reguladores transcricionais particulares que constituem o promotor do gene e os fatores de transcrição 10 diferentes que estão presentes dentro do núcleo da célula. Como tal, os promotores são freqüentemente classificados como "constitutivos", "específico a tecido", "específico ao tipo de célula" ou "indutível", dependendo de suas atividades funcionais *in vivo* ou *in vitro*. Por exemplo, um 15 promotor constitutivo é um que seja capaz de direcionar a transcrição de um gene em uma variedade de tipos de célula (em algumas modalidades, em todos os tipos de célula) de um organismo. Promotores constitutivos exemplares incluem os promotores para os seguintes genes que codificam certas 20 funções constitutivas ou de "organização": hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), dihidrofolato reductase (DHFR; (Scharfmann e outros, 1991), adenosina desaminase, fosfoglicerato quinase (PGK), piruvato quinase, fosfoglicerato mutase, o promotor de β -actina (ver, por 25 exemplo, Williams e outros, 1993), e outros promotores constitutivos conhecidos daqueles habilitados na técnica. Os promotores "específicos a tecido" ou "específicos ao tipo de célula", por outro lado, direcionam a transcrição em alguns tecidos ou tipos de célula de um organismo mas 30 são inativos em alguns ou todos os outros tecidos ou tipos

de célula. Promotores específicos a tecido exemplares incluem aqueles promotores descritos em maiores detalhes aqui abaixo, assim como outros promotores específicos a tecido ou específico ao tipo de célula conhecidos daqueles 5 habilitados na técnica.

Quando usado no contexto de um promotor, o termo "ligado" conforme aqui usado refere-se a uma proximidade física dos elementos do promotor de forma que eles funcionem juntos para direcionar a transcrição de uma 10 seqüência de nucleotídeo operativamente ligada.

O termo "seqüência reguladora transcripcional" ou "elemento regulador transcripcional", conforme aqui usados, cada um, refere-se a uma seqüência de nucleotídeo dentro da região promotora que permite receptividade a um fator de 15 transcrição regulador. A receptividade pode abranger um decréscimo ou um aumento no rendimento transcripcional e é mediado pela ligação do fator de transcrição à seqüência de nucleotídeo compreendendo o elemento regulador transcripcional. Em algumas modalidades, uma seqüência reguladora transcripcional é uma seqüência de término de 20 transcrição, alternativamente referida aqui como um sinal de término de transcrição.

O termo "fator de transcrição" refere-se de maneira geral a uma proteína que modula a expressão do gene pela 25 interação com o elemento regulador transcripcional e componentes celulares para transcrição, incluindo RNA Polimerase, Fatores Associados à Transcrição (TAFs), proteínas de remodelagem de cromatina e qualquer outra proteína relevante que impactue a transcrição do gene.

Miócitos

O assunto presentemente divulgado fornece método para modular a expressão de genes em miócitos com especificidade. Em algumas modalidades, os métodos 5 compreendem contatar um miócito com um miRNA ou um vetor codificando o miRNA tido como alvo para a um gene no miócito. Ter como alvo um ou mais gene(s) particular(es) em miócito considera a manipulação da função do miócito ou o desenvolvimento (por exemplo, diferenciação) com um alto 10 nível de especificidade. Assim, em algumas modalidades, o assunto presentemente divulgado também fornece métodos para modular a função do miócito ou o desenvolvimento pelo contato de um miócito com um miRNA tido como alvo para um gene no miócito que pode modular a função do miócito ou 15 desenvolvimento.

Em algumas modalidades, o miRNA tido como alvo para um gene particular é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145 (Id. de Seq. n°s: 20 1-11, respectivamente), incluindo miRNAs possuindo seqüências pelo menos cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às seqüências expostas em qualquer uma de Id. de Seq. n°s:1-11.

25 Um miRNA é "tido como alvo para" uma molécula de RNA se ela possuir similaridade de nucleotídeo suficiente à molécula de RNA que se espera que module a expressão da molécula de RNA sob condições suficientes para que o miRNA e a molécula de RNA interajam. Em algumas modalidades, a 30 interação ocorre dentro de um miócito. Em algumas

modalidades, a interação ocorre sob condições fisiológicas. Conforme aqui usado, a expressão "condições fisiológicas" refere-se às condições *in vivo* dentro de um miócito, se aquele miócito é parte de um indivíduo ou de um tecido do 5 indivíduo, ou se aquele miócito está sendo desenvolvido *in vitro*. Assim, conforme aqui usada, a expressão "condições fisiológicas" refere-se às condições dentro de um miócito sob quaisquer condições que o miócito possa ser exposto a, ou como parte de um organismo ou quando desenvolvido 10 *in vitro*.

Em algumas modalidades, o gene tido como alvo é um gene de diferenciação de miócito ou um gene de proliferação de miócito e quando expressado pode modular a diferenciação e/ou proliferação do miócito, respectivamente. Em algumas 15 modalidades, o gene dirigido pode expressar um produto do gene que inibe a diferenciação e/ou proliferação do miócito. Assim, a inibição alvejada da expressão de um ou mais destes genes alvo de diferenciação e/ou proliferação pelo miRNA pode resultar em um aumento na diferenciação 20 e/ou proliferação do miócito tratado. Em uma modalidade exemplar não limitante do assunto presentemente divulgado, o gene de diferenciação do miócito pode codificar uma polipeptídeo de histona desacetilase 4 (HDAC4) ou uma proteína receptora de hormônio da tireóide 240 (TRAP240) e 25 o gene da proliferação do miócito pode codificar um polipeptídeo do fator de resposta sérica (SRF).

A expressão de um ou mais gene(s) de diferenciação ou proliferação de miócito pode ser alvejada para inibição da utilização de um dos miRNAs aqui divulgados. Por exemplo, 30 os miRNAs, miR-1 e miRNA-133, cada um, especificamente

alveja a região não traduzida 3' de HDAC4 e SRF, respectivamente, e inibir a expressão dos produtos de gene codificados por estes genes. Assim, em algumas modalidades do assunto presentemente divulgado, a diferenciação de um 5 miócito pode ser aumentada contatando-se o miócito com miR-1, que alveja o gene que codifica HDAC4, assim prevenindo substancialmente a expressão de HDAC4 e aumentando a diferenciação do miócito. De forma semelhante, em algumas modalidades do assunto presentemente divulgado, a 10 proliferação de um miócito pode ser aumentada contatando-se o miócito com miR-133, que alveja o gene que codifica SRF, assim prevenindo substancialmente a expressão de SRF e aumentando a proliferação do miócito.

VI. Métodos Terapêuticos

15 O assunto presentemente divulgado fornece em algumas modalidades métodos terapêuticos para tratar um dano muscular em um indivíduo. Conforme aqui divulgado, miRNAs pode ser dirigido a genes para modular a expressão dos genes. Particularmente, os genes que expressão produtos que 20 funcionam para inibir a diferenciação e/ou proliferação do miócito podem ser dirigidos pelos miRNAs para inibir a expressão destes genes, resultando em diferenciação e/ou proliferação aumentada de miócito. Também, os inibidores de miRNA podem ser dirigidos para miRNAs endógenos para 25 facilitar um aumento relativo na expressão de produtos de gene particulares de uma maneira benéfica para o tratamento do dano muscular. Adicionalmente, combinações de miRNAs e/ou inibidores de miRNA podem ser co-administrados ao dano muscular em um método para otimizar a cura do dano. 30 Diferenciação e/ou proliferação aumentada de miócito pode

ser benéfica na cura de tecido muscular danificado ou no estímulo do redesenvolvimento do tecido muscular perdido.

Assim, em algumas modalidades do assunto presentemente divulgado, métodos para tratar um dano muscular em um indivíduo compreende administrar a um local de dano muscular em um indivíduo uma quantidade efetiva de um miRNA, um vetor codificando o miRNA, um inibidor de um miRNA ou combinações destes, onde o miRNA é dirigido a um gene em um miócito no local do dano muscular.

O desenvolvimento do músculo é comparativamente o desenvolvimento e/ou a cura do músculo, tal como após o dano, pode ocorrer em fases. As fases representativas incluem proliferação de miócito não diferenciada, seguida por diferenciação dos miócitos em células maduras do tecido muscular. Assim, o reparo do tecido muscular em um local do dano muscular pode ser facilitado pela administração coordenada ao local do dano de miRNAs e/ou inibidores de miRNA que melhoram a proliferação de miócitos não diferenciados, e a administração ao local do dano de miRNAs e/ou inibidores de miRNA que melhoram a diferenciação dos miócitos proliferados em tecido muscular que funciona maduro.

Por exemplo, conforme aqui divulgado, foi determinado que o miR-1 e miR-133, cada um, executa funções distintas na modulação da proliferação e diferenciação do músculo esquelético. O miR-133 melhora a proliferação do miócito pela repressão do SRF. Contrariamente, o miR-1 promove a diferenciação do miócito tendo como alvo HDAC4, um repressor transcripcional da expressão do gene muscular. Assim, em uma modalidade representativa não limitante do

assunto presentemente divulgado, miR-133 e um inibidor de miR-1 (por exemplo, 2'-o-metil-miR-1) são primeiro co-administrados ao local do dano muscular em um primeiro momento para aumentar a proliferação do miócito no local do dano. Então, o miR-1 e um inibidor de miR-133 (por exemplo, 2'-o-metil-miR-133) são coadministrados ao local do dano muscular em um segundo momento para aumentar a diferenciação dos miócitos proliferados. A coadministração temporariamente coordenada dos miRNAs e/ou inibidores de mirNA múltiplos podem também melhorar a recuperação do dano muscular.

Em algumas modalidades, o dano muscular resulta de um trauma muscular mecânico, uma doença degenerativa muscular, um dano cardíaco, ou uma combinação destes. O trauma muscular mecânico pode ser um resultado de, por exemplo, trauma por força brusca tal como ocorre em acidentes de automóveis ou danos por perfuração, onde o tecido muscular é cortado ou dilacerado. Doenças degenerativas musculares não limitantes exemplares incluem distrofias (por exemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD)), doenças neurais motoras (por exemplo, esclerose lateral amiotrófica (ALS)), miopatias inflamatórias (por exemplo, dermatomiosites (DM)), doenças da junção neuromuscular (por exemplo, miastenia grave (MG)), miopatias endócrinas (por exemplo, miopatia hipertiroidiana (HYPTM)) e doenças musculares metabólicas (por exemplo, deficiência de fosforilase (MPD)). Danos musculares por dano cardíaco não limitantes exemplares incluem infarto do miocárdio e dano de músculo cardíaco por reperfusão.

Em algumas modalidades, o miRNA dirigido para um gene

particular é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145 (Id. de Seq. n°s: 1-11, respectivamente), incluindo miRNAs possuindo seqüências 5 pelo menos cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às seqüências expostas em qualquer uma de Id. de Seq. n°s:1-11. Em algumas modalidades, o gene é um gene de diferenciação de miócito (por exemplo, codificando HDAC4 ou TRAP240) ou um gene de 10 proliferação de miócito (por exemplo, codificando SRF).

Com relação aos métodos terapêuticos do assunto presentemente divulgado, indivíduo preferido é um indivíduo vertebrado. Um vertebrado preferido é um vertebrado de sangue quente, um vertebrado de sangue quente é mamífero. O 15 mamífero preferido é mais preferivelmente um humano. Conforme aqui usado, o termo "indivíduo" inclui tanto indivíduos humanos quanto indivíduo animais. Assim, usos terapêuticos veterinários são fornecidos de acordo com o assunto presentemente divulgado.

20 Como tal, o assunto presentemente divulgado fornece o tratamento de mamíferos tais como humanos, assim como aqueles mamíferos de importância por estarem em risco de extinção, tais como os tigres siberianos; de importância econômica, tais como os animais criados em fazendas para consumo por humanos; e/ou os animais de importância social para humanos, tais como os animais mantidos como pets ou em zoológicos. Exemplos de tais animais incluem, mas não estão limitadas a: carnívoros tais como gatos e cachorros; suínos, incluindo leitões, porcos e javali; ruminantes e/ou 25 ungulados tais como gado, boi, ovelha, girafas, cervos, 30

cabras, bisão e camelos; e cavalos. É também fornecido o tratamento de pássaros, incluindo o tratamento daqueles tipos de pássaros que estão em risco de extinção e/ou mantidos em zoológicos, assim como galinha e mais 5 particularmente aves domésticas, tais como perus, galinhas, patos, ganso, galinha d'angola e etc., uma vez que são de importância econômica para humanos. Assim, é também fornecido o tratamento de animais de criação em fazendas, incluindo, mas não limitados a suíños domesticados, 10 ruminantes, ungulados, cavalos (incluindo cavalos de corrida), aves domésticas e etc.

Métodos adequados para administrar a um indivíduo um miRNA ou um vetor codificando o miRNA inclui mas não estão limitados à administração sistêmica, administração 15 parenteral (incluindo administração intravascular, intramuscular, intraarterial), entrega oral, entrega bucal, administração subcutânea, inalação, instalação intratraqueal, implantação cirúrgica, entrega transdérmica, injeção local e injeção/bombardeamento com hiper- 20 velocidade. Onde aplicável, a infusão contínua pode aumentar o acúmulo de droga em um sítio alvo.

O modo de administração particular usado de acordo com os métodos do assunto presente depende de vários fatores, incluindo mas não limitado ao miRNA e/ou veículo do vetor 25 empregado, da severidade da condição a ser tratada, e mecanismos para metabolismo ou remoção do(s) composto(s) ativo(s) depois da administração.

O termo "quantidade efetiva" é usado aqui para se referir a uma quantidade da composição terapêutica (por 30 exemplo, uma composição compreendendo um miRNA ou um vetor

que codifica o miRNA) suficiente para produzir uma resposta biológica mensurável (por exemplo, um aumento na diferenciação de miócito e/ou proliferação). Os níveis de dosagem reais dos compostos ativos em uma composição terapêutica do assunto presentemente divulgado podem ser variados de forma a administrar uma quantidade do(s) composto(s) ativo(s) que seja efetiva para alcançar a resposta terapêutica desejada para um indivíduo e/ou aplicação particular. O nível de dosagem irá depender da variedade de fatores incluindo a atividade da composição terapêutica, formulação, rota de administração, combinação com outras drogas ou tratamentos, severidade da condição que está sendo tratada, e da condição física e história médica anterior do indivíduo que está sendo tratado. Preferivelmente, a dose mínima é administrada, e a dose é gradativamente aumentada na ausência de toxicidade limitada por dose a uma quantidade minimamente efetiva. A determinação e ajuste de uma dose efetiva, assim como a avaliação de quando e como fazer tais ajustes, estão inseridos na habilidade comum da técnica.

EXEMPLOS

Os seguintes Exemplos foram incluídos para ilustrar os modos do assunto presentemente divulgado. À luz da presente divulgação e o nível geral de habilidade na técnica, aqueles habilitados poderão avaliar que os seguintes Exemplos são objetivados para serem exemplares apenas e que numerosas mudanças, modificações, e alterações podem ser empregadas sem se afastar do escopo do assunto presentemente divulgado.

30 EXEMPLO 1

A fim de compreender o envolvimento dos micro-RNAs (miRNAs) na proliferação e diferenciação de músculo esquelético, analisou-se a expressão dos miRNAs durante a diferenciação do músculo esquelético usando-se a análise de 5 microarranjos estabelecida⁹. Escolheu-se usar mioblastos C2C12 porque esta linha de células imita fielmente a diferenciação *in vitro* do músculo esquelético uma vez que mioblastos podem ser induzidos para se tornarem miotubos diferenciados terminalmente quando soro é retirado do meio 10 de cultura¹⁰⁻¹². Descobri-se que a expressão de uma fração dos miRNAs examinada foi regulada em mioblastos/miotubos de C2C12 diferenciados (Figura 1a e Figura 6). O aumento na expressão de miR-1 e miR-133 em mioblastos diferenciados 15 foi confirmada por análise de Northern blot (Figura 1b e Figura 7).

EXEMPLO 2

miR-1 e miR-133 são especificamente expressos em tecidos cardíaco de adulto e tecidos do músculo esquelético, mas não em outros tecidos testados (Figura 1C, 20 Figura 8). Entretanto, pouco é conhecido sobre a distribuição termoespacial de miRNAs específicos durante o desenvolvimento de mamífero. Examinou-se portanto a expressão do miR-1 e miR-133 em embriões e recém-nascidos de camundongos. MiR-1 e miR-133 são expressos a níveis 25 muito baixos nos corações e músculo esquelético em desenvolvimento de embriões E13.5 e E16.5 (Figura 1d e Figura 8). Um nível crescente de expressão de miR-1 e miR-133 foi descoberto em corações e músculo esquelético de recém-nascido, embora ainda seja significativamente menor 30 que aquele de adultos (Figura 1e e Figura 8). Estes dados

são consistentes com as descobertas a partir de peixe zebra em que a maioria dos miRNAs é expressada relativamente tarde durante a embriogênese¹⁶.

EXEMPLO 3

5 Tanto o miR-1 quanto miR-133 estão unidos nos cromossomos 2 (separados por 9,3 kb) e 18 (separados por 2,5 kb) de camundongo (Figura 9 e referência 14). Executou-se uma análise de Northern blot usando-se marcadores genômicos de ~300 bp incluindo as seqüências de miR-1 e 10 miR-133 (Figuras 9a-9e). Os marcadores de miR-1 e miR-133 do cromossomo 18 detectaram uma única transcrição primária de ~6 kb dos RNAs totais isolados do músculo do coração e esquelético (Figuras 9b e 9c), indicando que miR-1 e miR-133 são realmente transcritos juntos. Enquanto os 15 marcadores tanto de miR-1 quanto de miR-133 do cromossomo 2 detectaram uma transcrição de ~10 kb do músculo do coração e esquelético, o marcador de miR-133 também se hibridizou a duas transcrições adicionais de ~4,5 kb e ~2,2 kb, enquanto o marcador de miR-1 também detectou uma maior transcrição 20 de ~6 kb (Figuras 9d e 9e), sugerindo o envolvimento potencial do processamento pós-transcricional. Juntos, os dados obtidos indicam que a expressão específica a músculo cardíaco e esquelético de miR-1 e miR-133 é ditada na etapa de transcrição primária.

25 **EXEMPLO 4**

Considerou-se que os elementos reguladores que controlam a transcrição dos aglomerados de miR-1 e miR-133 no cromossomo 2 e 18 são provavelmente conservados. Portanto, executou-se análise de seqüência e identificou-se 30 uma região altamente conservada (~2kb), que está situada a

aproximadamente 5 kb a montante dos aglomerados de miR-1/133 em ambos os cromossomos 2 e 18 (Figura 10). Quando este fragmento genômico do cromossomo 2 foi usado para direcionar a expressão de um gene repórter dsRed em *Xenopus* transgênico, descobriu-se expressão específica a músculo cardíaco e esquelético do transgene (Figura 10).

EXEMPLO 5

Para avaliar a função de miR-1 e miR-133 no músculo esquelético, tentou-se primeiro superexpressar miR-1 e miR-133 em células de mamíferos. Testou-se e validou-se a expressão e atividade de ambos os miRNAs usando-se análise de Northern blot assim como os "sensores"¹⁷ de miR-1 e miR-133, em que as seqüências complementares para miR-1 ou miR-133 foram clonadas a jusante de uma seqüência codificadora dsRed (Figura 11 e dados não mostrados). Transfetou-se os mioblastos C2C12 com miR-1 e miR-133 e então ou se manteve as células em meio de crescimento (GM) ou se transferiu as mesmas ao meio de diferenciação (DM) após a transfecção. MiR-1 aumentou fortemente a miogênese conforme indicado pela expressão aumentada de cadeia pesada de miosina e miogenina de marcadores miogênicos iniciais e posteriores (MHC), respectivamente, assim como outros marcadores miogênicos, incluindo MyoD, Mef2 e α -actina esquelética (Figuras 2a-2e, 2i, 2j e Tabela 2). MiR-1 induziu a expressão do gene do marcador miogênico em células mantidas em condição de crescimento de log-fase (Figura 2c) e em condição de diferenciação (Figuras 2, 2d e 2e). A diferenciação miogênica acelerada induzida por miR-1 é também acompanhada por um decréscimo na proliferação celular, conforme sinalizado por uma diminuição

significante na expressão de fosfo-histona H3 (Figuras 2, 2c, 2e e Tabela 2). De significação particular, a miogênese induzida por miR-1 é específica, uma vez que a superexpressão de um controle de GFP ou miR-208, que não é endogenamente expressado em miócitos esqueléticos, não mostrou nenhum efeito (Figuras 2a-2e). Além disso, as mutações introduzidas nas seqüências "semente" de miR-1 anularam sua capacidade de ativar a expressão do gene miogênico (Figuras 2d-2e). Contrariamente, a superexpressão de miR-133 reprimiu a expressão da miogenina e MHC (Figura 2, a-e e Tabela 2) e promoveu a proliferação de mioblasto (Figuras 2c-2e e Tabela 2). Novamente, o efeito de miR-133 na proliferação de mioblastos é específica, uma vez que os controles não mostraram nenhum efeito e a mutação introduzida anulou a função de miR-133 (Figuras 2a-2e, 2j).

Tabela 2

Efeito na proliferação e diferenciação miogênica por superexpressão e silenciamento de miR-1 e miR-133

Tratamento	DM (8 hr)				DM (12hr)				DM (24 hr)			
	Celulas	Em	Celulas		Celulas	Em	Celulas		Celulas	Em	Celulas	
			positivas	relação			positivas	relação			positivas	relação
miogenina	controle	miogenina	controle	miogenina	controle	fosfo-H3	controle	miogenina	controle	fosfo-H3	controle	controle
GFP	172	100%	93	100%	135	100%	115	100%	137	100%	22	100%
miR-1	206	121%	230	247,3%	93	68,9%	251	212,7%	76	55,5%	56	254,5%
miR-133	89	51,7%	68	73,1%	168	124,4%	93	78,8%	201	146,7%	12	54,5%
2'-o-metil-GFP	146	100%	145	100%	172	100%	348	100%	207	100%	22	100%
2'-o-metil-miR-1	120	82,2%	98	67,6%	214	124,4%	299	85,9%	283	136,7%	18	81,8%
2-o-metil-miR-	205	140,4%	211	145,5%	107	62,2%	498	143,1%	191	92,3%	44	200%
	133											

Executou-se o experimento recíproco onde se fez a transfecção dos mioblastos C2C12 com os oligos inibitórios anti-sentido de 2'-o-metil de miR-1 ou miR-133 (ou GFP de controle e miR-208), que mostraram inibir a função dos 5 miRNAs^{18,19}. As células transfectadas com o inibidor de miR-1 apresentou inibição de miogênese e promoção da proliferação de mioblasto, conforme indicado por um decréscimo nos marcadores miogênicos e um aumento em fosfohistona H3 (Figuras 2f-2i e Tabela 2). Consistente com a 10 função de miR-133 na promoção da proliferação de mioblasto e repressão da diferenciação, a inibição de miR-133 causou um efeito oposto, onde a miogênese foi aumentada e a proliferação celular reprimida (Figuras 2f-2j e Tabela 2). Contrariamente, os inibidores de 2'-o-metil de controle não 15 apresentaram nenhum efeito (Figuras 2f-2j). Concluiu-se que o miR-1 e miR-133 possuem funções distintas na proliferação e diferenciação do músculo esquelético: miR-1 promove a diferenciação de mioblasto, enquanto que o miR-133 estimula a proliferação de mioblastos.

20 **EXEMPLO 6**

Tanto miR-1 quanto miR-133 foram encontrados na maioria das espécies animais, de *Drosophila* a humano, sugerindo que eles são conservados de maneira evolucionária. Para testar os efeitos de miR-1 e miR-133 no 25 desenvolvimento do músculo esquelético e coração *in vivo*, identificou-se cópias de miR-1 e miR-133 em *Xenopus* e testou-se sua função através da expressão errada. A introdução de miR-1 no estágio de uma célula leva a um eixo dramaticamente encurtado com redução associada nas 30 estruturas anteriores e um aumento no tamanho do corpo ao

longo do eixo dorsal-ventral comparado ou aos controles não injetados ou injetados com miGFP ($n > 45$, dois experimentos independentes) (Figura 3). Embora os somitos formados nos embriões injetados com miR-1 (Figura 3), mancha de anticorpo integral e seccionamento serial revelaram que o tecido é altamente desorganizado e falha ao se desenvolver em estruturas segmentadas (Figuras 3e, 3f, 3j). O tecido cardíaco está completamente ausente conforme julgado por histologia, mancha de tropomiosina (Figuras 3f, 3j) e mancha de actina cardíaca. Além destes efeitos, há um decréscimo dramático na mancha de fosfo-histona H3 (Figuras 31-3k), consistente com a função essencial de miR-1 na regulação da proliferação e diferenciação de miócito. Embora a expressão errada de miR-133 também leve a uma redução nas estruturas anteriores e detecte o desenvolvimento de somito, contrariamente ao miR-1, há apenas uma modesta redução no comprimento anterior-posterior e defeitos somáticos são mais severos nos aspectos mais anteriores e posteriores do embrião onde os somitos falham ao se formarem (Figuras 3g, 3h). Além disso, o tecido cardíaco freqüentemente se forma nos embriões de miR-133, ainda que isto seja altamente desorganizado e falhe ao passar pelo ciclo cardíaco ou formação da câmara (Figuras 3g, 3h, 3k). Coletivamente, estes dados sugerem que o tempo correto e os níveis tanto de miR-1 quanto de miR-133 são necessários para o desenvolvimento adequado do músculo esquelético e do coração.

EXEMPLO 7

HDAC4 contém dois sítios de miR-1 sabido como ocorrendo naturalmente em sua UTR 3', que são

evolucionariamente conservados entre as espécies dos vertebrados (Figura 12). Similarmente, dois sítios de ligação de miR-133 conservados são encontrados na UTR 3' do gene SRF de mamífero (Figura 12), que mostraram executar um 5 importante papel na proliferação e diferenciação muscular *in vitro* e *in vivo*^{11,24,25}.

Fundiu-se as UTRs 3' de SRF e HDAC4 de camundongo a um gene repórter de luciferase e transfecção das construções junto com os controles de transfecção dentro de 10 células de mamífero. A superexpressão ectópica de miR-1 reprimiu fortemente um gene repórter de luciferase em UTR 3' de HDAC4, enquanto que o miR-133 inibiu a expressão do gene repórter de luciferase em UTR 3' de SRF (Figura 4a). Contrariamente, as mutações introduzidas nas seqüências de 15 "semente" de miR-1 e miR-133 aboliram tal repressão, indicando a especificidade da ação (Figura 4a).

Quando os repórteres acima foram transfetados em mioblastos C2C12 e a atividade da luciferase medida antes e 20 após a indução da diferenciação celular, descobriu-se que a atividade do repórter foi dramaticamente reprimida nas células diferenciadas (Figura 4b), indicando que níveis aumentados de miR-1 e miR-133 endógenos inibiram o gene repórter. Os efeitos e a especificidade de miR-1 e miR-133 25 endógenos foram monitorados pelo "sensor" de miRNA (Figura 11). Contrariamente, a atividade da luciferase do repórter MCK-luc, um indicador de diferenciação de músculo, foi aumentada nos miócitos diferenciados (Figura 4b). Além disso, a superexpressão de miR-1 levou à regulação para baixo da proteína HDAC4 endógena nas células C2C12 tanto na 30 condição de crescimento (Figura 4c) quanto na condição de

diferenciação (Figura 4e), enquanto que o miR-133 reprimiu a expressão de proteínas SRF endógenas (Figuras 4c, 4e). Contrariamente, os níveis de SRF e HDAC4 não foram alterados por aqueles miRNAs (Figura 4d), sustentando a 5 idéia de que miRNAs reprimem a função de seus genes alvo principalmente através da inibição da tradução. Quando os oligos de 2'-o-metil-anti-sentido contra miR-1 ou miR-133 foram aplicados, eles abrandaram a repressão exercida nos níveis de proteína de HDAC4 ou SRF, respectivamente (Figura 10 4g), com nenhum efeito nos seus níveis de mRNA (Figura 4f).

Para também verificar que HDAC4 e SRF são alvos cognatos para miR-1 ou miR-133 na regulação da expressão do gene de músculo esquelético, testou-se se a cotransfecção dos plasmídios de expressão para SRF ou HDAC4 poderão 15 "suprimir" a miogênese mediada por miRNA. Realmente, conforme mostrado na Figura 4h, a superexpressão de SRF reverteu parcialmente a repressão do gene miogênico induzido por miR-133. Contrariamente, o HDAC4 agiu contra os efeitos de miR-1 na expressão do gene do músculo 20 esquelético (Figura 4h).

Consistente com o envolvimento potencial de HDAC4 e SRF na proliferação e diferenciação de músculo esquelético dependente de miR-1 e miR-133, os níveis de proteína de HDAC4 e SRF endógenos foram regulados para baixo em células 25 C2C12 diferenciadas, com um aumento concomitante na expressão de marcadores de diferenciação miogênicos e um decréscimo na expressão da fosfo-histona H3 do marcador de índice mitótico (Figura 4i e Figura 7d). A expressão diminuída de proteínas SRF e HDAC4 foi acompanhada por um 30 aumento na expressão de miR-1 e miR-133 (compare a Figura

4i com a Figura 1b). Juntos, estes dados demonstram que
 miR-1 e miR-133 reprimem especificamente os níveis de
 proteína de HDAC4 e SRF, respectivamente, que
 sucessivamente, contribui para (pelo menos em parte) os
 5 efeitos reguladores daqueles miRNAs na diferenciação e
 proliferação de mioblasto.

Foram caracterizados o miR-1 e o miR-133 específicos a músculo cardíaco e esquelético e mostrou-se sua função no controle da proliferação e diferenciação de músculo 10 esquelético. De importância, descobriu-se que o miR-1 e o miR-133, que estão aglomerados no mesmo loci cromossômico e transcritos juntos como uma transcrição única, tornaram-se 15 dois miRNAs maduros e independentes com funções biológicas distintas alcançadas pela inibição de diferentes genes alvos. Isto implica no envolvimento de miRNAs em mecanismos moleculares complexos. De forma interessante, enquanto a expressão tecido específica de miR-1 e miR-133 é controlada por myoD e SRF⁸, a expressão de SRF é reprimida por miR- 20 133. Portanto, estas descobertas revelam um ciclo regulador negativo em que os miRNAs participam nas rotas reguladoras para controlar a proliferação e diferenciação celular (Figura 5).

MATERIAIS E MÉTODOS PARA OS EXEMPLOS 1-7

Análise da expressão de microRNA por microarranjo

25 RNA total foi isolado de células C2C12 postas em cultura em meio de crescimento (GM) consistindo de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) ou meio de diferenciação (DM) consistindo de DMEM (Sigma) com soro de cavalo 2% 30 (Sigma) em diferentes momentos (dias 0, 1, 3 e 5 com o

primeiro dia de transferência em DM contato como dia 0). A hibridização microarranjo foi executada e os dados foram analisados conforme descrito⁹. Resumidamente, 2,5 µg de RNA isolado foi marcado com 5'-fosfato0citidil-uridil-ci3-3' (Dharmacon, Inc., Lafayette, Colorado, U.S.A.) usando-se RNA ligase e hibridizado com mistura 0,5 mM de provas de oligonucleotídeo para 124 microRNAs marcados com ALEXA 647® (Ci5) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, U.S.A.) em câmaras descartáveis (MJ Research, Reno, Nevada, U.S.A.; número de peça SLF-0601). Os dados de log normalizados (base 2) foram hierarquicamente aglomerados pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. A faixa de sinal era de -4 vezes a + 4 vezes. Amarelo denota alta expressão e azul denota baixa expressão, em relação ao valor médio.

15 Análise de Northern blot

O RNA total foi extraído de células C2C12, tecido adulto ou embriônico de camundongo usando-se Reagente TRIZOL® (Invitrogen). Para a análise de Northern blot de miRNA, PG foi aplicado para remover RNAs de tamanho grande. Resumidamente, 30 µg de cada amostra de RNA total foram misturadas 1:1 com solução de PEG 5X e colocados em gelo por 10 minutos. Após 10 minutos, centrifugou-se a uma velocidade máxima de 4°C, o sobrenadante foi transferido a um tubo novo. Os RNAs foram então precipitados adicionando-se 2,5 volumes de EtOH 100% e centrifugado por 30 minutos à velocidade máxima. A análise de Northern blot para miRNAs foi executada conforme descrito¹³. Seqüências de oligonucleotídeo de miR-1 e miR-133 usadas como marcadores estão listadas na Tabela 3. A análise de Northern blot foi usada para detectar as transcrições primárias de miRNAs e

foi executada conforme descrito²⁶, usando-se 20 µg de RNA total de cada amostra. Fragmentos genômicos para miR-1 e miR-133 foram clonados por PCR e servem como marcadores.

Tabela 3

5 Seqüências de Oligonucleotídeos Aqui Divulgadas

Nome	Seqüência
Marcador miR-1	TACATACTTCTTACATTCCA
Marcador miR-133	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAA
miR-133a-1 para cima	CATGTGACCCCTCACACACA
miR-133a-1 para baixo	ACAAGGGGAGCCTGGATCCC
miR-133a-2 para cima	GGACATATGCCTAACACACGTGA
miR-133a-2 para baixo	GAAACATCTTATCCAGTTT
miR-1-2 para cima	AGACTGAGACACAGGCGACACC
miR-1-2 para baixo	TGCCGGTCCATCGGTCCATTGC
miR-1-1 para cima	CACTGGATCCATTACTCTTC
miR-1-I para baixo	TTGGAATGGGGCTGTTAGTA
miR-1mut para cima	TGAACATTCACTGCTATAAAGAAGTATGTATTTGGGTAGGTA
miR-1mut para baixo	TACCTACCCAAATACATACTTCTTATAGCACTGAATGTTCA
miR-133mut para cima	AATCGCCTCTCAATGGATrTGTCAACCAGCTGTAGCTATGCATTGAT
miR-133mut para baixo	ATCMTGCATAGCTACAGCTGGTGACAAATCCATTGAAGAGGCGATT
Dúplice de miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUACAUUCCAUA
Dúplice de miR-1-mut	UUAACCAUAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUAUGGUUMUA
Dúplice de miR-133	UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGGGGACCAAAU
Dúplice de miR-133- mut	UCAAGUAACUUCAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGUUACUUGAAU
Dúplice de miR-208	AUMGACGAGCAAAAGCUUGU AAGCUUUUUGCUCGUCUUUAAC

Dúplice de GFP	AACUUCAGGGUCAGCUUGCCUU
	GGCAAGCUGACCCUGAAGUUGG
2'-O-metil-miR-1	AAAUAACAUACUUUCUUACAUUCCAUAGC
2'-O-metil-miR-133	AGCUACAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAUCCA
2'-O-metil-miR-208	GACCAACAAGCUUUUUGCUCGUUAUACGUG
2'-O-metil-GFP	AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
HDAC4-UTR para cima	CAGCACTGGTGATAGACTTGG
HDAC4-UTR para baixo	CTTAAGAATAAGTTCAATAAGAC
SRF-UTR para cima	AGATATGGGGCTTGTGCC
SRF-UTR para baixo	CTGGGAGAAAGGGGGTAGAC
Miogenina F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC
Miogenina R	TGGACAATGAGGGTCCC
MioD F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC
MioD R	TGCAGTCGATCTCTCAAAGCACC
α-actina F Esquelética	CAGAGCAAGCGAGGTATCC
α-actina R Esquelética	GTCCCCAGAATCCMCACG
MEF2D F	CAAGCTGTTCCAGTATGCCAG
MEF2D R	AAGGGATGATGTCACCAGGG
HDAC4 F	GAGAGAATTCTGCTAGCAATGAGCTCCAA

Clonagem e Expressão de miR-1 e miR-133

Os fragmentos genômicos para os precursores de miR-1 e miR-133 de cromossomos de camundongo 2 e 18 (ch 2 e ch 8) foram amplificados por PCR usando-se DNA genômico de camundongo como um modelo (para iniciadores de PCR, ver Tabela 3 acima). Os produtos de PCR foram clonados no vetor pcDNA™ (+)3.1 (Invitrogen) e a expressão de miRNAs foi determinada transfetando-se os vetores de expressão dentro de células de mamífero (COS7, 10T1/2 ou C2C12) e fez-se a detecção por análise de Northern blot.

e ensaio repórter de luciferase

As células dos mioblastos C2C12 foram colocadas em cultura e a miogênese foi induzida conforme descrito¹². Os ensaios repórteres de luciferase de transfecção transitória foram executados conforme descrito^{12,26}. Os dúplices de miRNA e oligorribonucleotídeos anti-sentido de 2'-o-metil para miR-1, miR-133, miR-208 e GFP foram adquiridos a partir de Dharmacon (Ver Tabela 3 para seqüências). Eles foram introduzidos em células de mamífero usando-se ou transfecção com LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen) (200 nM) ou eletroporação usando-se o sistema NUCLEOFECTOR® (5 µg) de Amaxa Biosystems (Gaithersburg, Maryland, U.S.A.).

Para a construção repórter de luciferase-UTR 3', o sítio de clonagem múltipla do vetor pGL3-Controle (Promega, Madison, Wisconsin, U.S.A.) foi removido e colocado a jusante do gene de luciferase. UTRs 3' para HDAC4 e SRF de camundongo foram amplificados por PCR e clonados no Vetor pGL3-Controle modificado para resultar nas construções SRF-3'UTR e HDAC4-3'UTR (ver Tabela 3 para seqüências iniciadoras de PCR). Os ensaios repórteres de luciferase foram executados conforme descrito²⁶.

Northern blot e mancha imunohistoquímica

Northern blot foram executadas conforme descrito previamente²⁷. Os seguintes anticorpos foram usados: anti-miogenina, SRF, MEF2, HDAC4 e β-tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, U.S.A.); e fosfo-histona H3 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, U.S.A.). O anticorpo MF20, que reconhece o MHC específico a músculo estriado, foi obtido de DSHB (University of Iowa, Iowa City, Iowa, U.S.A.).

Para mancha imunohistoquímica, a célula C2C12 tratada em placas de 12 cavidades foi fixada com formaldeído 4% por 5 minutos a 37°C e mudou-se para solução de NP40/PBS 0,1% por 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Anticorpos primários foram incubados em NP40-PBS 0,1% com BSA 3% por 2 horas na seguinte concentração: anti-miogenina (diluição de 1: 20), anti-fosfohistona H3 (diluição de 1:100), MF20 (diluição de 1:10). Anticorpos secundários anti-camundongo/coelho conjugados à fluoresceína (diluição de 1:100, Vector Laboratories, Burlingame, California, U.S.A.) foram adicionados em NP40-PBS 0,1% com BSA 3% por 1 hora a 37°C. DAPI foi adicionado por 5 minutos a TA. Após várias lavagens com PBS, as células foram sujeitadas à observação por microscopia de fluorescência. Os campos que cobre a cavidade inteira foram selecionados e células positivas de fluorescência verde e células totais com mancha DAPI foram contadas para cada cavidade, respectivamente.

Análises por RT-PCR

RT-PCR foi executada essencialmente conforme descrito²⁷. RNA total foi extraído de células C2C12 usando-se reagente TRIZOL® (Invitrogen), e alíquotas de 2,0 µg foram transcritas de forma reversa a cDNA usando-se hexâmeros aleatórios e transcriptase reversa MMLV (Invitrogen). Para cada caso, união de cDNA 2,5% foi usada para a amplificação e PCR foi executada por 24-48 ciclos. As seqüências para iniciadores de PCR podem ser encontradas na Tabela 3.

Injeções de embrião *Xenopus* e transgênese

Métodos padrões foram utilizados na obtenção e cultura de embriões de *Xenopus laevis*. As construções de DNA foram

linearizadas com Kpn I e embriões transgênicos foram gerados de acordo com os métodos descritos por Kroll & Amaya²⁸. A expressão do transgene foi analisada sob um microscópio Leica MZFLIII. A preparação e injeção de 5 *Xenopus* com miRNAs foi executada essencialmente conforme previamente descrito²⁹. Entretanto, RNA não foi coberto antes da injeção. Análise imunohistológica integral foi executada conforme descrito³⁰.

EXEMPLO 8

10 miR-208 é um miRNA específico a músculo cardíaco conservado entre humano, camundongo e rato (Figura 14). A análise de Northern blot revelou que a expressão de miR-208 é regulada de forma desenvolvida (Figura 15). As Northern blot foram preparadas a partir de tecidos de camundongo 15 escalonado e marcado com marcador radiomarcado complementar a miR-208. Os níveis de miR-208 foram dramaticamente maiores no coração de camundongo adulto em relação a E13.5, E16.5, e corações em estágio neonatal. miR-208 é hospedado por um íntron do gene de cadeia pesada de α -miosina (α -MHC) de músculo cardíaco (Figura 14). Uma das duas 20 isoformas pesadas de miosina cardíaca, α -MHC é fracamente expressada durante o desenvolvimento do camundongo mas depois torna-se a isoforma predominante no coração do camundongo adulto. miR-208 e α -MHC são ambos específicos a 25 coração e transcritos a partir do filamento reverso, que sugere que miR-208 é processado do íntron α -MHC é expressado paralelo a uma transcrição de α -MHC.

EXEMPLO 9

30 Para investigar a função *in vitro* de miR-208 em cardiomiócitos, escolheu-se usar cardiomiócitos de rato

neonatal porque ele é um modelo bem caracterizado *in vitro* para estudo de características morfológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas de células cardíacas. Os cardiomiócitos neonatais não perdem sua capacidade de replicar após o nascimento, uma grande fração passa por divisão mitótica e prolifera-se *in vitro* e *in vivo* onde a expressão do gene cardíaco é também ativada. É provável que o miR-208 promova a diferenciação de cardiomiócito uma vez que ela é expressada altamente no coração adulto em relação ao desenvolvimento prévio. A fim de determinar a função de miR-208 no coração, este sistema de modelo é usado para estudar os efeitos da expressão de miR-1-208 e a inibição sob o programa de cardiogênese.

Sistema do modelo *in vitro*

Os cardiomiócitos em cultura são os modelos experimentais mais amplamente usados na pesquisa cardíaca. A preparação de cardiomiócitos a partir de pequenos mamíferos é econômico em relação a todos os estudos de animal, confiável e permite um amplo espectro de experimentos. Por razões econômicas e técnicas, os cardiomiócitos são mais comumente isolados de ratos neonatais. Isolou-se cardiomiócitos de rato essencialmente como previamente descrito, com menores modificações⁸⁶.

MiRNAs maduros funcionais podem ser ectopicamente expressados usando-se uma seqüência promotora Pol II de RNA para direcionar a transcrição da seqüência precursora de miRNA mais ~150 nucleotídeos flanqueadores. As transcrições de RNA resultantes são reconhecidas pelo mecanismo de processamento de miRNA e tornam-se miRNAs completamente funcionais capazes de direcionar a repressão traducional.

Amplificou-se por PCR a seqüência precursora de miR-208 e as regiões flanqueadoras do DNA genômico de camundongo e inseriu-se este fragmento em um vetor de adenovírus para gerar o adenovírus recombinante que expressa miR-208 (Ad-208). A análise de Northern blot mostra um aumento dependente da dosagem da expressão de miR-208 em cardiomiócitos isolados infectados com Ad-208 de concentrações crescentes (Figura 16). Esta ferramenta pode ser utilizada para estudar os efeitos da superexpressão de miR-208 no fenótipo de cardiomiócito *in vitro*.

Análise da expressão de miR-208 ectópica

Um ensaio de contagem de célula é usado para determinar se mudanças na expressão de miR-208 afeta a proliferação. Os cardiomiócitos são colocados em placa a baixa densidade e infectados com Ad-208. Embora o adenovírus tenha sido usado extensivamente com grande sucesso em estudos de cardiomiócitos, células com Ad-GFP podem também ser infectadas com a mesma multiplicidade de infecção (MOI) como Ad-208 para controlar os efeitos indiretos causados pela infecção adenoviral. Uma vez que ambos os vírus expressam a proteína fluorescente verde (GFP), eficiências de infecção são também controladas por microscopia de epifluorescência.

As células são contada sob iluminação de campo brilhante antes da infecção e em 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. As células em 10 campos de visão são contadas para ambas as condições em cada momento. Análises estatísticas são aplicadas aos dados de contagem celular. O *Student t-test* não pareado pode ser usado para determinar a probabilidade de que o número médio de células contado por

vista de campo difere de forma significativa entre a infecção por Ad-208 e Ad-GFP em cada momento particular, enquanto que o *Student t-test* pareado pode determinar a probabilidade de que o número médio de células contado para 5 cada infecção difere-se de forma significativa entre os momentos. Se a probabilidade de que qualquer uma das duas médias é significativamente diferente é maior que ou igual a 95%, aquelas diferenças são consideradas significantes.

O ensaio de contagem de célula é complementado com 10 estudos para determinar o índice mitótico utilizando anticorpos de fosfohistona H3 e para determinar o percentual de células que passa pela síntese de DNA pela incorporação de BrdU. Células fixas são manchada com TUNEL para excluir a possibilidade de que a superexpressão de 15 miR-208 cause a morte da célula. Resultados potenciais da infecção por Ad-208 sob proliferação de cardiomiócito são diminuídos, aumentados ou não sofrem nenhuma mudança no número celular. Sem desejar estar limitados pela teoria, é provável que a expressão de miR-208 irá retardar a 20 proliferação do cardiomiócito em relação aos controles uma vez que o miR-208 é normalmente altamente expressado em cardiomiócitos adultos diferenciados.

Um conjunto de fatores de transcrição cardíaca, incluindo Nkx2.5, MEF2C, GATA4, miocardina e TBX5 mostrou 25 ser expressado em cardiomiócitos de diferenciação inicial, tornando-os marcadores genéticos iniciais de diferenciação cardíaca. As proteínas contráteis específicas a músculo cardíaco, tais como α -MHC, β -MHC, α -CA e MLV2V, são marcadores de diferenciação terminal de cardiomiócitos. 30 Alguns destes genes cardíacos são regulados de forma

diferencial durante o desenvolvimento. Por exemplo, β -MHC é altamente expressado em coração embriônico, mas torna-se regulado para baixo de forma pós-neonatal, enquanto que α -MHC possui um padrão de expressão oposto. A fim de 5 determinar se miR-208 possui um papel na regulação da expressão de gene cardíaco, o efeito da expressão de miR-208 ectópica sob expressão do gene marcador cardíaco em cardiomiócitos de rato neonatal é examinado. Sem desejar estar limitado pela teoria, espera-se que a expressão de 10 miR-208 diminua a expressão do gene fetal e/ou promova a expressão de genes cardíacos adultos.

Usando-se métodos de transcriptase reversa-PCR (RT-PCR) semiquantitativos, os níveis de transcrição de mRNA relativos de vários genes marcadores cardíacos em 15 cardiomiócitos de rato neonatal infectados com Ad-208 versus Ad-GFP são analisados. As bibliotecas de cDNA são feitas de RNA isolado de cardiomiócitos infectados por técnicas convencionais. GAPDH, que é expressada altamente em quase todos os tecidos, é amplificada e usada para 20 normalizar os níveis de cDNA. Todos os conjuntos de iniciador de PCR são projetados para amplificar o produto que transpõe um ou mais ítron(s), que irá produzir um produto amplificado por PCR maior se a contaminação de DNA está presente. Adicionalmente, anticorpos disponíveis 25 comercialmente são usados para examinar os níveis de expressão de proteína de vários marcadores cardíacos por análise de Northern blot para determinar se quaisquer mudanças na expressão da proteína coincidem com as mudanças nos níveis de transcrição de mRNA.

30 Além de estudar os efeitos de miR-208 sob expressão do

gene cardíaco, quaisquer efeitos sob localização de várias proteínas cardíacas, incluindo fatores de transcrição e componentes estruturais são determinados. A observação de cardiomiócitos infectados com Ad-208 sugere que estas 5 células exibem diferentes morfologias para cardiomiócitos infectados com Ad-GFP (Figura 16b). Os cardiomiócitos infectados com Ad-208 parecem "arredondados" em relação as suas contrapartes infectadas com Ad-GFP.

Cardiomiócitos infectados com Ad-208 e Ad-GFP são 10 fixados em lamínulas de vidro, marcados com anticorpos primários e secundários apropriados, tingidos no núcleo, e montados em lâminas para análise microscópica.

Inativação de miR-208

Paralelamente aos estudos de superexpressão de miR-208, os efeitos da inibição de miR-208 usando-se 2'-o-metiloligonucleotídeos anti-sentido a miR-208 são estudos. Os 2'-o-metiloligonucleotídeos atuam como inibidores específicos a seqüência e irreversíveis da função de miRNA de uma forma estequiométrica. Este sistema 20 de inibição de miRNA é adaptado aos cardiomiócitos. 2'-o-metiloligonucleotídeos anti-sentido de miR-208 ou, em controles, 2'-o-metiloligonucleotídeos aleatórios são transfectados em cardiomiócitos por um reagente lipídico catiônico, ou alternativamente por eletroporação. Uma 25 construção repórter com uma seqüência de miR-208 anti-sentido ligada diretamente em 3' ao gene de luciferase (luc-miR-208-sensor) é usada como um controle e para testar a eficácia do sistema em bloquear a função do miR-208. Os 30 níveis de mRNA e proteína, assim como a localização da proteína, são estudados conforme descrito para os estudos

de superexpressão de miR-208.

EXEMPLO 10

O miR-208 é fracamente expressado no coração embriônico e sua expressão aumenta dramaticamente no coração adulto. Este exemplo analisa se a função de miR-208 é mais importante para a regulação do gene no coração em desenvolvimento ou no coração adulto. Durante o desenvolvimento, era discutido que o miR-208 é provavelmente sem importância uma vez que ele é expressado fracamente no embrião. Contra este argumento, a dosagem de miR-208 adequada pode ser importante para regular certas rotas genéticas durante o desenvolvimento. Além disso, o camundongo nocauteados de seu gene hospedeiro α -MHC, que é fracamente expressado durante o desenvolvimento em relação ao estágio adulto, sofreu de letalidade embriônica, embora não seja conhecido se a expressão do miR-208 é afetada naquele animal⁸⁷. A alta expressão de miR-208 detectada no coração adulto pode indicar que sua função mais importante encontra-se no desenvolvimento posterior. Para classificar estes tipos de resultados, dois modelos de camundongo são criados para estudar as função de miR-208: um camundongo nocauteado de miR-208 e um camundongo transgênico que condicionalmente superexpressa miR-208.

Modelo de camundongo nocauteado de miR-208

Um camundongo funcionalmente inválido para miR-208 é designado e criado sem afetar a expressão de seu gene hospedeiro α -MHC. A produção de célula tronco embriônica derivada de camundongo nocauteado de miR-208 é um processo de três estágios: produção do vetor alvo; introdução de seqüências de DNA em células tronco embriônicas por

recombinação de homólogos e produção de camundongos geneticamente modificados a partir de células tronco embriônicas. Os miRNAs relacionados estão agrupados em famílias com base na homologia de seqüência dentro de suas 5 regiões de semente. Estas famílias podem regular de forma redundante a expressão dos mesmos genes, complicando potencialmente a análise genética de sua função *in vivo*. A região de semente de miR-208 não se aglomera com outros miRNAs conhecidos em uma árvore filogenética, tornando o 10 miR-208 um candidato a nocaute de miRNA adequado.

A construção que tem como alvo miR-208 é desenvolvida usando-se uma estratégia chamada de engenharia recombinogênica, que usa recombinação homóloga entre fragmentos de DNA lineares e plasmídios circulares^{88,89}. O 15 plasmídio circular pode conter um fragmento de 6-7 kb do gene α -MHC em que o miR-208 está situado centralmente. O fragmento de DNA linear contém dois braços homólogos projetados para substituir a seqüência de miR-208 de 22 nt com um cassete de seleção "floxed". As bactérias 20 transformadas com o plasmídio circular são eletroporadas com o fragmento de DNA linear, e subseqüentemente, a resistência codificada pelo fragmento linear determina as colônias recombinantes. A construção resultante é usada para alvejar as células ES por recombinação homóloga. Uma 25 vez que a célula ES heterozigótica é identificada usando-se seleção baseada em PCR ou por mancha do Sul, ela é usada para gerar quimera por injeção de blastocisto. O modelo de nocaute presentemente divulgado deixa apenas uma pequena pegada de DNA exógeno no ítron de um α -MHC e ajuda a 30 assegura que a transcrição de um α -MHC ou o padrão de união

de mRNA de α -MHC permanece não afetado.

Modelo de camundongo transgênico condicional

A estratégia transgênica condicional é diagramada na Figura 17. A método transgênico condicional é um sistema binário consistindo de dois transgenes. Um transgene codifica miR-208 (*tet208*), enquanto o outro transgene codifica um transativador (*tTA*) que ativa o transgene de miR-208 através da ligação de uma seqüência reguladora com seu promotor. A ligação de *tTA* é inibida sempre que a doxiciclina (DOX) está presente (isto é, "tet-off"), assim permitindo a regulação temporal do transgene de miR-208 pelo tratamento com DOX.

Uma de colônia de camundongo homozigótica para o transgene de miR-208 é estabelecida. Os camundongo s *tet208* é acasalado com camundongo transgênico abrigando um transgene *tTA* para criar transgênicos duplos para estudo. Assumindo a genética Mendeliana, 1 em 4 descendentes será transgênico duplo e expressa miR-208 sempre que *tTA* for expressado. Um promotor de α -MHC é utilizado para direciona a expressão de *tTA*. O promotor de α -MHC foi bem caracterizado e é suficiente para direcionar adequadas a expressão específica a tecido no desenvolvimento inicial⁹⁰. O uso de um promotor de α -MHC para expressar *tTA* aumentará a dosagem de miR-208 nos mesmos tecidos como miR-208 endógeno nos animais transgênicos duplos, uma vez que o miR-208 endógeno normalmente origina-se de um ítron dentro do gene α -MHC. Uma linha de camundongo transgênico que usa o promotor de α -MHC de camundongo para direcionar a expressão de *tTA* existe e foi usada de forma bem sucedida^{91,92}. A linha de camundongo transgênico *tet208*

permite o estudo dos efeitos da dosagem da expressão de miR-208 no embrião em desenvolvimento ou coração de camundongo adulto independentemente. Tipicamente, a letalidade embrionária inicial em iniciadores transgênicos regulares limitará severamente o número de embriões capturados de maneira desenvolvida disponíveis para estudo e impedirá a análise fenotípica. Com a estratégia condicional, foi-se capaz de atrasar a expressão do transgene de miR-208 no camundongo transgênico duplo onde a superexpressão de miR-208 inicial provou ser letal.

Análise

A análise específica conduzida depende de como os fenótipos são manifestados. Em geral, usando-se métodos histológicos e bioquímicos para caracterizar os fenótipos potenciais no embrião em desenvolvimento e/ou adulto é aceitável. Corações são examinados para anormalidades graves e seccionados para análise histológica para identificar mais potencialmente defeitos de desenvolvimento sutis. As possibilidades para defeitos são inumeráveis e podem incluir qualquer espécie de formação defeituosa de septo a átrio espessado. É igualmente possível que o fenótipo possa ser um defeito de contralidade que pode ser caracterizado por estudos eletrofisiológicos.

EXEMPLO 11

A identificação de alvos moleculares diretos de miR-208 facilita a compreensão do mecanismo que fundamenta sua função biológica. Prognósticos alvo são utilizados para complementar observações relacionadas à investigação da função de miR-208 em modelos de camundongo *in vitro* e *in vivo*.

Sem desejar estar limitado pelo teoria, criou-se uma hipótese de que a expressão de *Thrap1* é regulada por miR-208. A UTR 3' de *Thrap1* contém dois sítios de ligação de miR-208 previstos (Figura 18). Os dois alvos estão 5 localizados ~80 bp a jusante do códon de parada de *Thrap1* e estão separados entre si por apenas ~50 bp. Ambos os alvos são perfeitamente complementares com a região de semente de miR-208. O gene *Thrap1* codifica uma subunidade de 240 kd do complexo de TRAP (proteína receptora de hormônio da 10 tireóide) que é ubiqüitariamente expressada⁹³. TRAP é um complexo de proteína de multisubunidade que é um coativador para receptores nucleares. TRAP foi inicialmente 15 caracterizada para receptor nuclear do hormônio da tireóide⁹⁴. *Thrap1* não foi caracterizado, mas defeitos em outras subunidades de TRAP mostraram afetar a sinalização 20 do receptor nuclear. A ablação do gene de TRAP220 em camundongos prejudicaram o desenvolvimento do sistema nervoso e do coração, enquanto que homólogos de *Drosophila* de TRAP230 e TRAP240 são exigidos para o desenvolvimento do disco olho-antena adequado^{95,96}. Mutações em um gene altamente similar a *Thrap1*, chamado de *Thrap2*, foram 25 encontradas em pacientes com defeito do coração congênito, *Transposition of the Great Arteries*⁹⁷. Assim, os membros da família TRAP são importantes para o desenvolvimento adequado. Tem-se um interesse particular no *Thrap1* como um alvo de miR-208, uma vez que sabe-se que o hormônio da tireóide exerce efeitos profundos na contratilidade 30 cardíaca.

O hormônio da tireóide está ligado à troca da isoforma da miosina cardíaca. Em cardiomiócitos, o hormônio da

tireóide causa um acúmulo rápido de α -MHC mRNA enquanto inibe simultaneamente a expressão de β -MHC^{98,99}. Vários elementos de resposta tiroidiana atuantes positivos (TRES) estão localizados no promotor de α -MHC e um meio-Ter 5 atuante negativo no promotor β -MHC foram identificados^{100,101}. Os genes α -MHC e β -MHC estão dispostos em tandem no cromossomo 14 e eles codificam duas isoformas de cadeia pesada de miosina cardíaca que convertem ATP em trabalho mecânico a diferentes taxas e sua relação de 10 expressão de proteína afeta a contratilidade dos sarcômeros cardíacos; α -MHC é "rápido" enquanto que β -MHC é "lento". Sua expressão é regulada de forma desenvolvida. Em camundongo e rato, β -MHC é predominante na vida fetal posterior, mas imediatamente após o nascimento, α -MHC 15 torna-se a isoforma cardíaca adulta predominante. A transição é provavelmente causada pelo surto de hormônio da tireóide circulante que ocorre imediatamente após o nascimento⁹⁸. Em animais maiores, como coelhos e humanos, α -MHC é a isoforma cardíaca adulta predominante. 20 Entretanto, os promotores dos genes α -MHC e β -MHC são altamente conservados entre camundongo e humano, sugerindo que eles são regulados de forma similar. Dada a origem de miR-208 a partir de um ítron de α -MHC, e sem desejar estar preso pela teoria, é possível que o miR-208 atue como um 25 inibidor específico a tecido da sinalização do hormônio da tireóide em um ciclo de resposta negativo para regular a relação das isoformas de cadeia pesada de miosina cardíaca alvejando-se um componente do complexo TRAP (Figura 19).

A estratégia de seleção inicial pergunta se a 30 superexpressão de miR-208 regula para baixo a expressão de

um gene repórter portando supostos sítios alvo em sua UTR 3'. Inseriu-se a Thrap1 UTR 3' diretamente atrás da seqüência codificadora de um gene repórter de luciferase expressado de forma constitutiva. Os resultados sugerem que 5 miR-208 alveja Thrap1 UTR (Figura 18). Para confirmar esta observação, mudou-se as regiões de semente de dois suposto sítios alvo dentro de Thrap1 UTR, separadamente e em combinação. O polinucleotídeo mudado pode ser testado para determinar se eles podem aliviar a repressão mediada por 10 miR-208.

Estudos prévios mostraram que o hormônio tireoidiano ativa de maneira transcricional a expressão da cadeia de α -MHC e inibe a expressão de β -MHC em cardiomiócitos^{98,99,102}. Os cardiomiócitos são infectados com Ad-208 para determinar 15 se a expressão de miR-208 inibe a sinalização do hormônio tireoidiano monitorando-se a transcrição e os níveis de proteína de um α -MHC e β -MHC. A inibição da expressão de α -MHC por miR-208 suportará indiretamente a hipótese de que o 20 miR-208 alveja um componente da rota de sinalização do hormônio da tireoide.

Para também validar os alvos previstos, pode ser determinado se a expressão de miR-208 diminui os níveis de mRNA ou de proteína nos corações a partir de modelos de camundongo transgênico de miR-208 e nocaute de miR-208. 25 Anticorpos específicos contra as proteínas alvo são empregados. Thrap1 humano está comercialmente disponível. Se não efetivo em estudos de camundongo, Thrap1 de camundongo - anticorpos específicos são desenvolvidos.

Alvos Candidatos Adicionais para miR-208

30 Além do Thrap1, clonou-se as UTR 3' de quatro outros

alvos previstos de miR-208 de interesse diretamente ao gene de luciferase para estudos repórteres. As UTR's 3' são de *SP3* (fator 3 de transcrição trans-atuante *Sp3*), *EYA4* (homólogo 4 ausente nos olhos), *CSNK2A2* (caseína quinase 2, 5 alpha prime polipeptide) e *TTN* (*Titin*).

A expressão da proteína *SP3* é oposta à expressão de miR-208, *SP3* é um fator de transcrição que interage com uma variedade de promotores contendo GC-boxes^{103,104,105}. A proteína *SP3* é facilmente detectada em corações da 10 camundongo fetal, mas é raramente detectável no coração adulto. Os padrões de expressão opostos de *SP3* e miR-208 tornam expressamente possível para miR-208 regular a tradução de *SP3*.

EYA4 é um alvo potencial de interesse de miR-208 dada 15 sua ligação estabelecida à patologia no coração humano. As mutações foram identificadas em *EYA4* humano que causam cardiomiopatia dilatada e falha associada do coração^{106,107}. *EYA4* é um coativador transcricional que interage com os elementos da família *sine-oculis* (*Six1-Six6*) e fatores de 20 transcrição *Dach* levando à ativação do gene^{108,109}. A caracterização da mutação humana foi suportada pelo trabalho em peixe zebra, uma vez que níveis de *EYA4* atenuados produzem características morfológicas e hemodinâmicas da falha do coração¹⁰⁸. Correntemente, nenhum 25 gene cardíaco potencial de *EYA4* foi identificado.

CSNK2A2 é uma proteína serina/treonina quinase amplamente expressada que foi comprometida na replicação de DNA, regulação de transcrição basal e indutível, tradução e controle de metabolismo^{110,111}. Há interesse em *CSKN2A2* por 30 seu potencial na regulação de uma variedade de rotas

genéticas.

Similar ao EYA4, TTN é também um candidato alvo de miR-208 de interesse dado a sua associação estabelecida com a função cardiovascular e patologia. TTN é uma proteína sarcomérica gigante expressada tanto em tecido do músculo cardíaco quanto em músculo esquelético e é importante para a montagem do sarcômero e transmissão de força. As mutações em TTN foram legadas às cardiomiopatias hipertrófica e dilatadas. Dada à exigência da TTN para a função do músculo cardíaco e esquelético, suspeita-se que o miR-208 regula fortemente a expressão da TTN, mas é possível que um gene sarcomérico (isto é, α -MHC) possa focar a expressão de um outro (isto é, TTN) para ajustar as propriedades contráteis de cardiomiócitos.

A UTR 3' do gene alvo previsto é testada pelo ensaio repórter para determinar se ela confere supressão mediada por miR-208. Os genes candidatos são também caracterizados pela mutação dos sítios alvo previstos e para testar se a supressão de miR-208 é diminuída. Após a seleção repórter inicial dos alvos candidatos, os efeitos da superexpressão de miR-208 *in vitro* usando-se células de cardiomiócito sob a expressão do gene candidato na transcrição e níveis de proteína são analisados. A relevância biológica de alvos verificados são estudados *in vivo* usando-se os modelos de camundongo transgênico indutível e nocaute de miR-208. A análise dos alvos de miR-208 potenciais *in vitro* e *in vivo* pode validar as previsões de alvo e confirma sua relevância biológica a fim de compreender as rotas genéticas reguladas por miR-208 no coração.

Músculos esqueléticos são danificados e reparados repetidamente por toda a vida. A regeneração muscular mantém a função locomotora durante os envelhecimento e retarda a aparência dos sintomas clínicos em doenças neuromusculares, tais como distrofia muscular de Duchenne. Esta capacidade para reparo de tecido é conferida por um subconjunto de células como células tronco chamadas de células satélites localizadas entre a lámina basal e o sarcolema das miofibras maduras. Sob dano, as células satélites entram outra vez no ciclo celular, proliferam-se, e então saem do ciclo celular ou para renovar o conjunto de célula satélite quiescente ou para diferencial em miofibras maduras. Tanto o programa de proliferação celular quanto o programa de diferenciação células são essenciais para a miogênese.

O assunto presentemente divulgado fornece dados que demonstram que os miRNAs são responsáveis pela proliferação e diferenciação de células musculares.

Métodos

A cardiotoxina foi injetada em músculos tibiais anteriores (TA) de camundongos C57BL/6 machos de seis semanas de vida de acordo com Yan e outros¹¹⁴. Os músculos foram coletados 3 dias após a injeção. Músculos TA não injetados foram usados como controle. RNA total foi extraído do músculo TA e 5 µg foram usados para análise de microarranjo de microRNAs.

Resultados

As Figuras 20A e 20B mostram os dados de expressão do arranjo de miRNA de músculo tibial anterior (TA) injetado com cardiotoxina (Danificado) ou não injetado (controle).

Os dados de log normalizados (base 2) foram hierarquicamente aglomerados pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. A faixa de sinal era de -4 vezes a + 4 vezes. Sombreamento claro denota alta expressão 5 e sombreamento escuro denota baixa expressão, em relação ao valor médio. A Figura 20A mostra miRNAs que são regulados para baixo em músculo danificado e a Figura 20B mostra miRNAs que são regulados para cima em músculo danificado.

EXEMPLO 13

As células satélites de músculo esquelético são um grupo de pequenas células mononucleares posicionadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal circundante de fibras musculares multinucleares maduras. As células satélites têm sido há muito tempo consideradas como as 10 células precursoras do músculo esquelético adulto. Evidência recente sustenta a noção de que as células satélites são heterogêneas e possuem potencial semelhante à célula tronco. Estas células são mantidas em um estado quiescente, mas uma vez ativadas, irão se proliferar 15 extensivamente para formar um conjunto de mioblastos que irão se diferenciar e regenerar ou reparar o tecido muscular.

As rotas genéticas e mecanismos moleculares que mantêm 20 as células satélites em seu estado quiescente inativo sob condições normais, assim como a maneira pela qual eles se tornam ativados em resposta ao dano muscular para facilitar a regeneração muscular estão começando a ser reveladas. Pax3 e Pax7, membros de uma família de fatores de transcrição box pareados/homeodomínio, demonstraram 25 executar papéis importantes, ainda distintos, na mediação

de processo de regeneração de músculo esquelético relacionado à célula satélite. É menos claro, entretanto, como a expressão das proteínas Pax é regulada durante o curso da manutenção e ativação da célula satélite. De maneira intrigante, a expressão de Pax3 e Pax7 é regulada para baixo na diferenciação de mioblastos. De maneira mais importante, a superexpressão ectópica de Pax3 ou Pax7 em mioblastos C2C12 bloqueia sua diferenciação. Estas observações sugerem que o *status* de quiescência da célula satélite e a auto-renovação assim como a proliferação e diferenciação de mioblastos está sob controle transcripcional e pós-transcripcional rígido.

Além disso, o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) é expressado nas células satélites de músculo esquelético e inibe a diferenciação miogênica. Foi descoberto e é agora divulgado aqui que tanto Pax7 quanto BDNF são supostos alvos reguladores para miR-1/206, implicando que o miR-1/206 executa um papel vital na regulação da célula satélite do músculo esquelético.

20 Superexpressão de miRNA estabelecida e sistema de detecção em células satélites

A fim de superexpressar de forma eficiente os miRNAs em células satélites ectopicamente, um sistema de superexpressão com base retroviral foi adaptado. As seqüências genômicas que flanqueiam miR-1 e miR-206 (em torno de 300-400 bp) são flanqueadas com um doador de *splice* (SD) e um aceptor de *splice* (SA) dentro de um vetor de retrovírus derivado de vírus de célula tronco de murina (MSCV) em que uma seqüência codificadora de proteína 30 fluorescente verde (GFP) é localizada a jusante da

seqüência de miRNA-SDSA. Desta forma, ambos miR-1/206 e GFP serão expressados simultaneamente e a expressão de GFP servirá como uma excelente indicação da expressão de miR-1/206 (Figura 23).

5 A fim de monitorar a expressão e o efeito inibidor de miRNAs em células satélites, criou-se um "sensor de miRNA" em que a expressão de um gene dsRed está sob controle transcripcional de um promotor CMV ativo de forma constitutiva. A seqüência complementar do miR-1/206 estava 10 ligada à 3' de um gene repórter dsRed e inserida em um vetor de retrovírus derivado de MSCV de forma que um miRNA irá reprimir a tradução da proteína dsRed (Figura 22). Usando-se este sistema, pode-se detectar de forma precisa a expressão e o efeito inibitório de um miRNA em células 15 satélites, que fornece ferramentas poderosas para também estudar a função de miRNAs no músculo esquelético.

Pax7 e BDNF são alvos reguladores de miR-1/206 em células satélites

Descobriu-se que os genes Pax7 e BDNF contêm sítios 20 alvo de miR-1/206 altamente conservados em suas UTRs 3' (Figuras 24, 25 e 26). Estas seqüências UTR 3' foram clonadas em um repórter de luciferase e foi testado se elas podem ser reprimidas pelos miRNAs. Conforme mostrado na Figura 24, tanto miR-1 quanto miR-206 reprimem 25 potencialmente estes repórteres. A repressão mediada por miRNA é anulada quando as seqüências de ligação de miRNA conservadas foram mudadas, indicando a especificidade da repressão. Estes dados sugerem que miR-1/206 podem controlar a proliferação e diferenciação das células 30 musculares e/ou seus precursores reprimindo genes alvo

importantes.

Isolamento de células satélites a partir de miofibras de músculo esquelético único

As células satélites são células progenitoras de músculo esquelético adulto responsivas ao desenvolvimento pós-natal e regeneração. Sem desejar estar limitado pela teoria, há a hipótese de que os miRNAs são também reguladores de células satélites. Para testar esta hipótese, começou-se isolando-se as células satélites de músculo esquelético do membro posterior ou diafragma de camundongos neonatais e adultos. Foi-se capaz de isolar células satélites de miofibras únicas, que produz população de célula satélite mais pura e fornece resultados reproduzíveis. Estas células satélites podem ser mantidas em um estado não diferenciado quando bFGF estava incluído no meio de cultura, em que a expressão de Pax7 e outros marcadores de células satélites podem ser detectados. Entretanto, elas podem ser induzidas para diferenciarem em mioblastos e miotubos sob remoção do fator de crescimento bFGF, imitam exatamente o processo de diferenciação do músculo esquelético *in vitro* (Figura 28).

miR-1/206 inibe a proliferação de células satélites

Para definir a função de miR-1/206 em células progenitoras de músculo esquelético, as células satélites isoladas de miofibras únicas de camundongos adultos são plaqueadas em placas de cultura de tecido de 24 cavidades e miR-1/206 é introduzido nas células usando-se um retrovírus baseado no vetor SDSA. A expressão e atividade de miRNAs expressados ectopicamente são monitoradas de várias formas: Análise da mancha no Norte foi aplicada para detectar e

medir quantitativamente a expressão de miR-1. A atividade de miR-1/206 é também monitorada usando-se repórteres "sensores" em que a seqüência complementar para miR-1/206 é clonada na região 3' em direção a um gene repórter dsRed.

5 Para os ensaios de proliferação, a cultura de célula satélite foi marcada com BrdU 1 horas antes da colheita. As células foram então fixadas e a proliferação das células foi medida pela contagem de células coradas positivas para BrdU. Conforme mostrado na Figura 27, a superexpressão de 10 miR-1/206 em células satélites inibe sua proliferação.

miR-1/206 aumenta a diferenciação de células satélites

Para diferenciação da análise cinética, as células satélites de miofibras únicas foram plaqueadas em placas de 24 cavidades revestidas com colágeno em DMEM adicionado com 15 FBS 20% e 10 ng/mL de bFGF. As células foram plaqueadas a uma densidade em torno de 5×10^3 células/cm² e infectadas com retrovírus de miR-1/206 ou retrovírus de controle. Uma vez que o bFGF é removido do meio de cultura, as células satélite sairão espontaneamente do ciclo celular e se 20 diferenciarão. Conforme mostrado nas Figuras 28 e 29, a superexpressão de miR-1/206 aumenta a diferenciação de células satélite e acelera sua cinética de diferenciação.

Em resumo, os dados expostos no presente Exemplo demonstram que miR-1 e miR-206 executam um importante papel 25 no controle do processo de proliferação e diferenciação de célula satélite de músculo esquelético. Dada a função importante das células satélites no processo de regeneração e reparo de músculo esquelético, é sugerido, e sem desejar estar limitado pela teoria, que miR-1, miR-206 e miR-133 30 são importantes para regeneração do músculo esquelético

(Figura 30).

REFERÊNCIAS

As referências listadas abaixo assim como todos as referências citadas na especificação estão aqui incorporadas por referência à extensão em que suplementam, explicam, fornecem uma fundamentação para ou ensinam metodologia, técnicas e/ou composições aqui empregadas.

1. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell* 116, 281-97 (2004).

10 2. Ambros, V. *The functions of animal microRNAs*. *Nature* 431, 350-5 (2004).

3. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. e Ambros, V., *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell* 75, 843-54
15 (1993).

4. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G., *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. *Cell* 75, 855-62 (1993).

20 5. Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. e Bartel, D.P., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. *Science* 303, 83-6 (2004).

6. He, L. e outros, *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. *Nature* 435, 828-33 (2005).

25 7. Giraldez, A.J. e outros, *MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish*. *Science* 308, 833-8 (2005).

8. Zhao, Y., Samal, E. e Srivastava, D., *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis*. *Nature* 436, 214-20
30 (2005).

9. Thomson, J. M., Parker, J., Perou, C. M. e Hammond, S. M., *A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression*. *Nat Methods* 1, 47-53 (2004).
10. Blau, H. M. e outros, *Plasticity of the* 5 *differentiated state*. *Science* 230, 758-66 (1985).
11. Soulez, M. e outros, *Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor*. *Mol Cell Biol* 16, 6065-74 (1996).
12. Lu, J., McKinsey, T. A., Zhang, C. L. e Olson, E. 10 *N., Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases*. *Mol Cell* 23, 233-44 (2000).
13. Lee, R. C. e Ambros, V., *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-4 15 (2001).
14. Lagos-Quintana, M. e outros, *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. *CurrBiol* 12, 735-9 (2002).
15. Sempere, L. F. e outros, *Expression profiling of 20 mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. *Genome Biol* 5, R13 (2004).
16. Wienholds, E. e outros, *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. *Science* 309, 310-1 (2005).
- 25 17. Mansfield, J. H. e outros, *MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression*. *Nat Genet* 36, 1079-83 (2004).
18. Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C. e 30 Zamore, P. D., *Sequence-specific inhibition of small RNA*

- function. *PLoS Biol* 2, E98 (2004).
19. Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. e Tuschl, T., *Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing*. *Rna* 10, 544-50 (2004).
- 5 20. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. e Burge, C. B., *Prediction of mammalian microRNA targets*. *Cell* 115, 787-98 (2003).
- 10 21. Kiriakidou, M. e outros, A *combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets*. *Genes Dev* 18, 1165-78 (2004).
22. Krek, A. e outros, *Combinatorial microRNA target predictions*. *Nat Genet* 37, 495-500 (2005).
- 15 23. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. e Olson, E. N., *Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation*. *Nature* 408, 106-11 (2000).
24. Wang, D. e outros, *Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 97-105 (2002).
- 20 25. Li, S. e outros, *Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 1082-7 (2005).
- 25 26. Wang, D. e outros, *Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor*. *Cell* 105, 851-62 (2001).
27. Cao, D. e outros, *Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin*. *Mol Cell Biol* 25, 364-76 (2005).

28. Kroll, K. L. e Amaya, E., *Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation.* *Development* 122, 3173-83 (1996).
- 5 29. Conlon, F. L., Sedgwick, S. G., Weston, K. M. e Smith, J. C., *Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals auto regulation of Xbra in dorsal mesoderm.* *Development* 122, 2427-35 (1996).
- 10 30. Brown, D. D. e outros, *Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis.* *Development* 132, 553-63 (2005).
31. Freier ef al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9373-9377.
- 15 32. Turner e outros, (1987) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* L11:123-133.
33. Smith e Waterman (1981) *Adv Appl Math* 2:482-489.
34. Needleman e Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48:443-453.
35. Pearson e Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444-2448.
- 20 36. Ausubel e outros, ed. (1989) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York, New York, Estados Unidos da América.
37. Altschul e outros, (1990) *J Mol Biol* 215:403-410.
- 25 38. Henikoff e Henikoff, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10915-10919.
39. Karlin e Altschul, (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5873-5877.
40. Sambrook e Russell, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

41. Agrawal S., (ed.) Methods in Molecular Biology, volume 20, Humana Press, Totowa, New Jersey, Estados Unidos da América.

5 42. Tijssen, (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes. Elsevier, New York, Estados Unidos da América.

10 43. Tibanyenda e outros, (1984) *Eur J Biochem* 139:19-27.

44. Ebel e outros, (1992) *Biochem* 31:12083-12086.

45. Goeddel, (1990) Gene Expression Technology. Methods in Enzymology. Volume 185, Academic Press, San Diego, California, Estados Unidos da América.

15 46. Silhavy, (1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, Estados Unidos da América.

20 47. Glover e Hames, (1995) DNA Cloning: A Practical Approach. 2^a ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York.

48. Adelman e outros, (1983) *DNA* 2:183-193.

49. Lee, R. C, Feinbaum, R. L., e Ambros, V. (1993). *The C. elegans heterochrony gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

25 50. Wightman, B., Ha, I., e Ruvkun, G., (1993). *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.

51. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., e Kim, V. N., (2004), *MicroRNA genes are*

transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051-4060.

52. Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., e Pasguinelli, A. E., (2004), *Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts*. *Rna* 10, 1586-1594.

53. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., e Bradley, A., (2004), *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. *Genome Res* 14, 1902-1910.

10 54. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., e Kim, V. N., (2003), *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature* 425, 415-419.

15 55. Bas Yuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., e Bertrand, E., (2003), *Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products*. *Nucleic Acids Res* 31, 6593-6597.

56. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., e Kutay, U., (2004), *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science* 303, 95-98.

20 57. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., e Cullen, B. R., (2003), *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev* 17, 3011-3016.

58. Yi, R., Doehle, B. P., Qin, Y., Macara, I. G., e Cullen, B. R., (2005), *Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs*. *Rna* 11, 220-226.

59. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., e Gorlich, D., (2004), *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *Rna* 10,

185-191.

60. Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A. M., Evers, S., Macara, I. G., e Dargemont, C., (2004), *Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3*. *J Biol Chem* 279, 884-891.
61. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., e Mello, C. C., (2001), *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing*. *Cell* 106, 23-34.
62. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D., (2001), *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science* 293, 834-838.
63. Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., e Plasterk, R. H. (2001). *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659.
64. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., e Zamore, P. D., (2003), *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell* 115, 199-208.
65. Khvorova, A., Reynolds, A., e Jayasena, S. D., (2003), *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. *Cell* 115, 209-216.
66. Pillai, R. S., Artus, C. G., e Filipowicz, W., (2004), *Tethering of human go proteins to mRNA mimics the*

miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* 10, 1518-1525.

67. Doench, J. G., e Sharp, P. A., (2004), *Specificity of microRNA target selection in translational repression.* *Genes Dev* 18, 504-511.

5 68. Bartel, D. P., (2004), *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* *Cell* 116, 281-297.

69. Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., 10 Elledge, S. J., Anderson, K. V., e Hannon, G. J., (2003), *Dicer is essential for mouse development.* *Nat Genet* 35, 215-217.

70. Harfe, B. D., McManus, M. T., Mansfield, J. H., Hornstein, E., e Tabin, C. J., (2005), *The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb.* *Proc Natl Acad Sci USA*.

71. Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., e Schier, A. F., (2005), *MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish.* *Science* 308, 833-838.

72. Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., e Stoffel, M., 25 (2004), *A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.* *Nature* 432, 226-230.

73. Esau, C, Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., e outros, (2004), *MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation.* *J Biol Chem* 279,

52361-52365.

74. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., e Hammond, S. M., (2005), *A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature* 435, 828-833.
75. Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., and Bartel, D. P., (2004), *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science* 303, 83-86.
- 10 76. Johnston, R. J., e Hobert, O. (2003). *A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in Caenorhabditis elegans. Nature* 426, 845-849.
- 15 77. Chang, S., Johnston, R. J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S., e Hobert, O., (2004), *MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. Nature* 430, 785-789.
78. Yekta, S., Shih, I. H., e Bartel, D. P., (2004), *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. Science* 304, 594-596.
- 20 79. Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenauer, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G. e outros, (2004), *MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmental regulated patterns of vertebrate microRNA expression. Nat Genet* 36, 1079-1083.
80. Zhao, Y., Samal, E., e Srivastava, D., (2005), *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature* 436, 214-220.
- 30 81. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W.,

- Bartel, D. P., e Burge, C. B., (2003), *Prediction of mammalian microRNA targets*. *Cell* 115, 787-798.
82. John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C, e Marks, D. S., (2004), *Human MicroRNA targets*.
- 5 *PLOS Biol* 2, e363.
83. Kiriakidou, M., Nelson, P. T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C., Mourelatos, Z., e Hatzigeorgiou, A., (2004), *A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets*.
- 10 *Genes Dev* 18, 1165-1178.
84. Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L, Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C, Stoffel, M., e Rajewsky, N., (2005), *Combinatorial microRNA target predictions*. *Nat Genet* 37, 15 495-500.
85. Rajewsky, N., e Socci, N. D., (2004), *Computational identification of microRNA targets*. *Dev Biol* 267, 529-535.
86. Nicol, R. L, Frey, N., Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J., e Olson, E. N., (2001), *Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy*. *Embo J* 20, 2757-2767.
- 20 87. Jones, W. K., Grupp, I. L, Doetschman, T., Grupp, G., Osinska, H., Hewett, T. E., Boivin, G., Gulick, J., Ng, W. A., e Robbins, J., (1996), *Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart*. *J Clin Invest* 98, 1906-1917.
- 25 88. Liu, P., Jenkins, N. A., e Copeland, N. G., (2003), *A highly efficient recombineering-based method for*

generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476-484.

89. Cotta-de-Almeida, V., Schonhoff, S., Shibata, T., Leiter, A., e Snapper, S. B., (2003), A new method for 5 rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res* 13, 2190-2194.

90. Subramaniam, A., Jones, W. K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., e Robbins, J., (1991), Tissue-specific 10 regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266, 24613-24620.

91. Sanbe, A., Gulick, J., Hanks, M. C, Liang, Q., Osinska, H., e Robbins, J., (2003), Reengineering inducible 15 cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 92, 609-616.

92. Czubryt, M. P., McAnally, J., Fishman, G. I., e Olson, E. N., (2003), Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. 20 *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1711-1716.

93. Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J., e Roeder, R. G., (1999), Identity between TRAP and SMCC 25 complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3, 361-370.

94. Fondell, J. D., Ge, H., e Roeder, R. G., (1996), Ligand induction of a transcriptionally active thyroid 30 hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8329-8333.

95. Treisman, J., (2001), *Drosophila homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development*. *Development* 128, 603-615.
- 5 96. Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B., e Roeder, R. G., (2000), *Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action*. *Mol Cell* 5, 683-693.
- 10 97. Muncke, N., Jung, C., Rudiger, H., Ulmer, H., Roeth, R., Hubert, A., Goldmuntz, E., Driscoll, D., Goodship, J., Schon, K., e Rappold, G., (2003), *Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries)*. *Circulation* 108, 2843-2850.
- 15 98. Lompre, A. M., Nadal-Ginard, B., e Mahdavi, V., (1984), *Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated*. *J Biol Chem* 259, 6437-6446.
- 20 99. Everett, A. W., Sinha, A. M., Umeda, P. K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M., and Zak, R., (1984), *Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart*. *Biochemistry* 23, 1596-1599.
- 25 100. Darling, D. S., Carter, R. L., Yen, P. M., Welborn, J. M., Chin, W. W. e Umeda, P. K., (1993), *Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms*. *J Biol Chem* 268, 10221-10227.
- 30 101. Subramaniam, A., Gulick, J., Neumann, J., Knotts,

- S., e Robbins, J., (1993), *Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter*. *J Biol Chem* 268, 4331-4336.
102. Gustafson, T. A., Markham, B. E., Bahl, J. J., e Morkin, E., (1987), *Thyroid hormone regulates expression of a transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 3122-3126.
103. Santalucia, T., Boheler, K. R., Brand, N. J., Sahye, U., Fandos, C, Vinals, F., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M., e Zorzano, A., (1999), *Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle*. *J Biol Chem* 274, 17626-17634.
104. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., e Suske, G., (1994), *Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3*. *Embo J* 13, 3843-3851.
105. Hagen, G., Muller, S., Beato, M., e Suske, G., (1992), *Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes*. *Nucleic Acids Res* 20, 5519-5525.
106. Schonberger, J., Wang, L., Shin, J. T., Kim, S. D., Depreux, F. F., Zhu, H., Zon, L, Pizard, A., Kim, J. B., Macrae, C. A., e outros, (2005), *Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss*. *Nat Genet* 37, 418-422.
107. Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L, Morton, C. C, Ryan, A. F., Van Camp, G., e Smith, R. J., (2001), *Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus*. *Hum Mol Genet* 10, 195-

200.

108. Borsani, G., DeGrandi, A., Ballabio, A., Bulfone, A., Bernard, L, Banfi, S., Gattuso, C, Mariani, M., Dixon, M., Donnai, D., e outros, (1999), *EYA4, a novel vertebrate gene related to Drosophila eyes absent*. *Hum MolGenetS*, 11-23.

109. Bonini, N. M., Leiserson, W. M., e Benzer, S., (1993), *The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing Drosophila eye*. *Cell* 72, 379-395.

110. Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B., e Tabin, C. J., (1999), *Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation*. *Genes Dev* 13, 3231-3243.

111. Xu, X., Rich, E. S., Jr., e Seldin, D. C., (1998), *Murine protein kinase CK2 alpha': cDNA and genomic cloning and chromosomal mapping*. *Genomics* 48, 79-86.

112. Pinna, L. A., e Meggio, F., (1997), *Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation*. *Prog Cell Cycle Res* 3, 77-97.

113. Granzier, H. L, e Labeit, S., (2004), *The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease*. *Circ Res* 94, 284-295.

114. Yan e outros (2003), *J. Biol. Chem.* 278(10), 8826-8836.

Será compreendido que vários detalhes da matéria título presentemente divulgada podem ser modificados sem se afastar do escopo da matéria título presentemente

divulgada. Além disso, a descrição acima possui propósito meramente ilustrativo, e não com finalidade de limitação.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para modular a expressão de um gene em um miócito caracterizado pelo fato de compreender contatar um miócito com um microRNA (miRNA) ou um vetor codificando o 5 miRNA dirigido a um gene no miócito.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que modular é inibir.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o miRNA inibe a tradução do 10 gene.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o miRNA é dirigido a uma região 3' não traduzida do gene.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, 15 caracterizado pelo fato de que o miRNA compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de qualquer Id. de Seq. n°s: 1-11 e seqüências pelo menos 70% idênticas a qualquer uma das Id. de Seq. n°s: 1-11.

20 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o miRNA é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145.

25 7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vetor codificando o miRNA compreende:

(a) um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico codificando a molécula de miRNA; e

30 (b) uma seqüência de terminação de transcrição.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gene é selecionado a partir do grupo consistindo de um gene de diferenciação de miócito e um gene de proliferação de miócito.

5 9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o gene de diferenciação de miócito codifica um polipeptídeo de histona desacetilase 4 (HDAC4).

10 10. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o gene de proliferação de miócito codifica um polipeptídeo de fator de resposta sérica (SRF).

11. Método para inibir a expressão de um gene em um miócito caracterizado por compreender transformar o miócito com o vetor codificando uma molécula de microRNA (miRNA), onde a molécula de miRNA compreende uma seqüência de nucleotídeo pelo menos 70% idêntica a uma subseqüência de 17-24 nucleotídeos contíguos do gene.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o miRNA inibe a tradução do gene.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a subseqüência está localizada na região não traduzida 3' do gene.

25 14. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o miRNA compreende uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de qualquer Id. de Seq. n°s: 1-11 e seqüências pelo menos 70% idênticas a qualquer uma das Id. de Seq. 30 n°s: 1-11.

15. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o miRNA é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e 5 miR-145.

16. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o vetor que codifica o miRNA compreende:

10 (a) um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico codificando a molécula de miRNA; e
(b) uma seqüência de terminação de transcrição.

17. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o gene é selecionado a partir do grupo consistindo de um gene de diferenciação de 15 miócito e um gene de proliferação de miócito.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o gene de diferenciação de miócito codifica um polipeptídeo de histona desacetilase 4 (HDAC4) ou um polipeptídeo de proteína receptora de 20 hormônio da tireóide 240 (TRAP240).

19. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o gene de proliferação de miócito codifica um polipeptídeo de fator de resposta sérica (SRF).

25 20. VETOR para expressar uma molécula de microRNA (miRNA) em um miócito caracterizado pelo fato de compreender:

30 (a) um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico codificando uma molécula de miRNA; e
(b) uma seqüência de terminação de transcrição.

21. Vetor, de acordo com a reivindicação 20,
caracterizado pelo fato de que o miRNA expressado inibe a tradução de um gene no miócito.

22. Vetor, de acordo com a reivindicação 21,
5 caracterizado pelo fato de que o miRNA é dirigido a uma região 3' não traduzida do gene.

23. Vetor, de acordo com a reivindicação 20,
caracterizado pelo fato de que o miRNA comprehende uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo 10 consistindo de qualquer Id. de Seq. n°s: 1-11 e seqüências pelo menos 70% idênticas a qualquer uma das Id. de Seq. n°s: 1-11.

24. Vetor, de acordo com a reivindicação 20,
caracterizado pelo fato de que o miRNA é selecionado a 15 partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145.

25. Vetor, de acordo com a reivindicação 21,
caracterizado pelo fato de que o gene é selecionado a 20 partir do grupo consistindo de um gene de diferenciação de miócito e um gene de proliferação de miócito.

26. Vetor, de acordo com a reivindicação 25,
caracterizado pelo fato de que o gene de diferenciação de miócito codifica um polipeptídeo de histona desacetilase 4 25 (HDAC4) ou um polipeptídeo de proteína receptora de hormônio da tireóide 240 (TRAP240).

27. Vetor, de acordo com a reivindicação 25,
caracterizado pelo fato de que o gene de proliferação de miócito codifica um polipeptídeo de fator de resposta 30 sérica (SRF).

28. Kit caracterizado pelo fato de compreender o vetor da reivindicação 17 e pelo menos um reagente para introduzir o vetor em um miócito.

29. Kit, de acordo com a reivindicação 28, 5 caracterizado por também compreender instruções para introduzir o vetor no miócito.

30. Composição médica para o tratamento de lesão muscular em um sujeito caracterizada pelo fato de compreender um microRNA (miRNA) que é dirigido para um gene 10 em um miócito no local de lesão do músculo, um vetor codificando o miRNA, um inibidor do Mirna, ou combinações destes.

31. Composição médica, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o miRNA compreende uma 15 seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo de qualquer Id. de Seq. n°s: 1-11 e seqüências pelo menos 70% idênticas a qualquer uma das Id. de Seq. n°s: 1-11.

32. Composição médica, de acordo com qualquer uma das 20 reivindicações 30 ou 31, caracterizado pelo fato de que o inibidor de miRNA é capaz de se hibridizar a um Mirna dirigido.

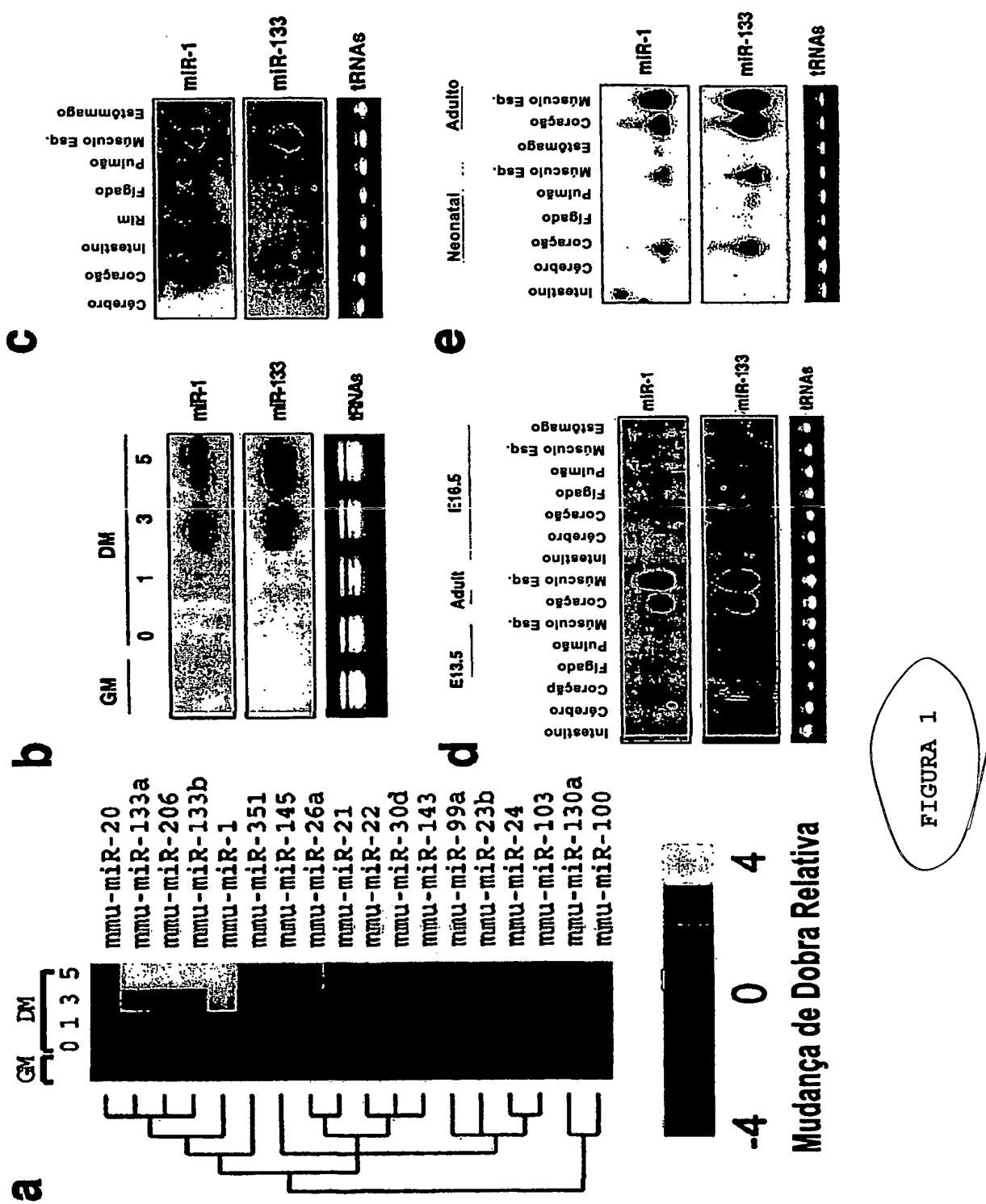
33. Composição médica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30, 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que 25 o miRNA é selecionado a partir do grupo consistindo de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145.

34. Composição médica, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o gene é selecionado a 30 partir do grupo consistindo de um gene de diferenciação de

miócito e um gene de proliferação de miócito.

35. Composição médica, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o gene de diferenciação de miócito codifica um polipeptídeo de histona desacetilase 5 4 (HDAC4) ou um polipeptídeo de proteína receptora de hormônio da tireóide 240 (TRAP240).

36. Composição médica, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o gene de proliferação de miócito codifica um polipeptídeo de fator de resposta 10 sérica (SRF).



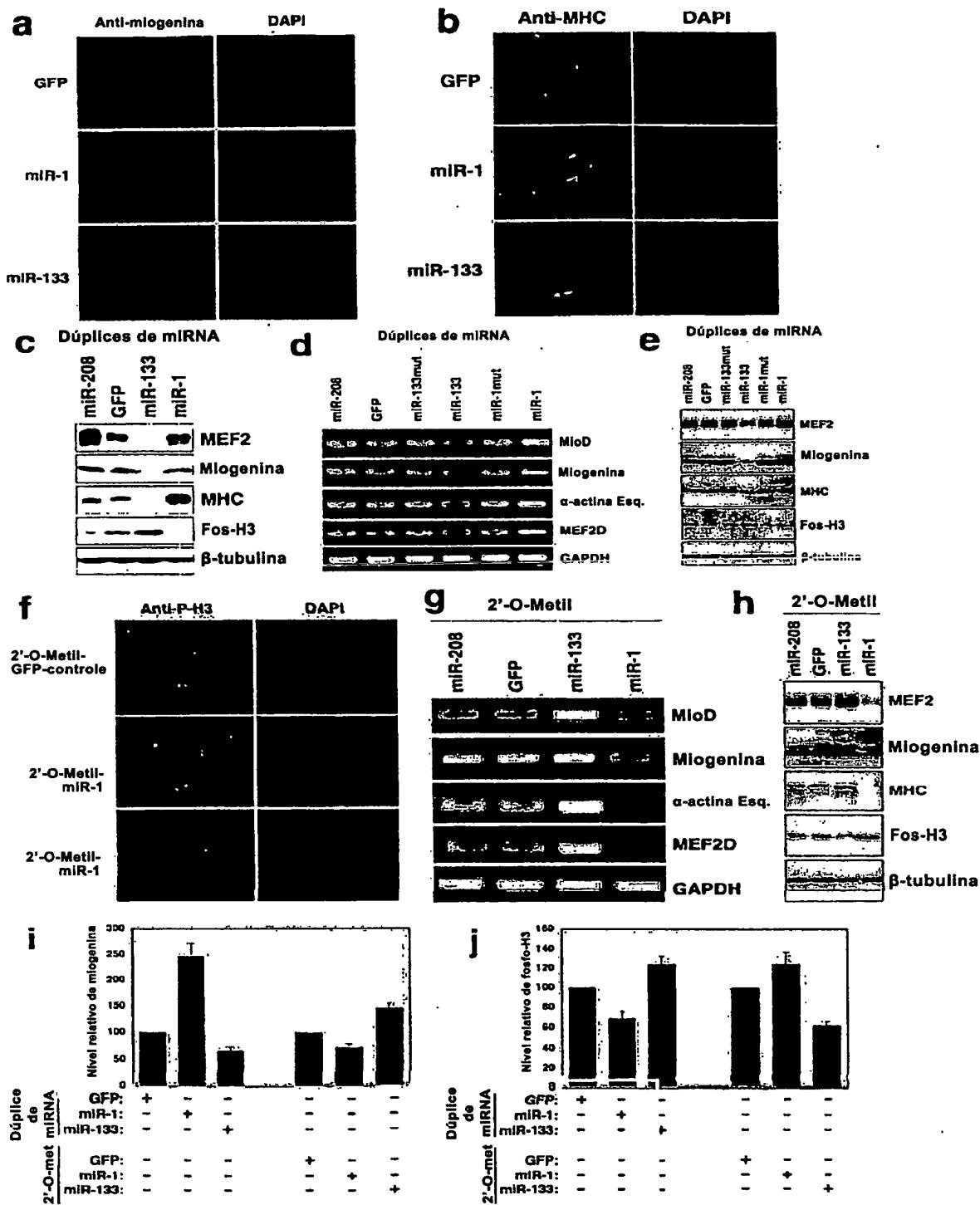


FIGURA 2

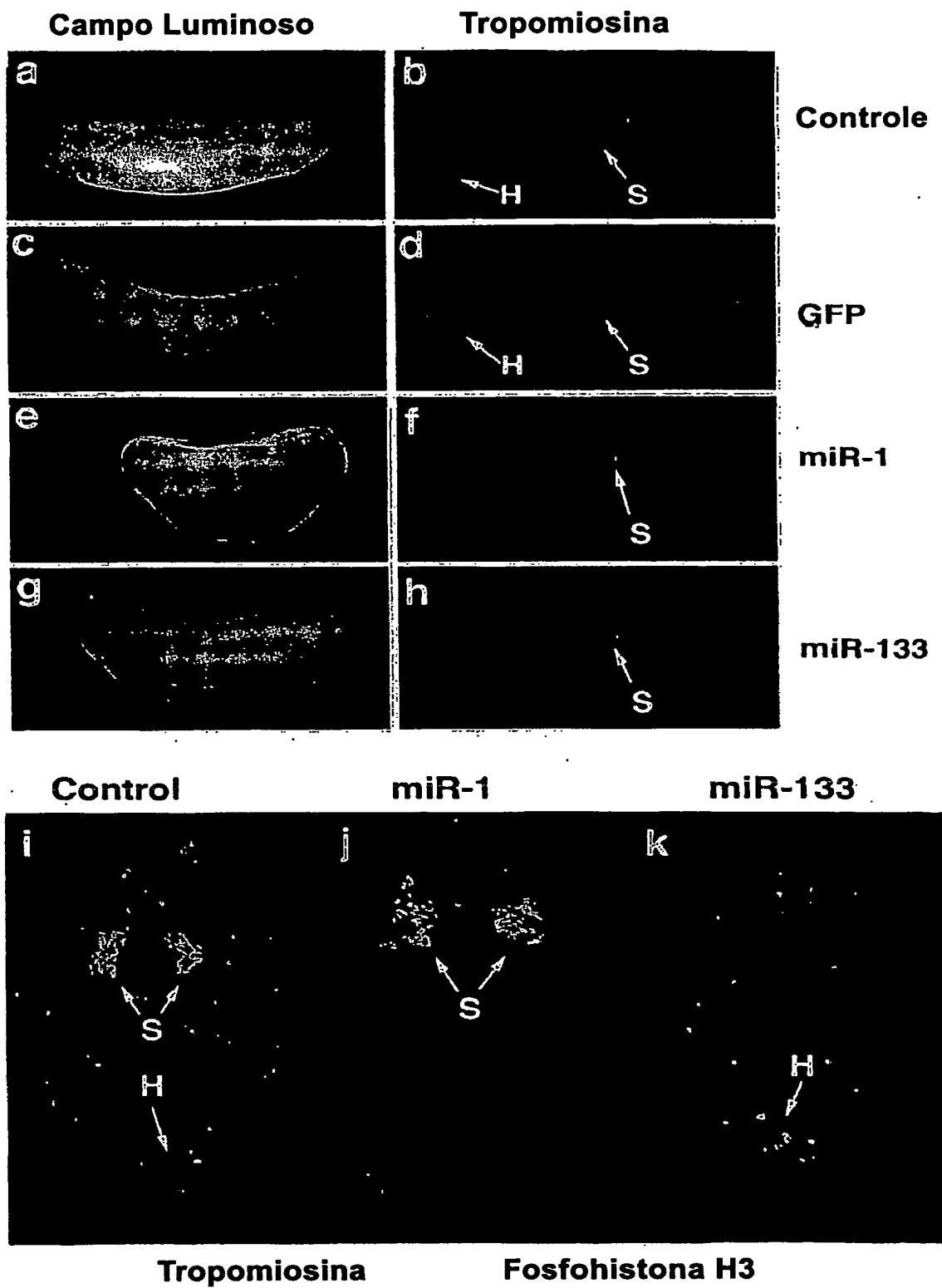


FIGURA 3

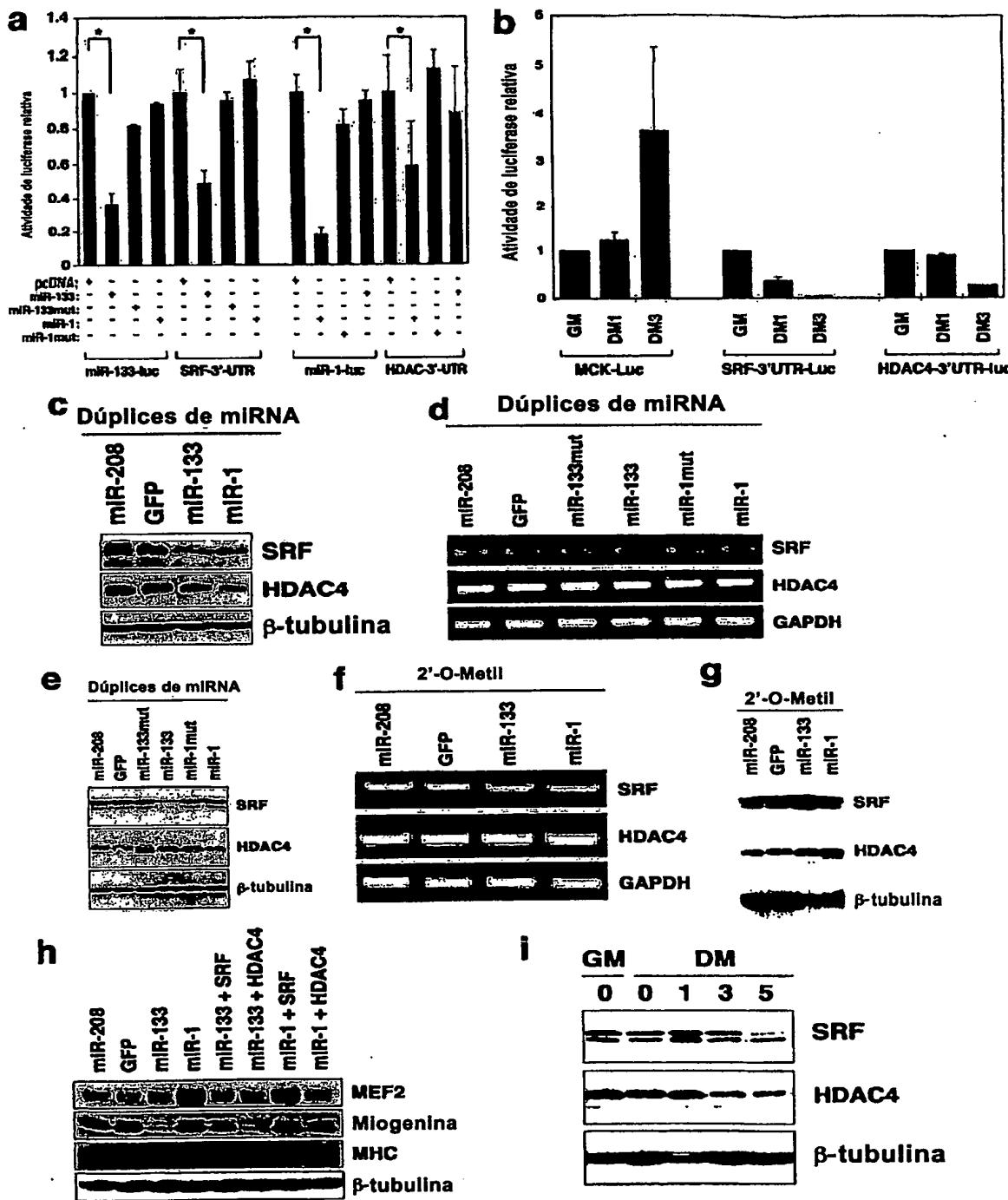


FIGURA 4

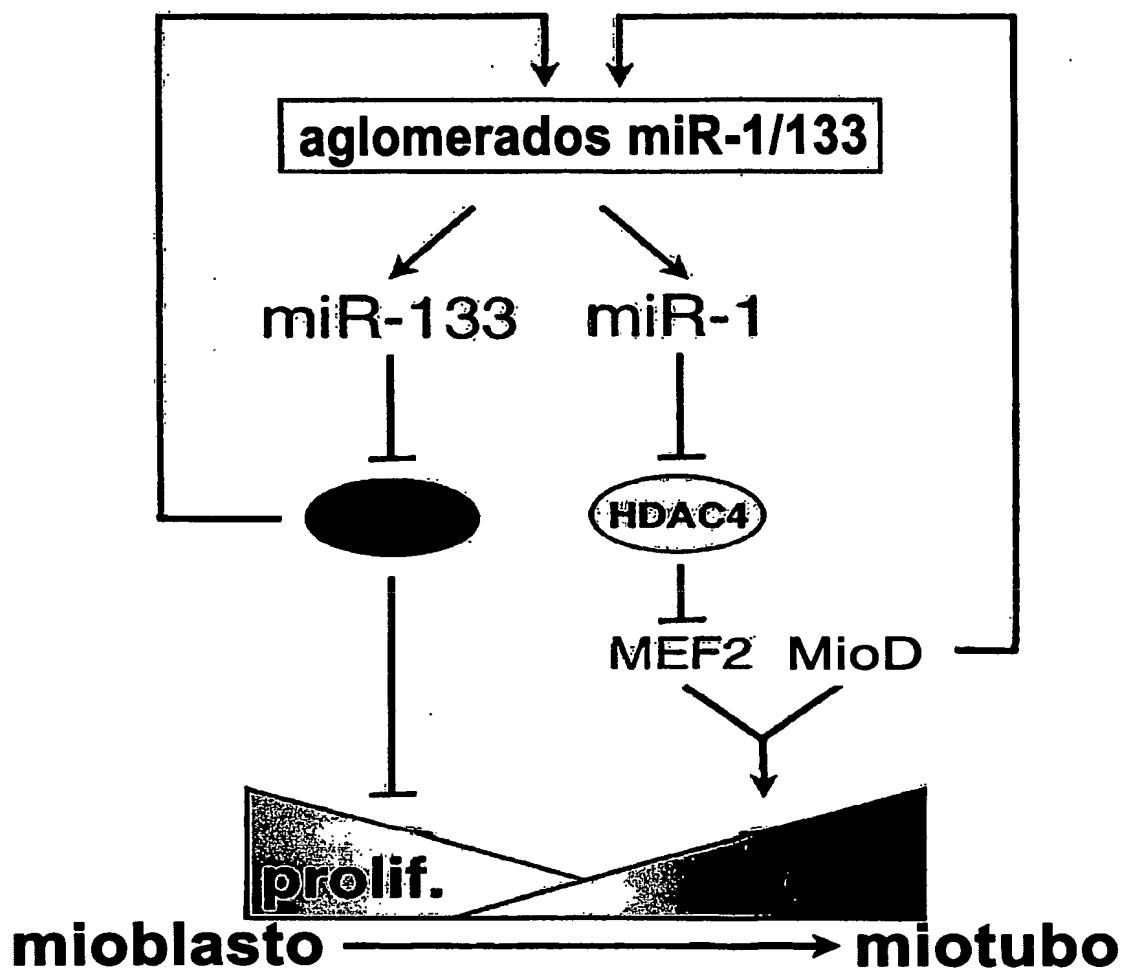


FIGURA 5

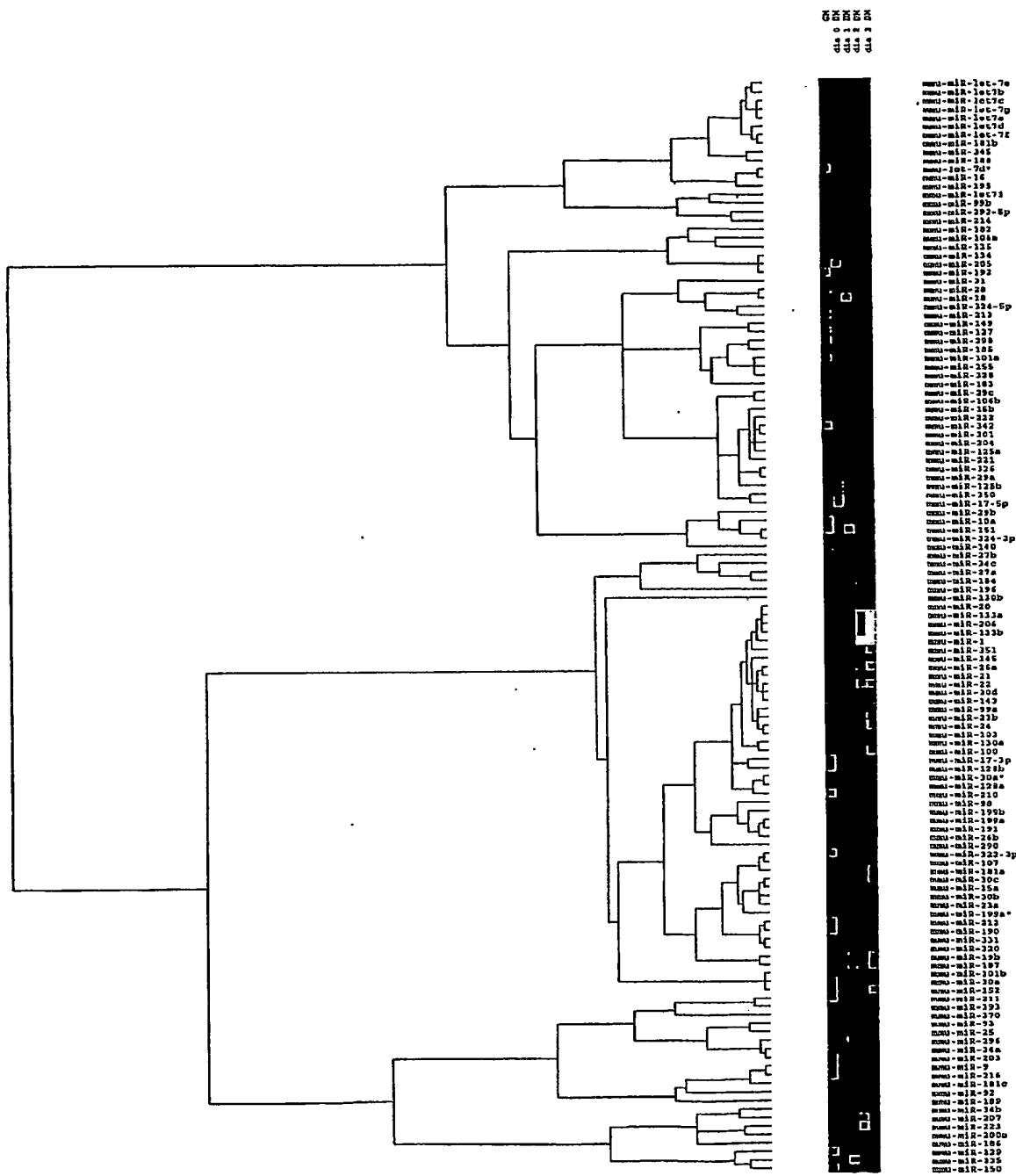


FIGURA 6

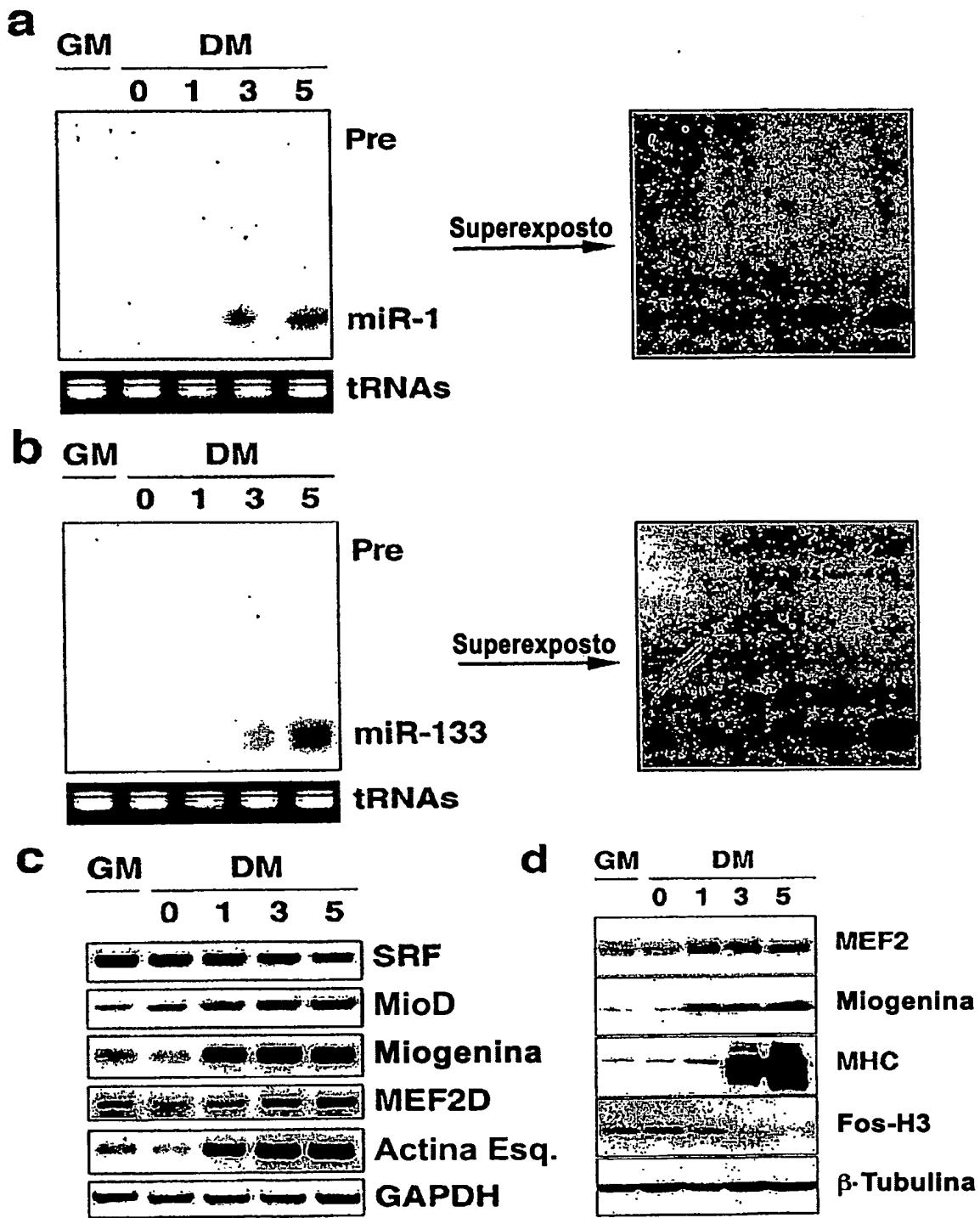


FIGURA 7

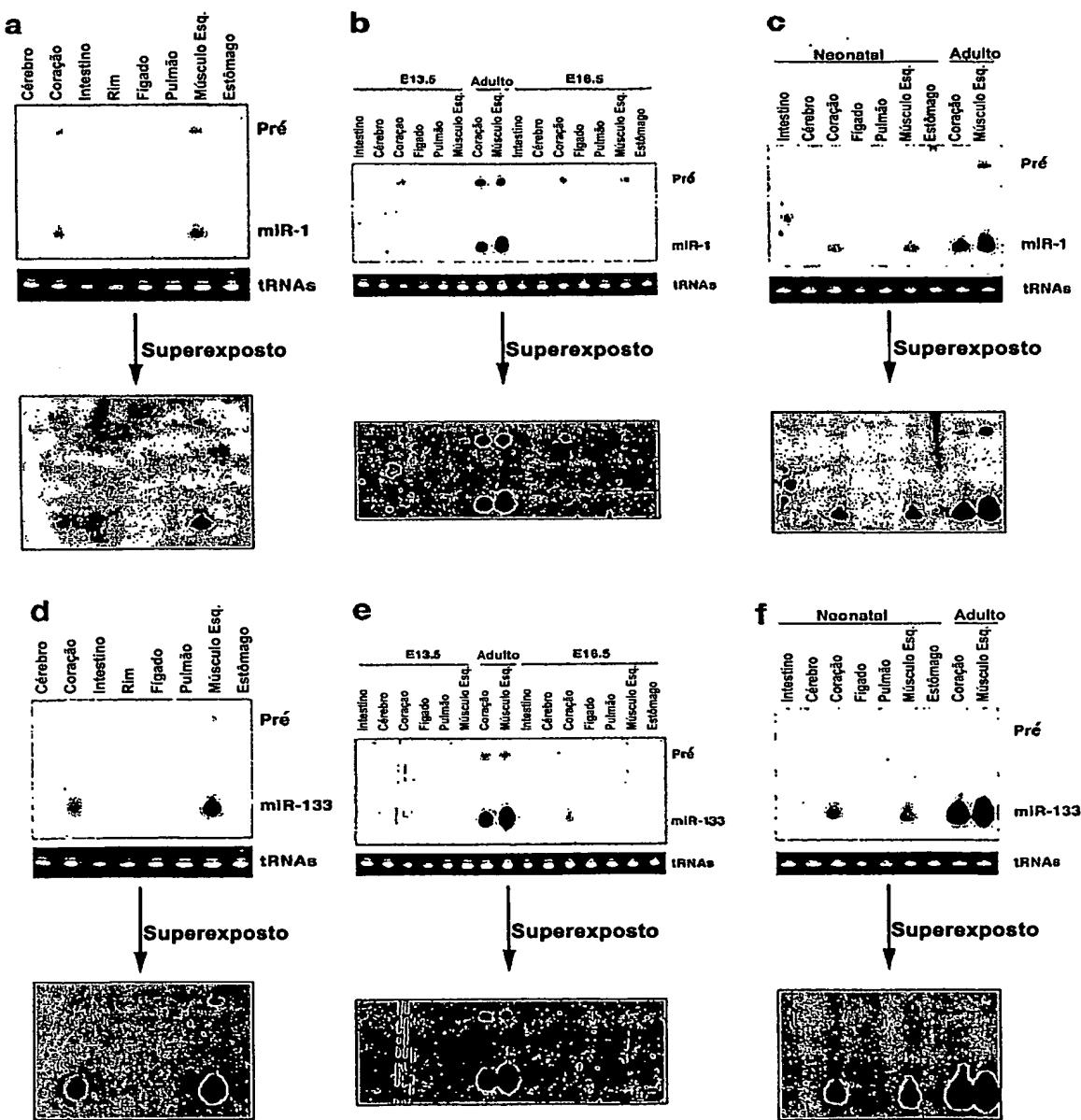


FIGURA 8

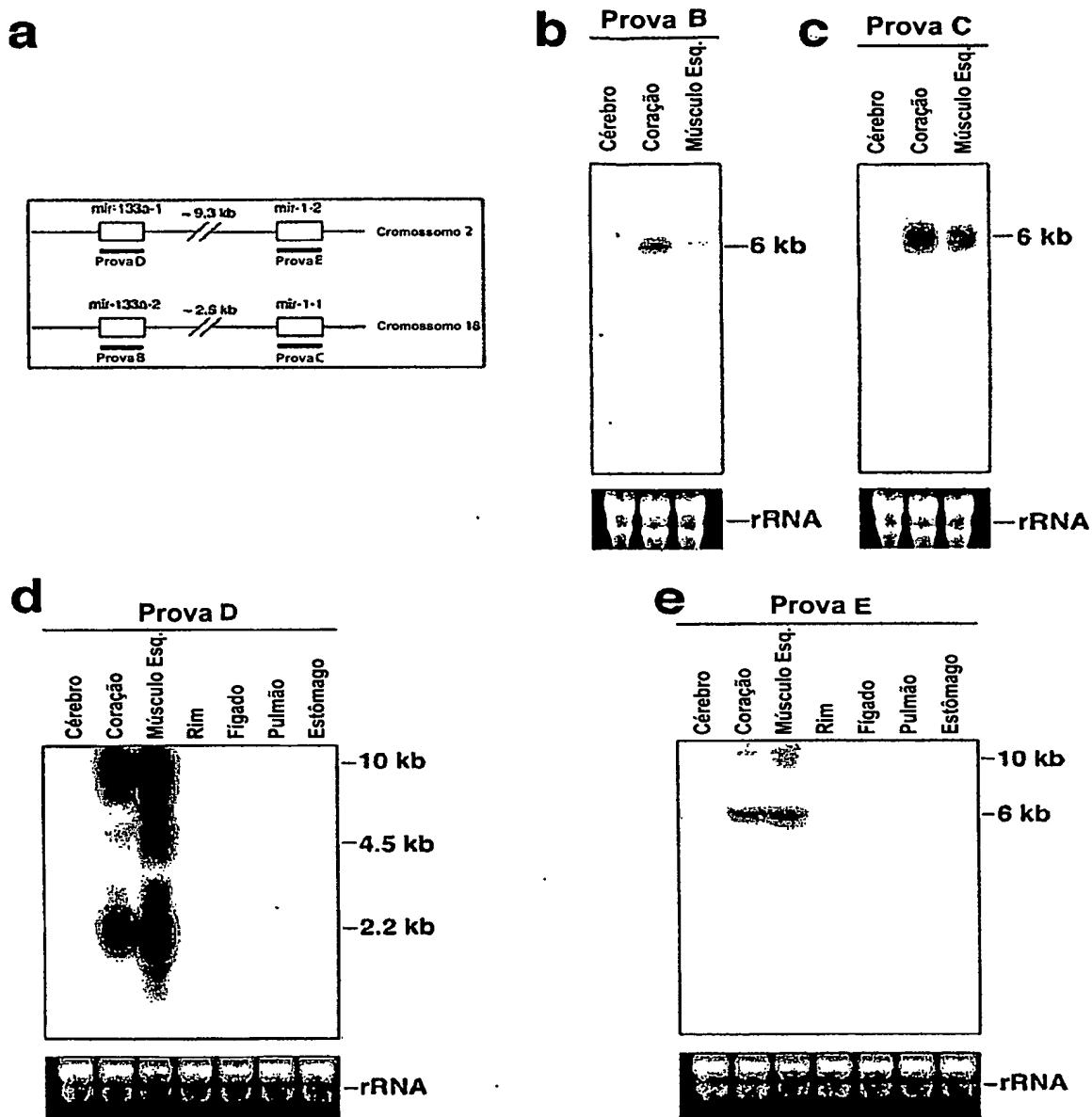


FIGURA 9

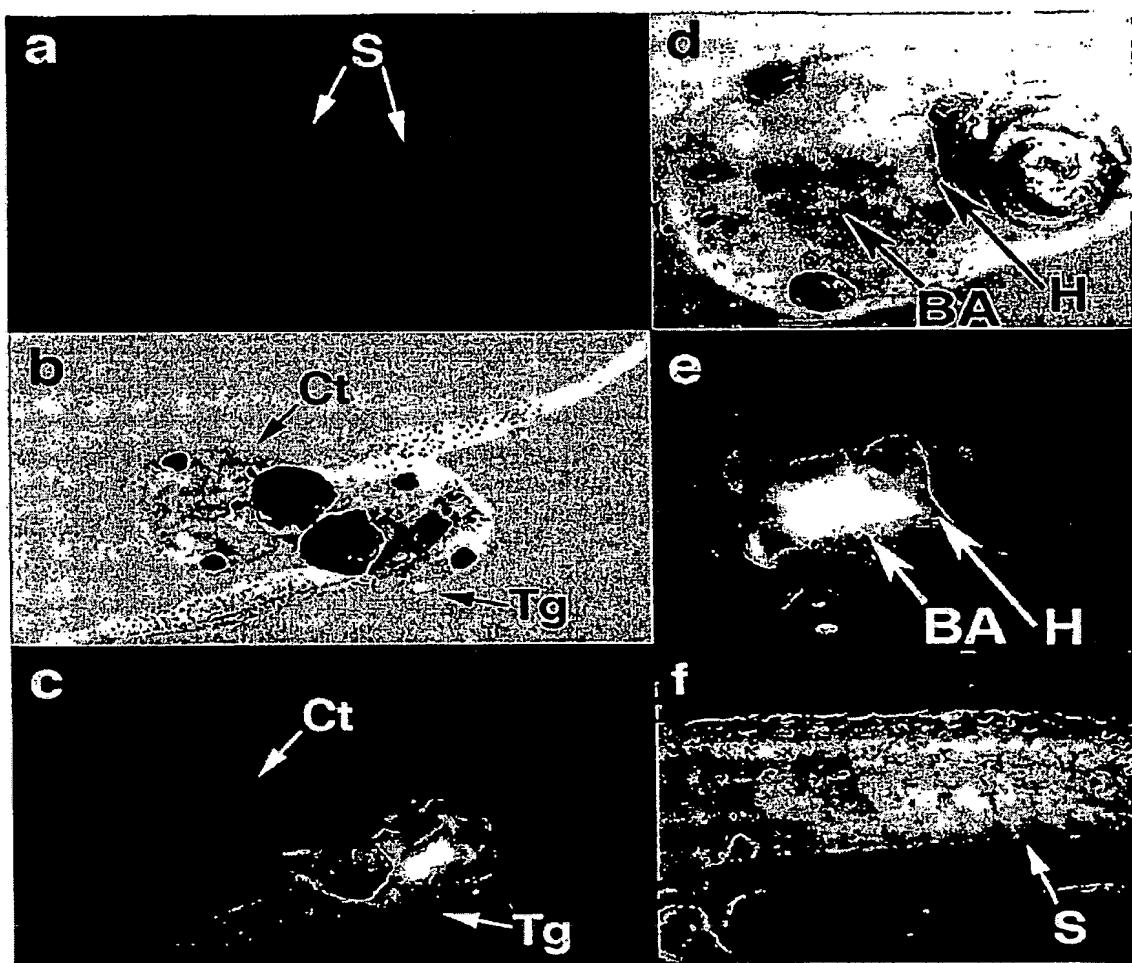


Figura 10

Sequências melhoradora de aglomerado de miR-1/133 do Cromossomo 2

1 GAGCAAGTIT CACCAAGGCC ACACAGTATC ATTGAGCACT GAGCGTGGAA CGAGACAGAT
 61 GGGCCACGT TCTCCCTCTT CTCTCTAGCC TCCCTCTCC CTCCTTTTC TATACATTA
 121 TATCCTGGCG GCAGTTTCTC CTCCCTCCAC TCCCTCCAGT TCCCTCCCCA CTTCCTATTCT
 181 CCCCCAGATC CATTCTCTT ATGCCCCCCC CCCCCAAGAG CAGGCCTTCC AAGAATACCC
 241 ACCAARACATG GCAAAACAAAG TTACAATRAG ATCAGGAAAC AACCTCTATA TCAAGGCTGG
 301 ATGAGGCAC CCAACAGAG GAAARGGGCC CCAAGAGCAG GCAGAATACG CCCACTGTG
 361 TGTCTCTGC TAGAACACAA AGCTACACAA CTATAATGTA TATGAGAGG ACCCAGCTCA
 421 GCTCTCATCG GGTCCGGTGT TGTGCTACA GTTCTGTGA ACCCTCTGTGG GCTCTGCTTA
 481 GTGGGTTCTG TGGGTGTGT TCTGTGGCA TCCCTAACTC CTCGGCTCC TACAATCTT
 541 CCTCCCATCT TCTTGGAGT TCCCTGGCC ATGCCTGTG TTTGGTTGGC TGGCTGTGT
 601 GGGCCTCTGC ATTCATCTCC GTCAAGTTGTGGT GGAAGGCATC CCTCTGTGTA CAGTTGGTCC
 661 ATGCACTGAT CTAAGGAGAT AGCAAGGAT CACTAGGAT TACITATTTG TCTTTTTG
 721 CAGTCGTTT TGGTTCTCTC CCGAGCTCTT GGGCTGTCCA GTCCTCTGGT CCTGGCCTTC
 781 CAGACACTGT CAGTTGGGG TTCCCTTTTG TGGTTGGC CTCAACTTGG CCAGICATIG
 841 GTGGCACT CCCACAAGT CTACACCACC ATTACCCCTAG CAEGTCTCGC AGGCAGGACA
 901 GATTGTACCC GGAAGGATT ATGGCTGGGT TATGCTCAG TCCCAGGGCT GGAAGCCTEG
 961 CCTGGTTAAA GAAGACAGCT AGTCTGACT CAGTATTCCC TGTACTAGC AGAATTCACT
 1021 AGGATTACCC TCACTCTCAG GGCATCTCA CAGCACTAGG GTCTGCTAT GCCTCTCCAA
 1081 TACCCCTCTCC ATTCCTCAGT GCCTTCTCCA GAACCTCTCT CCCCCAGGCT GATCCCTATT
 1141 GTCCCCACCC CCACTCACC CCACTCCACC TACAAAGCIC TTCCCTCTTC CCAAGAAGAT
 1201 CCATGAGTT CTCTGTGCT GTGGAATGGA TATGATCTG TGGATTAGC AGCTATGTT
 1261 CACTTACCAAG TGAGTACACA CGTTGGTCTT TTGGGTCTG GGTACCTCA CTCAGGGTGG
 1321 ATTTGGAT TTCTTCTTG AGTGTCTAC ATTTGTCTGC AAATGTCTAG ATGCAATT
 1381 TTTAACAGC TGAGGAATTC TCTCAGAAC ACATTTCTT TATCCATTAT TCAGAATTGTT
 sitio MEF2
 1441 CCCAGTTCTT GGCTTATATA AGGCTGCTAT GAACTGGTT GAAACAGTGT CCTTGIGGTA
 tcggTACA ca
 (mutação de MEF)
 1501 GGATGTGGCA TCCCTGGGT ATATGCCTAG GAGTGGTATC GATGGGTCCTC GAGGIAGAEC
 1561 ATTCCTGGAT TTCTGAGAA ACTGCCATAT CTGTTCTCAA AGTGGCTGTG TAAGTTGCG
 1621 CCTCCCTCCAG CAACGGAGGA GTGTTCTCTT TACTCCTCTCC ACATTAATCAA CAGTGTGAGC
 1681 TGTCACTTGT GTTCTGTGTC TTAGCCTTTC TGCAGGGGT AGATGGAAZ CECAAAGTAG
 1741 CTTGTGTTTG CATTCTCTG CTGGCTAAGG ATGTGAAACA TTCTTAAAG TGTTCCTCAG
 1801 CCATTGAGA TTATCCATT GAGAACTCTG TTAGATCTG RACTCCACCI TCTAATTGGAA
 1861 TTAATGGGT TTAAATAT CCACTCTCTG GAGTCTCTAA TGGTTCTGG ATATTAGCCC
 1921 TCTGTAAAT GGGAGTGGT GAGAACTCTT TTCCCATCTG GTAGGTTTG CCTTATGAC
 CAG Box
 1981 AGTGTCTTT GCTCACAGA AGCTTTCTAG TTTCATGAGG TCCCATTAT TGATTGTTGA
 atcttggc ct
 (mutação do CAG Box)
 2041 TCTTAGTGCC TGTGCTATTG ATGTCTATC AGGAAGTGT CTCCTGTGCC AATGCGTTCA
 2101 AGGCTATTC CCACTCTCTC TTCTATAGG TTCAGTGTAT CTCAATTATG TGGAGGTCT
 2161 TGGATCCACI TAGAGTGGAG TTGTGGCAG AGTGTATAGAT ATGGATCTAT TGGCAATTCT
 2221 CTACATGCGAG ATATCCAGTA AGACCAAGCAT CATTATATGC GGAIGCTTT TAAATTCTT
 2281 CGCTTGTGAA TTCTGGCTT CTTTATAAAA ATCAGGTGT CACTGATTC ATGATCAGC
 2341 CAATGCTTT CTGCCGAAAC CAEGTGGTTT TATGCTATA GCCTGTGAGG ACAGCTTGAG
 2401 TCAGGGATGT GATGCCCTG GACGTCTCTT TATGTTACAG GAGTATCTA GGETTAGCTA
 2461 TCCTTAGGTGTT TTGGTCTTC CACATGGAGT TGGATATGT CCTTCAAGG TCTATAGAGA
 2521 ATGCAATTGG GATTTGGTG GAGATTTGAT TGGCAATTGTA GATTTGGTAG GGTGGCCATT
 2581 TTATCTATGG TAACTCTACC

FIGURA 10G

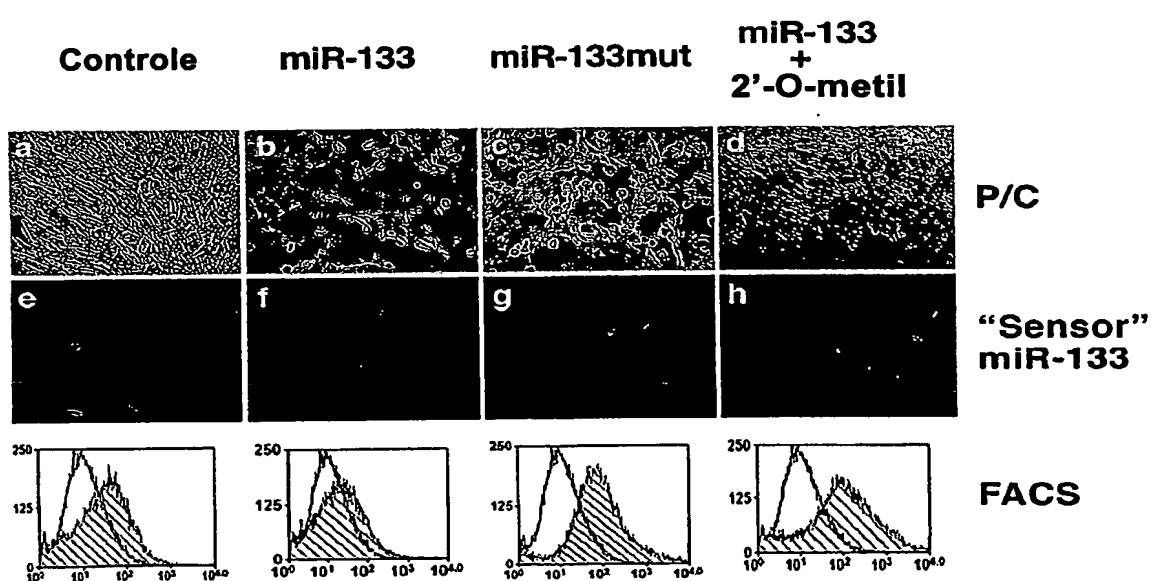


FIGURA 11

FIGURA 12

UTR 3' HDAC4

UTR 3' SRF

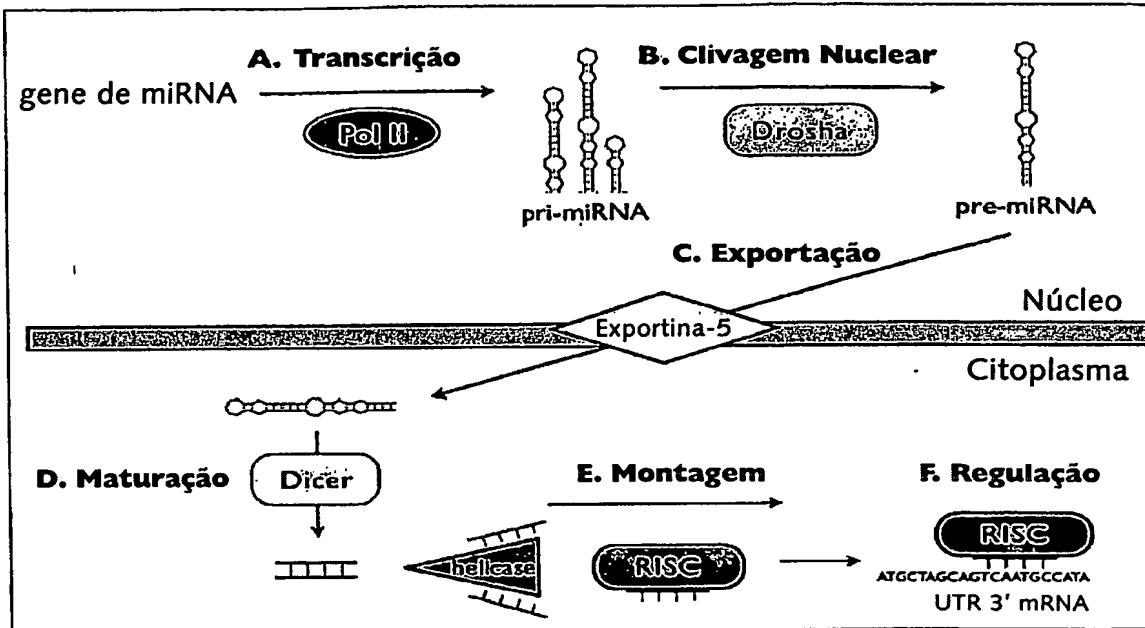


FIGURA 13

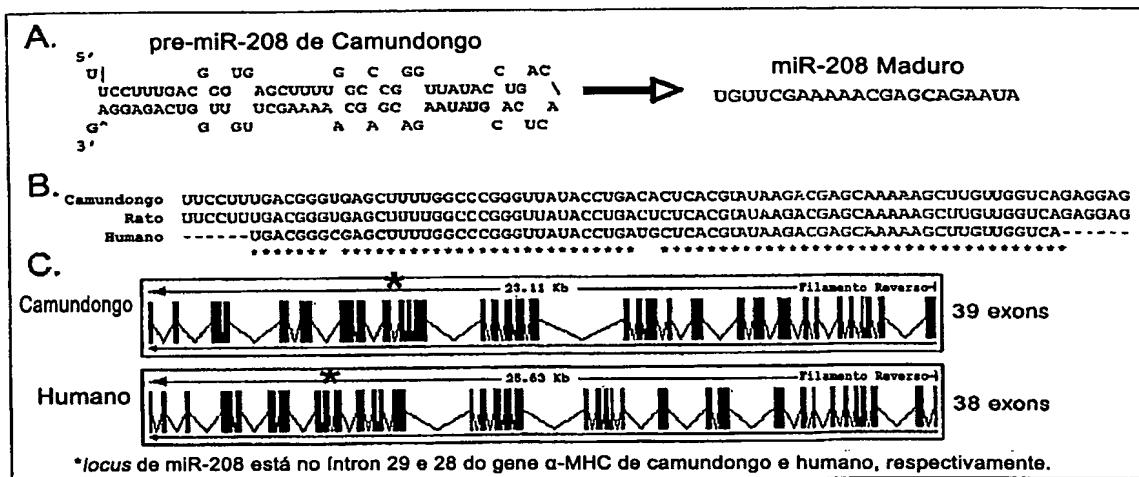


FIGURA 14

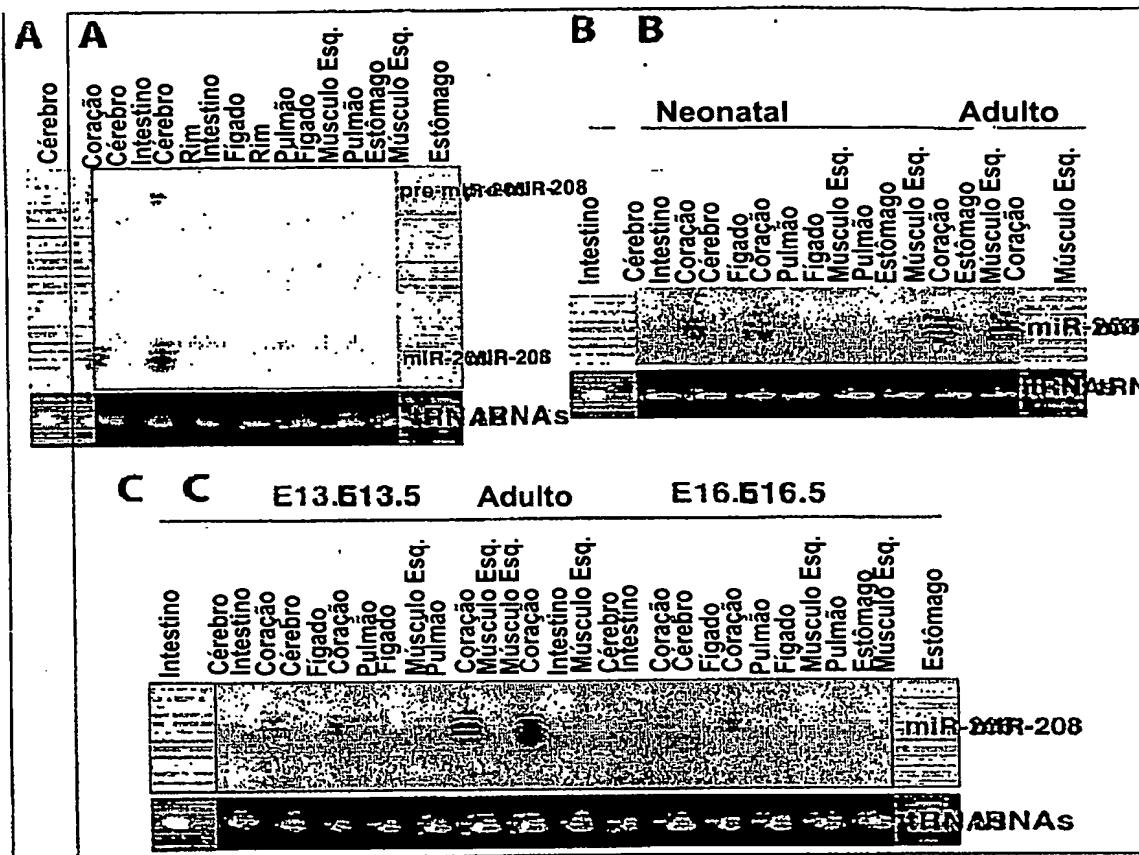


FIGURA 15

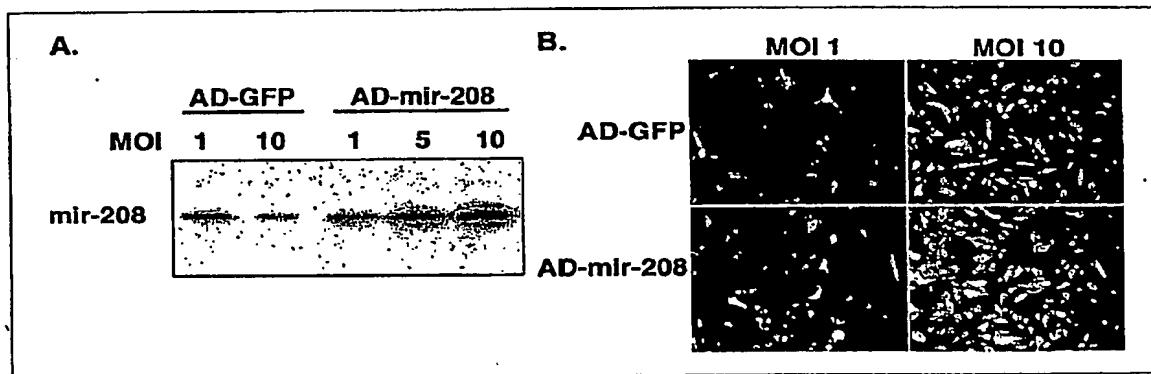


FIGURA 16

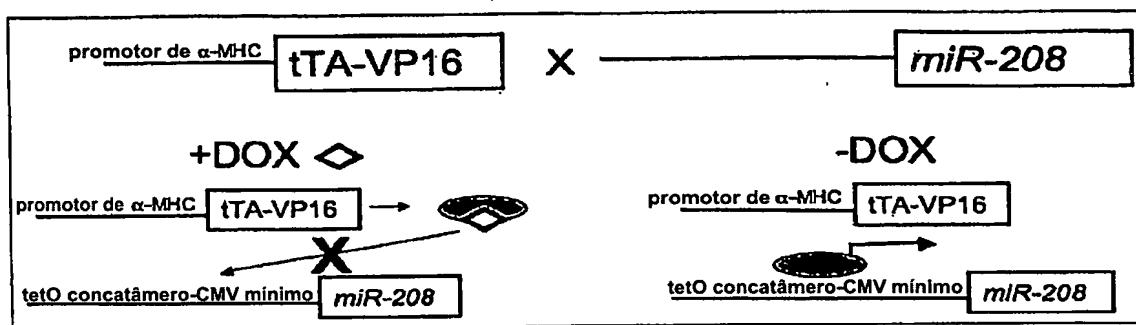
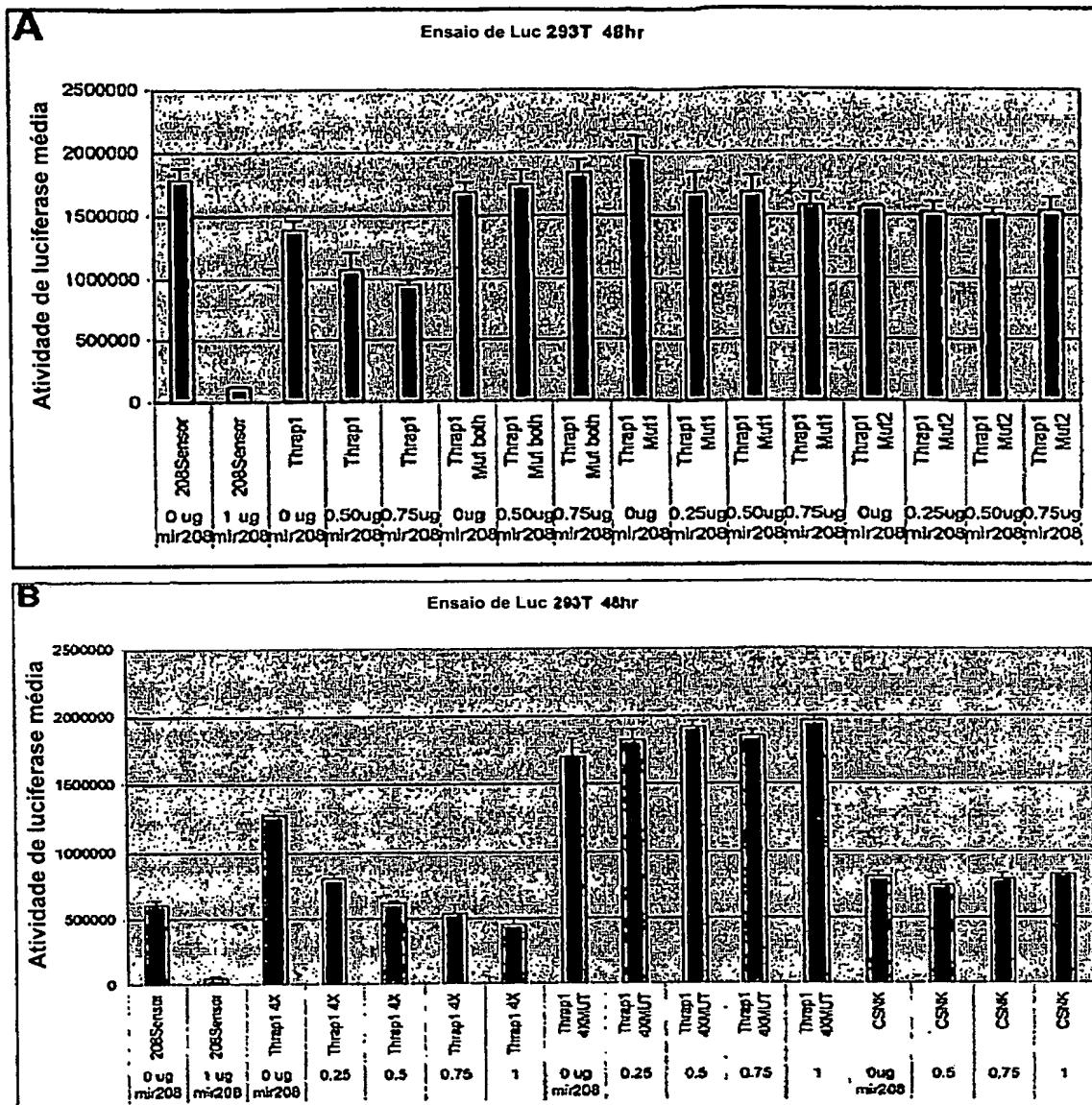


FIGURA 17



C.

3' UGUUCGAAAAACG--AGCAGAAUA 5' miRNA Humano: hsa-miR-208 (UCSC) (Rfam)
 Escore: 144, Energia: -10.9 kCal/mol
 Transcrição humana: ENST00000262436
 Conservação: 100.0%
 532:5' CUAAAAAUUAUGUAAUCGUCUUAA 3' Transc. de Camundongo: ENSMUSG00000034297
 Escore: 144, Energia: -10.9 kCal/mol
 3' UGUUCGAAAAACG--AGCAGAAUA 5' miRNA de Camundongo: mmu-miR-208 (Rfam)

FIGURA 18

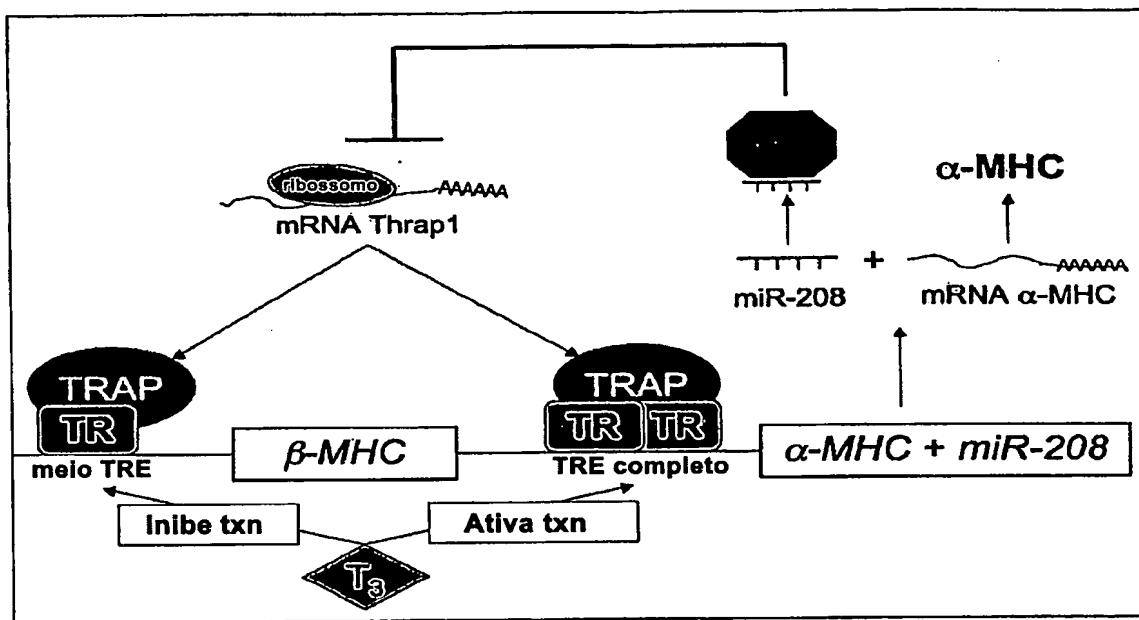


FIGURA 19

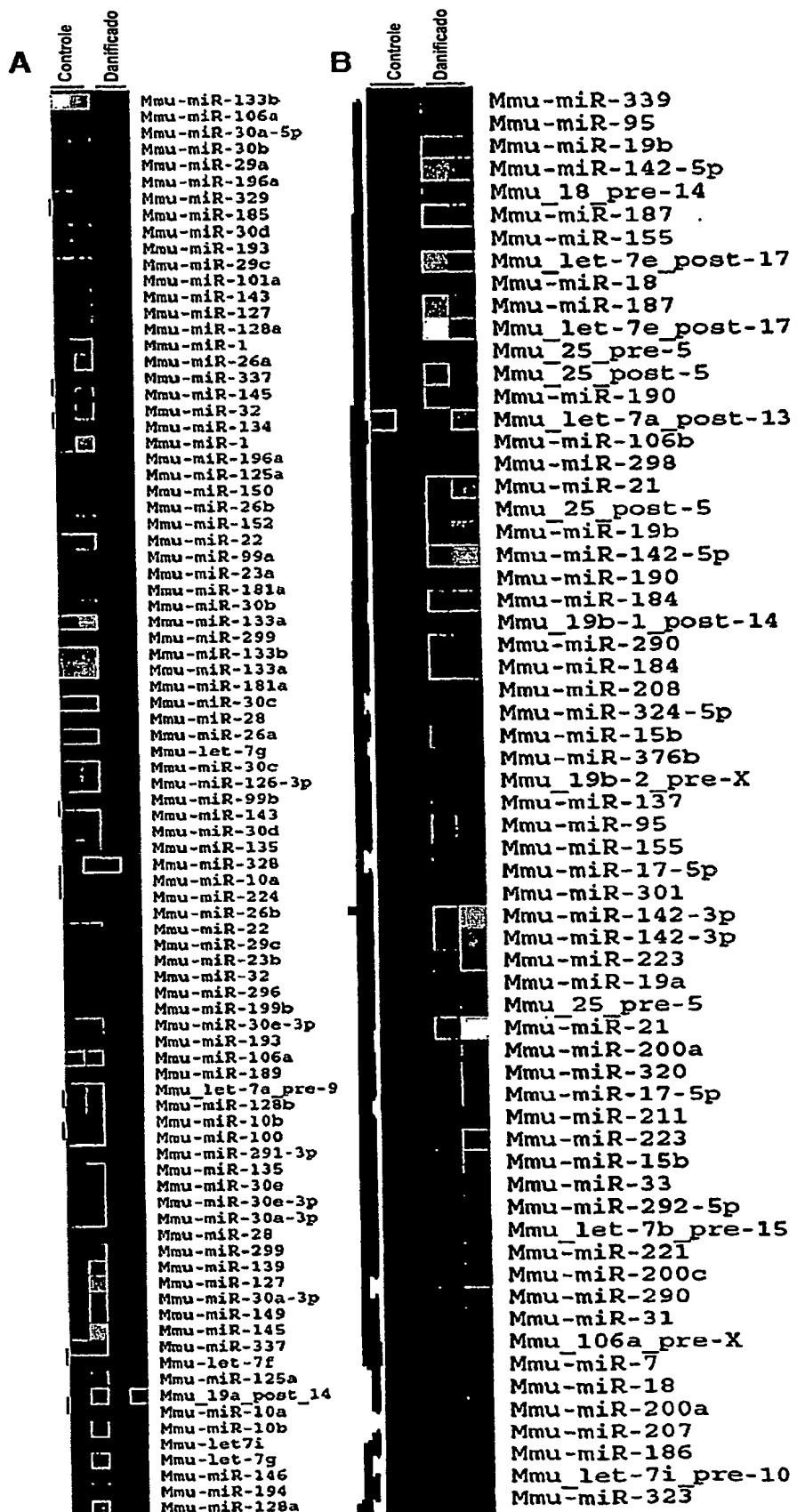


FIGURA 20

miR-26 (ID de Seq No:6)

mmu-miR-26a MIMAT0000533

UUCAAGUAUAUCCAGGAUAGGC (ID de Seq No:12)

mmu-miR-26b MIMAT0000534

UUCAAGUAUAUCAGGAUAGGUU (ID de Seq No:13)

miR-29 (ID de Seq No:7)

mmu-miR-29a MIMAT0000535

UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU (ID de Seq No:14)

mmu-miR-29b MIMAT0000127

UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (ID de Seq No:15)

mmu-miR-29c MIMAT0000536

UAGCACCAUUUGAAAUCGGU (ID de Seq No:16)

miR-30 (ID de Seq No:8)

mmu-miR-30a-3p MIMAT0000129

CUUUCAGUCGGAUGUUUUGCAGC (ID de Seq No:17)

mmu-miR-30b MIMAT0000130

UGUAAACAUCCUACACUCAGCU (ID de Seq No:18)

mmu-miR-30c MIMAT0000514

UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC (ID de Seq No:19)

mmu-miR-30d MIMAT0000515

UGUAAACAUCCCCGACUGGAAG (ID de Seq No:20)

mmu-miR-30e* MIMAT0000249

CUUUCAGUCGGAUGUUUACAG (ID de Seq No:21)

miR-128 (ID de Seq No:9)

mmu-miR-128a MIMAT0000140

UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU (ID de Seq No:22)

mmu-miR-128b MIMAT0000675

UCACAGUGAACCGGUCUCUUUC (ID de Seq No:23)

**miR-1 é progressivamente expresso durante diferenciação
de célula satélite de músculo esquelético**

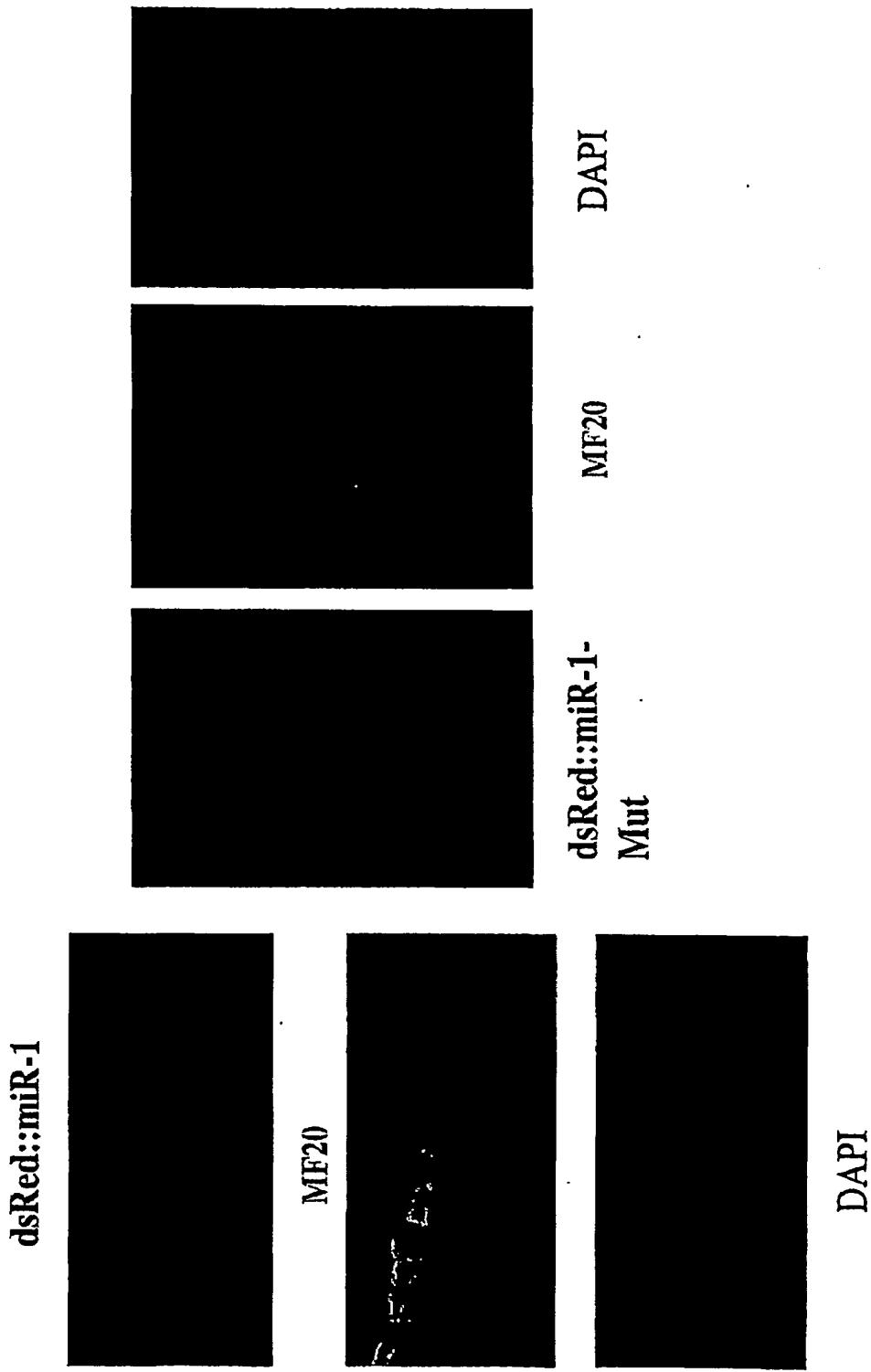


FIGURA 22

Sistema de expressão miR-1/206

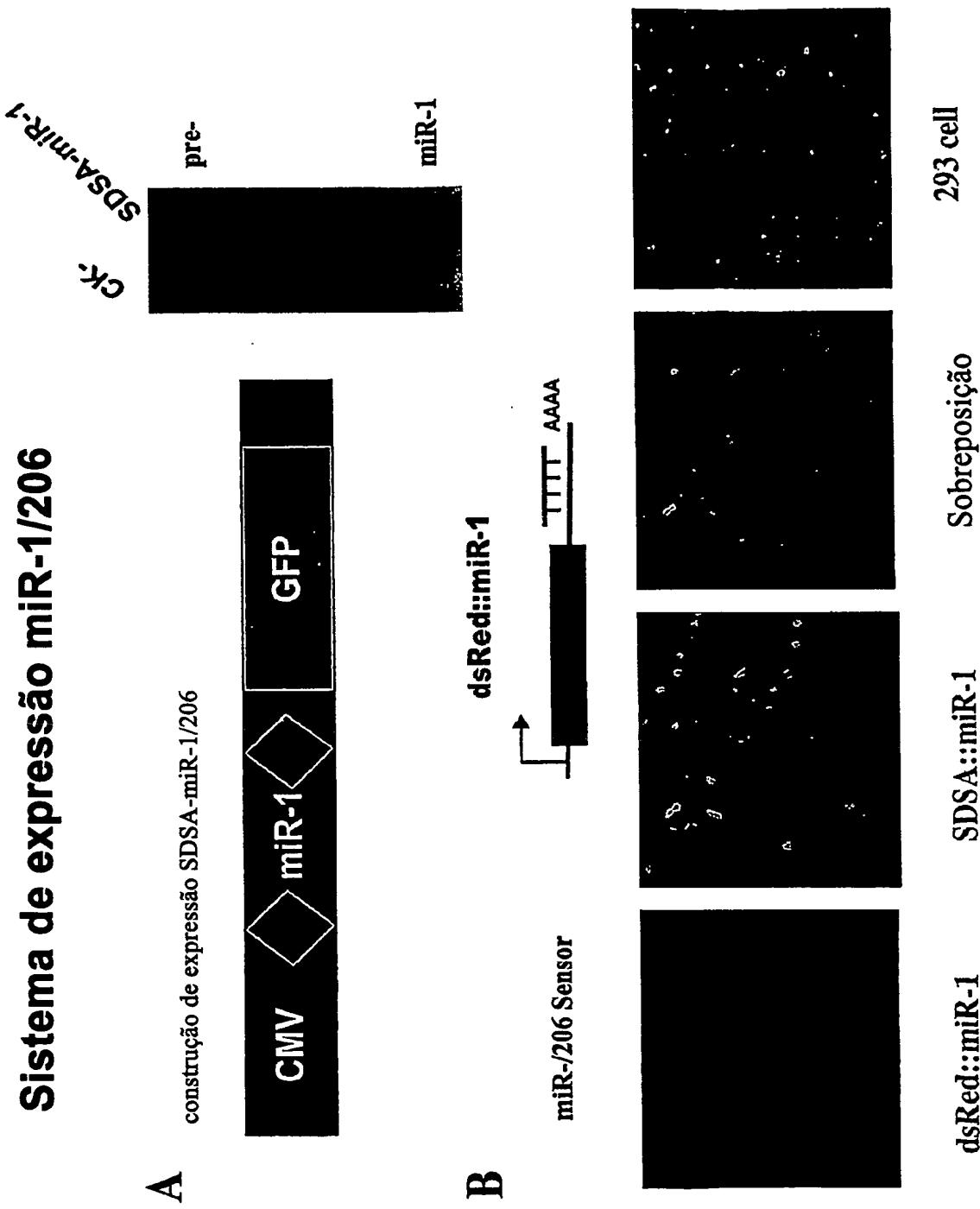


FIGURA 23

FIGURA 24

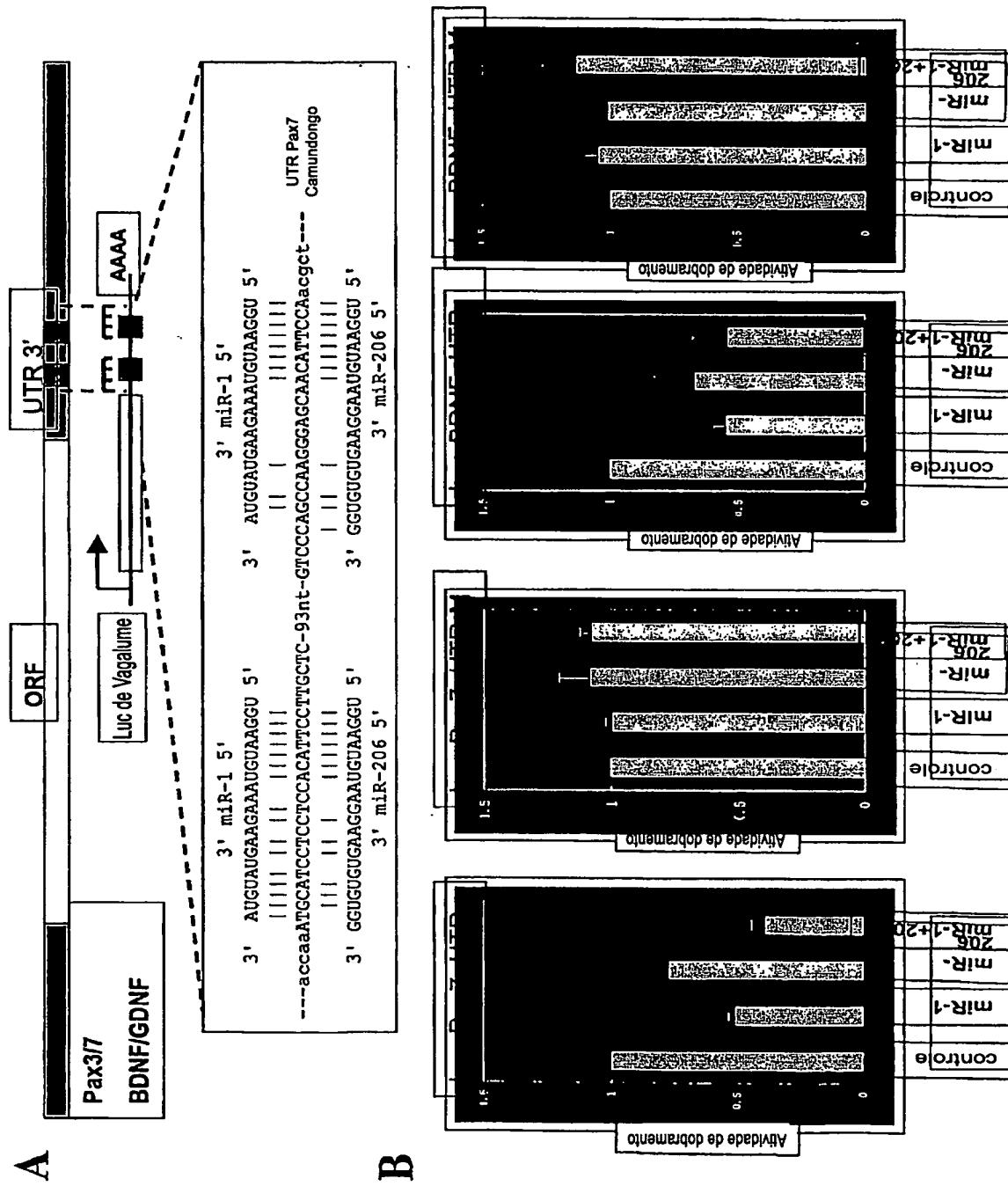


FIGURA 25

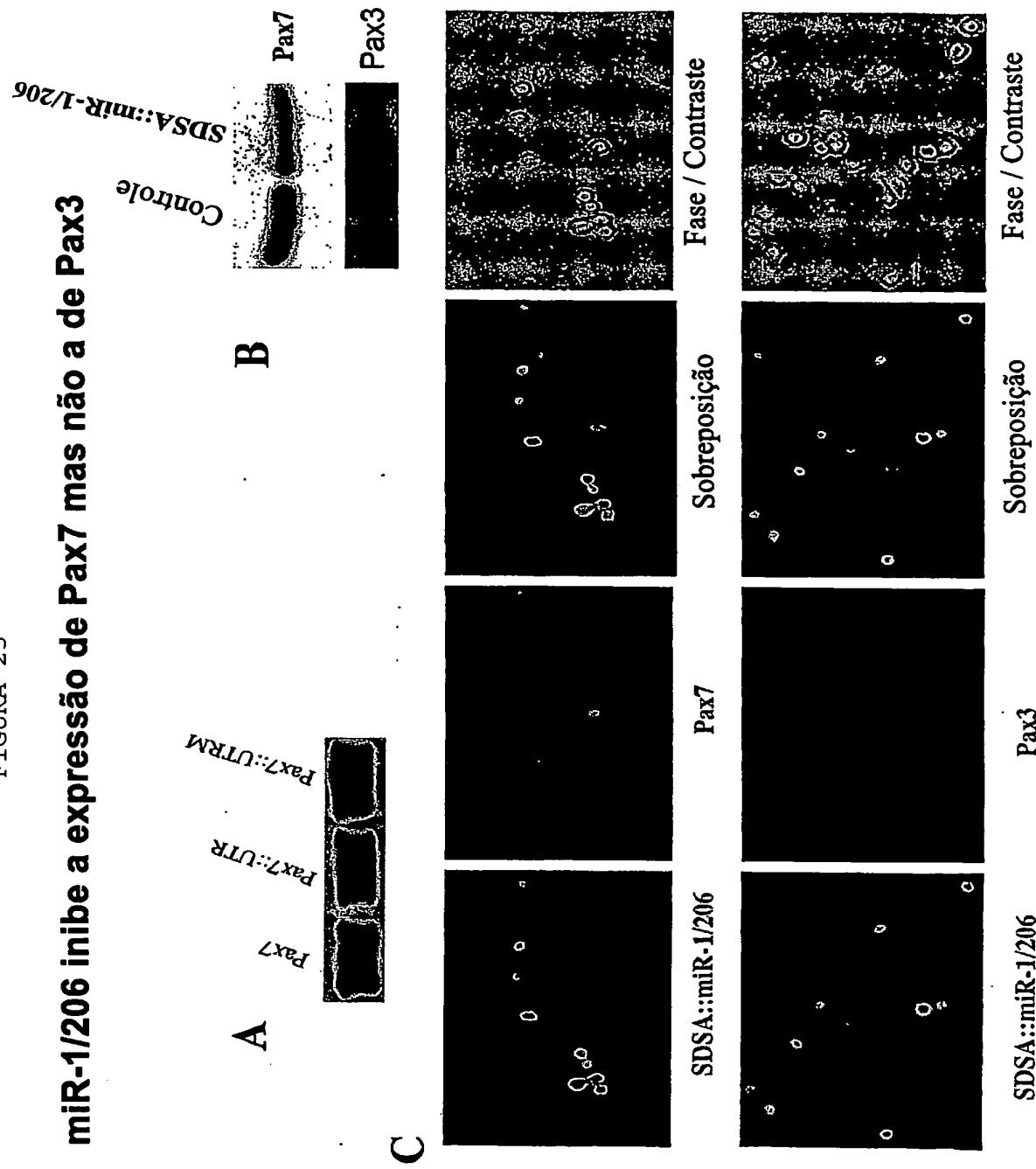
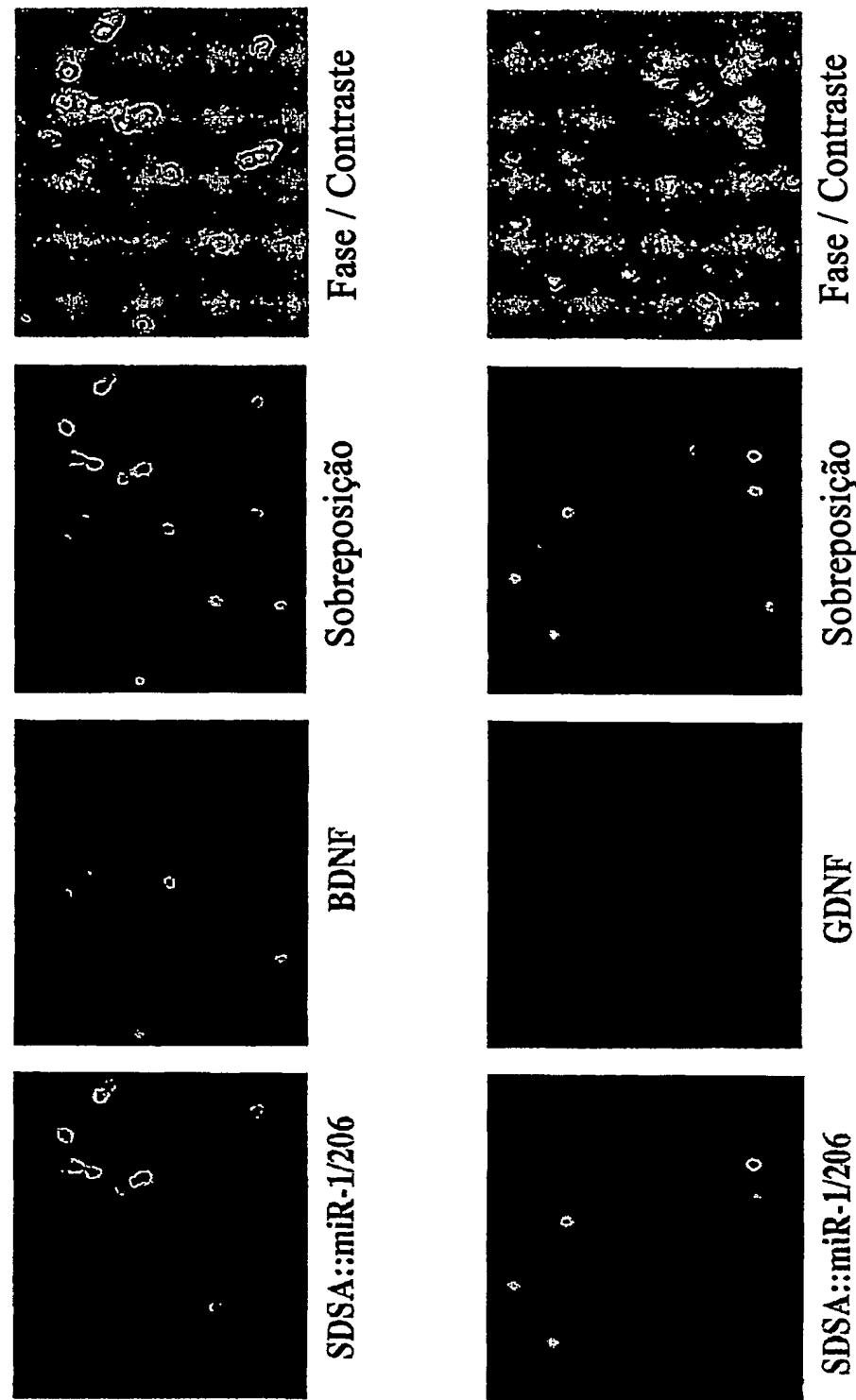
miR-1/206 inibe a expressão de Pax7 mas não a de Pax3

FIGURA 26

MiR-1/206 inibe a expressão de BDNF mas não de GDNF

miR-1/206 inibe proliferação de célula satélite

FIGURA 27

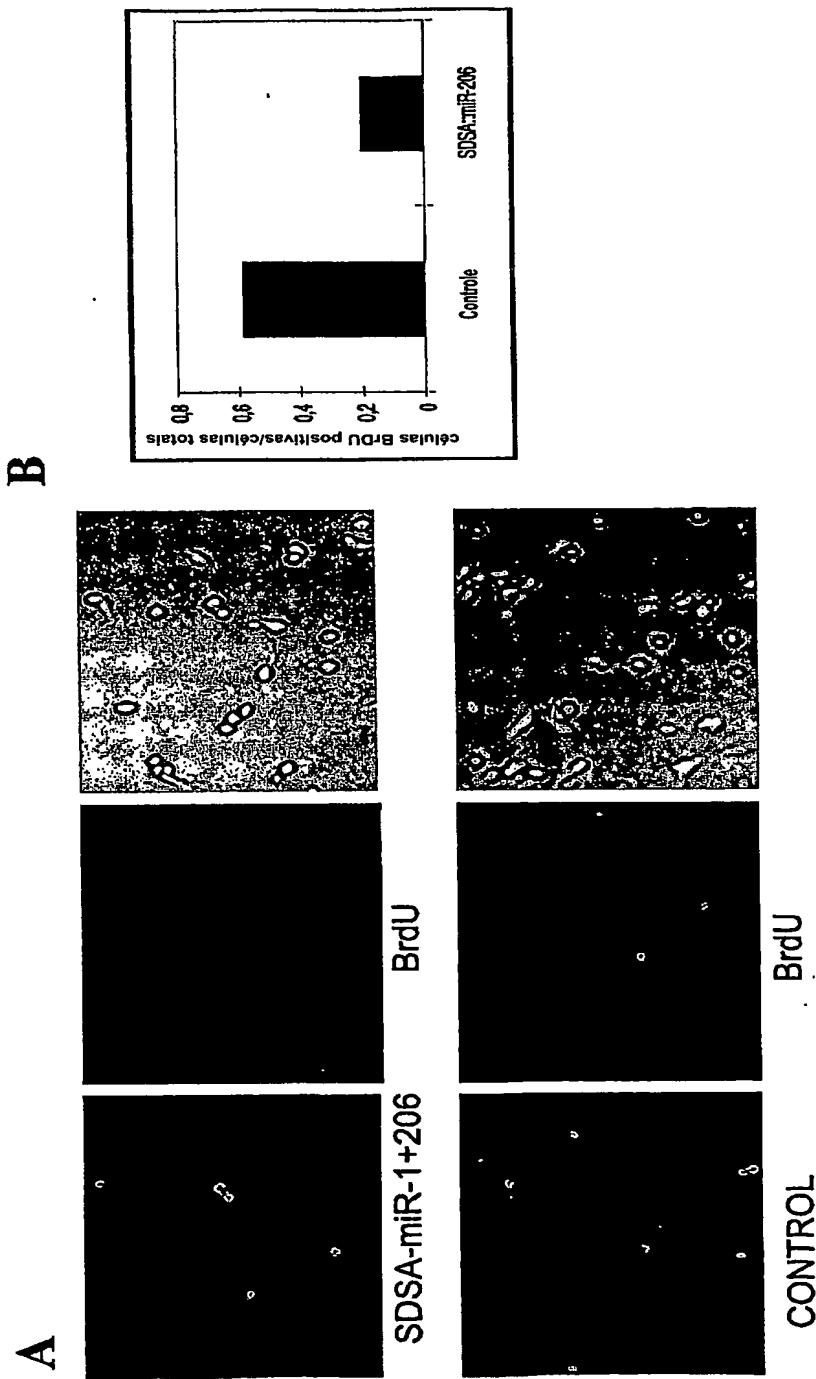
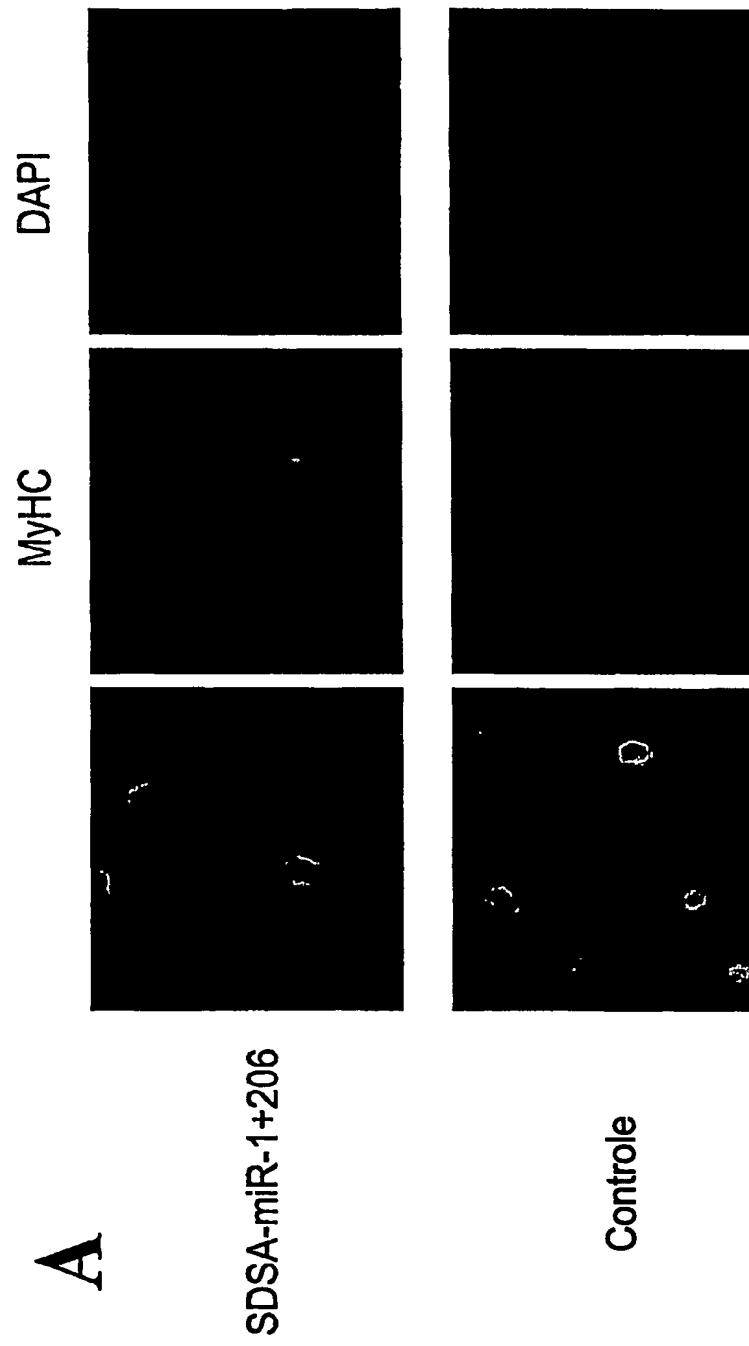


FIGURA 28

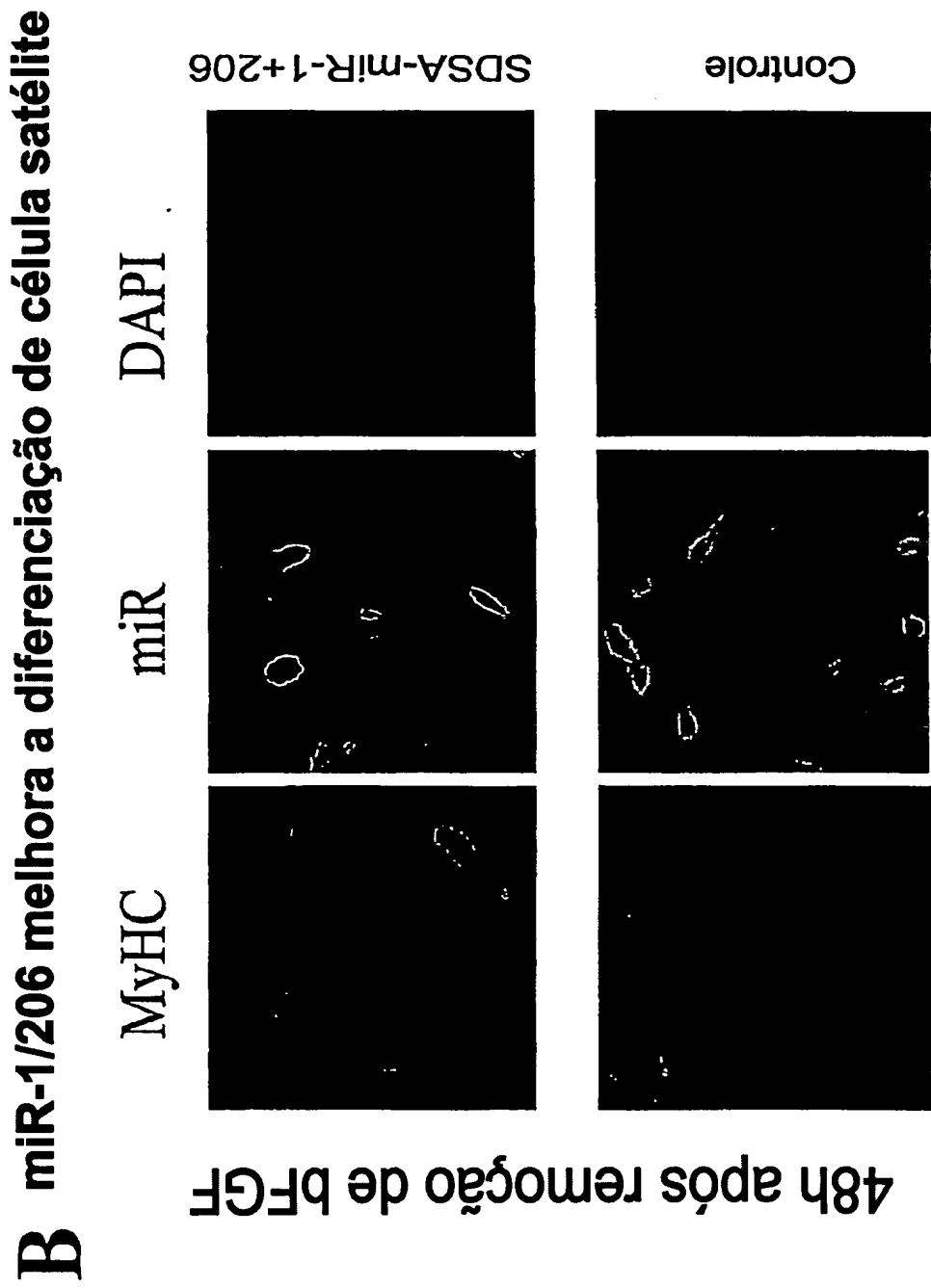
miR-1/206 melhora a diferenciação de célula satélite

A



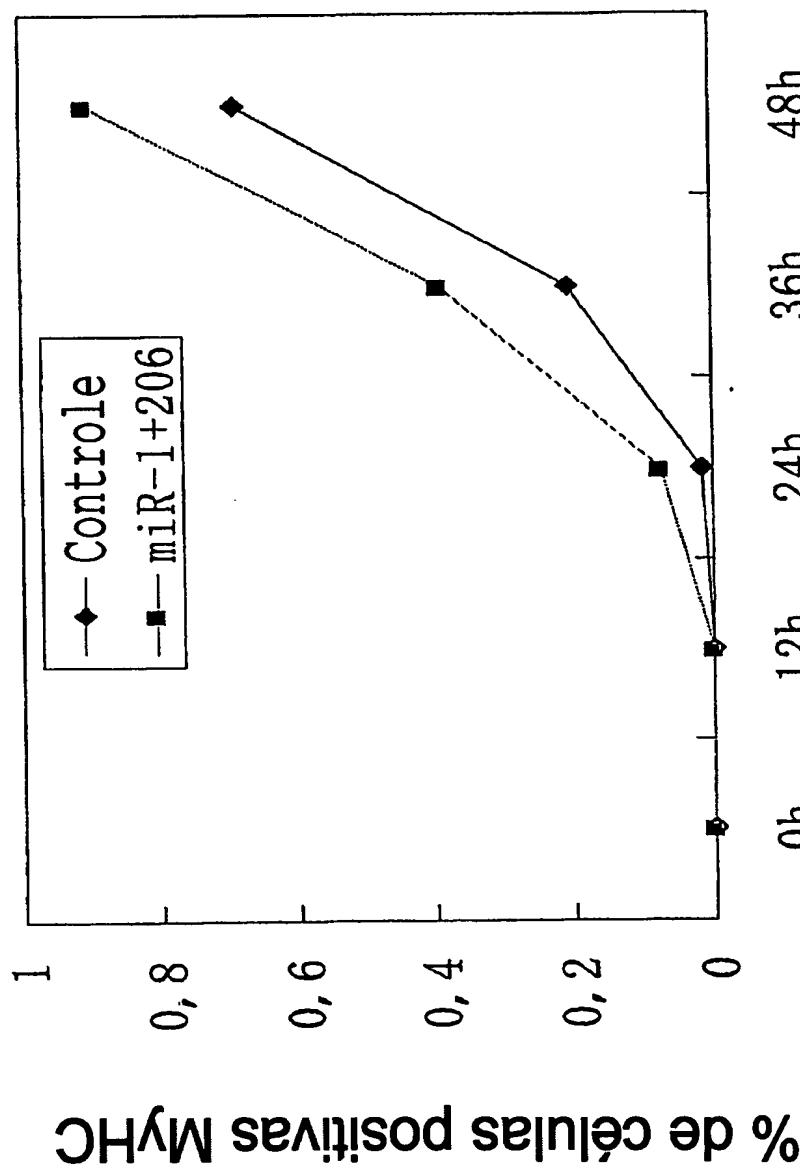
24h após remoção de bFGF

FIGURA 28



Superexpressão de miR-1/206 melhora cinética de diferenciação de célula satélite

FIGURA 29

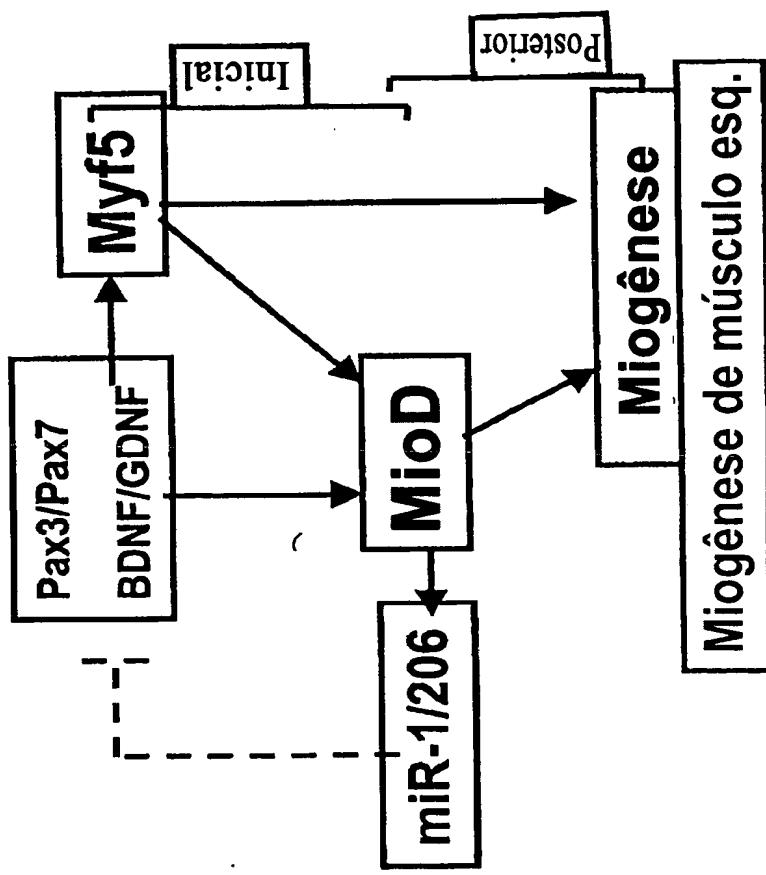


Horas após remoção de bFGF

FIGURA 30

Modelo de Trabalho

A expressão de miR-1/206 facilita a transição de desenvolvimento de músculo esquelético reprimindo mensageiros indesejados de BDNF/Pax7 que são prejudiciais para a diferenciação de músculo esquelético.



MICRORNAS QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE
CÉLULAS MUSCULARES

O assunto presentemente divulgado fornece métodos e composições para modular a expressão de gene em miócitos.

- 5 São também fornecidas células compreendendo as composições do assunto presentemente divulgado.