

(11) Número de Publicação: **PT 1969125 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 15/113** (2011.01) A61P 21/00 (2011.01)

---

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2006.12.12**

(30) Prioridade(s): **2005.12.12 US 749544 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.09.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.06.13**  
**157/2012**

(73) Titular(es):

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT  
CHAPEL HILL  
308 BYNUM HALL CAMPUS BOX 4105 CHAPEL  
HILL, NC 27599-4105 US**

(72) Inventor(es):

**DA-ZHI WANG US  
JIANFU CHEN US**

(74) Mandatário:

**JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES  
RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA PT**

---

(54) Epígrafe: **MICROARNS QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES**

(57) Resumo:

O PRESENTE INVENTO FORNECE MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA MODULAR A EXPRESSÃO GÉNICA EM MIÓCITOS. TAMBÉM SE FORNECEM CÉLULAS QUE COMPREENDEM AS COMPOSIÇÕES DO ASSUNTO PRESENTEMENTE DIVULGADO.

**RESUMO**

**MICROARNs QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE  
CÉLULAS MUSCULARES**

O presente invento fornece métodos e composições para modular a expressão génica em miócitos. Também se fornecem células que compreendem as composições do assunto presentemente divulgado.

## DESCRIÇÃO

### **MICROARNS QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE CÉLULAS MUSCULARES**

#### CAMPO TÉCNICO

O assunto presentemente divulgado refere-se, geralmente, a métodos e composições para modular a expressão génica num miócito. Mais particularmente, o assunto presentemente divulgado refere-se a métodos de utilização dos microARNs (miARNs) para modular o nível de expressão de um gene num miócito, e a composições que compreendem miARNs.

#### ANTECEDENTES

Compreender os mecanismos moleculares que regulam a proliferação e diferenciação celular é um tema central da biologia do desenvolvimento. Os microARNs (miARNs) são uma classe recentemente descoberta de ARNs reguladores de ~22 nucleótidos que regulam de forma pós-transcricional a expressão génica <sup>1,2</sup>. Evidência crescente tem apontado para a função potencial dos miARNs numa variedade de processos biológicos <sup>3-8</sup>.

ZHAO Y ET AL: "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD-DOI:10.1038/NATURE03817, vol. 436, nº 7048, 1 de Julho de 2005, páginas 214-220 descreve o papel de miR-1 em células musculares e corações. Mostra-se que miR-1-1 é especificamente expresso em células precursoras musculares esqueléticas e cardíacas e que os genes de miR-1 são alvos transcricionais directos de reguladores de diferenciação

muscular incluindo efeitor de resposta de soro, MyoD e Mif2. Sugere-se que genes de miR-1 titulam os efeitos de proteínas reguladoras cardíacas críticas para controlar o equilíbrio entre diferenciação e proliferação durante a cardiogénesis. Uma combinação com miR-133 não é, no entanto, descrita.

Entretanto, permanece uma necessidade antiga e contínua na técnica de caracterização da função ou funções dos miARNs nos processos biológicos. O assunto presentemente divulgado direciona-se a esta e a outras necessidades na técnica.

## SUMÁRIO

Este sumário lista várias formas de realização do assunto presentemente divulgado, e em muitos casos lista as variações e permutações destas formas de realização. Este sumário é meramente exemplar das numerosas e variadas formas de realização. Alusão a uma ou mais características representativas de uma dada forma de realização é igualmente exemplar. Tal forma de realização pode tipicamente existir com ou sem a(s) característica(s) mencionada(s); do mesmo modo, essas características podem ser aplicadas a outras formas de realização do assunto presentemente divulgado, se listado neste Sumário ou não. Para evitar a repetição excessiva, este Sumário não lista ou sugere todas as combinações possíveis de tais características.

Numa forma de realização do assunto presentemente divulgado, fornecem-se agentes para utilização num método para tratar uma lesão muscular num indivíduo. Especificamente, miARN-133 e um inibidor de miARN-1 são administrados em combinação ao local de lesão muscular num

ponto de tempo e um miARN-1 e um inibidor de miARN-133 são administrados em combinação ao local de lesão muscular num segundo ponto de tempo para, deste modo, tratar a lesão muscular. Em algumas formas de realização, a lesão muscular é o resultado de um traumatismo muscular mecânico, uma doença degenerativa muscular, uma lesão cardíaca, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas formas de realização, o indivíduo é um mamífero.

Numa outra forma de realização do assunto presentemente divulgado, fornece-se um método *in vitro* para modular a diferenciação e proliferação do miócito ou ambas. Em algumas formas de realização, o método compreende contactar um miócito com um miARN (e um inibidor de miR-133 ou com miR133 e um inibidor de miR-1) ou um vector que codifica o dito miARN alvo a um gene no miócito que pode modular a diferenciação e proliferação do miócito ou ambas. Em algumas formas de realização, a modulação é inibidora e em algumas formas de realização, o miARN inibe a tradução do gene.

Em ainda uma outra forma de realização, fornece-se uma quantidade eficaz de um inibidor de miR-1 e miR-133, ou de miR1 e um inibidor de miR-133 para tratar uma lesão muscular.

Em algumas formas de realização dos métodos divulgados no presente documento, o miARN utilizado compreende uma sequência de nucleótidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS: 1 e 2 e sequências pelo menos 70% idênticas a qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 e 2. O miARN é seleccionado de miR-1 e miR-133. Também, em algumas formas de realização, o miARN é dirigido para uma região não traduzida 3' do gene.

Também, em algumas formas de realização dos métodos, o gene alvo para o miARN é seleccionado a partir do grupo que consiste num gene de diferenciação de miócito (por exemplo, um gene que codifica um polipéptido histona desacetilase 4 (HDAC4) ou uma proteína do receptor de hormona da tireóide 240 (TRAP240)), um gene de proliferação de miócito (por exemplo, um gene que codifica um polipéptido de factor de resposta a soro (SRF)) e uma proteína relacionada a hormona (por exemplo, um gene que codifica a proteína associada ao hormona da tireóide 1 (Thrap1)).

Proporcionam-se vectores que codificam um miARN, também. Em algumas formas de realização, o vector comprehende um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico que codifica a molécula de miARN, e uma sequência de terminação de transcrição. Também, em algumas formas de realização, o vector é incorporado num kit também que comprehende pelo menos um reagente para introduzir o vector num miócito. O kit, em algumas formas de realização, também comprehende instruções para introduzir o vector num miócito.

Consequentemente, é um objectivo do assunto presentemente divulgado fornecer agentes para utilização num método para manipular a expressão do gene num miócito usando uma abordagem mediada por miARN. Este objectivo é alcançado totalmente ou em parte pelo assunto presentemente divulgado.

Um objectivo do assunto presentemente divulgado tendo sido declarado acima, outros objectivos e vantagens tornar-se-ão aparente aos peritos com habilidade ordinária na especialidade após um estudo da seguinte descrição do assunto presentemente divulgado e exemplos não limitativos. Os dados que se referem a outros miRNAs são proporcionados

por razões comparativas somente.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

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

A Figura 1a mostra os dados de expressão de arranjos de miARN 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 pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. O intervalo 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 miARN que são regulados em meio de diferenciação são mostrados.

A Figura 1b descreve uma análise de Northern blot da expressão de miR-1 e miR-133 usando-se o ARN total isolado de mioblastos C2C12 em cultura em GM ou em DM para 0, 1, 3 e 5 dias, respectivamente. TARNs foram usados como um controlo de carga.

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

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

A Figura 1e descreve uma análise de Northern blot da

expressão de miR-1 e miR-133 em tecidos de ratinho neonatal. A mesma quantidade de ARNs total de músculo do coração e esquelético adulto foi carregada em manchas para servir como uma comparação com ARN embriônico e neonatal (Figuras 1d e 1e).

As Figuras 2a-2j descrevem 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 electroporados com dúplices de miARN de cadeia dupla para miR-1, miR-133 e GFP como um controlo.

As Figuras 2a-2e mostram resultados de experiência onde as células foram continuamente colocadas em cultura em GM durante 24 horas após a transfecção, então transferidas ao meio de diferenciação (DM) durante 12 horas antes da imunocoloração para miogenina (Figura 2a) ou 36 horas antes da imunocoloração para MHC (Figura 2b). Os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram electroporados com dúplices de miARN de cadeia dupla para miR-1, miR-133 (ou seus mutantes conforme indicado), ou miR-208 e GFP como controlo e colocados em cultura durante 24 horas antes: Northern blot usando o anticorpo indicado (Figura 2c), as células foram transferidas a DM durante 24 horas e RT-PCR para os genes indicados foi executado (Figura 2d), ou células foram transferidas ao DM durante 24 horas e Northern blot usando-se os anticorpos indicados (Figura 2e).

As Figuras 2f-2h mostram os resultados de experiências onde os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram electroporados com os inibidores de oligonucleótido antissense 2'-o-metil para miR-1, miR-133 ou miR-208 e

GFP como controlos. As células foram colocadas em cultura em GM durante 24 horas após a transfecção e então transferidas em DM durante: 12 horas antes da imunocoloração para fosfohistona H3 (Figura 2f); 24 horas antes de executar RT-PCR para os genes indicados (Figura 2g) ou durante 24 horas antes de Northern blot usando-se os anticorpos indicados (Figura 2h).

As Figuras 2i e 2j mostram resultados de experiências onde os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram electroporados com os dúplices de miARN ou com os inibidores de oligonucleótido antissense 2'-o-metil conforme indicado. As células foram colocadas em cultura em GM durante 24 horas após a transfecção, então foram transferidas em DM durante 12 horas antes da imunocoloração para miogenina (Figura 2i) ou fosfohistona H3 (Figura 2j). Células com manchas positivas foram contadas e os dados são apresentados como o nível de expressão relativo ao controlo de GFP (100%).

As Figuras 3a-3k descrevem dados que mostram o controlo de desenvolvimento de músculo cardíaco e esquelético pelo miR-1 e miR-133 *in vivo*.

As Figuras 3a-3h mostram dados de experiências do embrião *Xenopus*. Os embriões *Xenopus* derivados de embriões não injectados (Figuras 3a e 3b), GFP ARN controlo-injectado (Figuras 3c e 3d), miR-1-injectado (Figuras 3e e 3f), ou miR-133-injectado (Figuras 3g e 3h) manchados com anti- tropomiosina e mostrados no estágio 32 sob campo luminoso (Figuras 3a, 3c, 3e e 3g) ou fluorescência (Figuras 3b, 3d, 3f e 3h). Note-se a ausência de coloração 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 secções transversais do embrião *Xenopus*. As secções transversais dos embriões *Xenopus* correspondem à posição do coração no estágio 32 de embriões não injectados (Figura 3i), miR-1 injectados (Figura 3 j) ou miR-133 injectado (Figura 3k) corados com anti- tropomiosina para visualizar os somitos (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 registados por imunocoloração 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 locais complementares de miR-133 de SRF da UTR 3' de rato (SRF-3'-UTR), locais complementares de miR-1 de HDAC4 da UTR 3' de rato (HDAC4-3'-UTR) ou sequências antissense perfeitas de miR-133 (miR-133-luc) ou miR-1 (miR-1-luc) foram co-transfetados com os vectores de expressão de miARN indicados ou seus mutantes. A actividade de luciferase foi determinada 48 horas após a transfecção. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de pelo menos três experiências 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 durante 24 horas (GM) ou transferidas em DM durante 1 dia (DM1) ou três dias (DM3) antes da actividade da luciferase ser determinada.

As Figuras 4c-4e descrevem dados que mostram os resultados de mioblastos C2C12 em cultura com GM e foram electroporados com os dúplices de miARN de cadeia dupla indicados (ou seus mutantes) ou miR-208 e GFP como controlos. As células foram colocadas em cultura em GM durante 24 horas após a transfecção inicial: Northern blot usando anticorpos anti-SRF e anti-HDAC4 (Figura 4c), as células foram transferidas a DM durante 24 horas e RT-PCR para os genes indicados foi executado (Figura 4d); as células foram transferidas em DM durante 24 horas e Northern blot usando-se os anticorpos indicados. Os mioblastos C2C12 em cultura com GM foram electroporados com os inibidores de oligonucleótido antissense 2'-O-metil indicado.

As Figuras 4f e 4g descrevem os dados que mostram os resultados de células em cultura com GM durante 24 horas após a transfecção, então foram transferidas em DM durante 24 horas antes: RT-PCR para os genes indicados foi executado (Figura 4f), e a Northern blot usando-se os anticorpos indicados (Figura 4g).

A Figura 4h descreve dados que mostram os resultados de mioblastos C2C12 em cultura com GM e foram electroporados com os dúplices de miARN de cadeia dupla indicados e/ou plasmídeos de expressão para SRF ou HDAC4, conforme indicado. As células foram colocadas em cultura em GM durante 24 horas após a

transfecção. A Northern blot foi executada 24 horas após a transferência para DM usando-se os anticorpos indicados.

A Figura 4i descreve os dados que mostram 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.

A Figura 6 mostra os dados de análise dos dados de expressão de arranjos de miARN 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 pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. O intervalo de sinal era de -4 vezes a +4 vezes. Sombreamento claro denota alta expressão e sombreamento escuro denota baixa expressão, em relação à mediana.

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 ARN 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 miARNs maduros e seus

precursores (Pre) são indicados. tARNs foram usados como um controlo 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 controlo 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 extractos de célula usando-se os anticorpos indicados. P-tubulina serve como um controlo de carregamento.

As Figuras 8a-8f mostram dados de expressão de miR-1 e miR-133 em músculo cardíaco e esquelético em ratinho 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 ratinho adulto. A análise de Northern blot é mostrada para a expressão do miR-1 (Figura 8b) e miR-133 (Figura 8e) em tecidos de ratinho do dia 13,5 (E13,5) e 16,5 (E16,5) embriônico. A mesma quantidade de ARN total de músculo do coração e esquelético adulto foi também carregada na coloração 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 ratinho neonatal. A mesma quantidade de ARN total de músculo do coração e esquelético adulto foi também carregada na coloração para servir como uma comparação. Ambos os miARNs maduros e seus precursores (Pre) são indicados. tARNs foram usados como um controlo de carregamento.

As Figuras 9a-9e mostram dados para a 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 cromossomas de ratinho 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 cromossoma 2 (Figuras 9d e 9e) e cromossoma 18 (Figuras 9b e 9c). 20 µg do ARN total dos tecidos de ratinho 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* transgénico para sequência genómico de miR-1 e miR-133 de ratinho ligada ao dsRed que ilustra a expressão de somito (S, setas) no estágio 28.

A Figura 10b mostra *Xenopus laevis* transgénico (Tg) portando um transgene contendo miR-1 e miR-133 no estágio 46 (embrião inferior) e controlo negativo (não transgénico, Ct, embrião superior) sob campo luminoso.

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 transgénico na Figura 10b sob campo luminoso mostrando a expressão do transgene no coração (H, setas) e arcos branquiais (BA, setas).

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

A Figura 10f é uma fotomicrografia com magnificação de potência alta para um embrião transgénico de estágio 4/6 mostrando a expressão do transgene nos somitos (S, setas).

A Figura 10g mostra as sequências de ADN genómicas (SEQ ID NO: 82) de melhorador de miR-1/133 do cromossoma 2 de ratinho. Um suposto local de MEF2 e box CarG estão marcados, e as mutações introduzidas nestes locais 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 sensor de miR-133 foram transfectadas com vectores de expressão para GFP (controlo), miR-133 tipo selvagem (miR-133), miR-133 mutante (miR-133mut) em que a sequência "semente" foi mudada, ou uma combinação do vector de expressão de miR-133 e oligos antissense 2'-o-metil (miR-133 + 2'-o-metil). As células foram transfectadas em meio de diferenciação durante 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 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.

A Figura 12 mostra sequências dos locais alvo de miR-1 e miR-133 na UTR 3' de genes HDAC4 e SRF. Painel superior: sequências de UTR 3' de HDAC4 de espécie vertebrada humana conservada (SEQ ID NO: 24), chimpanzé (SEQ ID NO: 25), rato (SEQ ID NO: 26), rato (SEQ ID NO: 27), cão (SEQ ID NO: 28) e galinha (SEQ ID NO: 29), e seu alinhamento com miR-1 (SEQ ID NO: 1) e miR-206 (SEQ ID NO: 3). Painel inferior: sequências de UTR 3' de SRF de humano (SEQ ID NOS:30 e 31) e rato (SEQ ID NOS:32 e 33) e seu alinhamento com miR-133. Sequências de nucleótido conservadas estão listadas em caixa alta.

A Figura 13 descreve um modelo de biogénese de miARN. (A) pri-miARNs são transcritos no núcleo pela ARN polimerase II e (B) são processados por Drosha a pre-miARNs contendo uma haste-alça. (C) Exportina-5 reconhece a projecção 3' esquerda por Drosha e exporta os pre-miARNs para dentro do citoplasma, onde (D) Dicer cliva os pre- miARNs abaixo da haste-alça para produzir um díplice de ~22 nucleótidos. (E) Um única cadeia é incorporado no RISC, o qual (F) reconhece as sequências complementares dentro das regiões 3' não traduzidas de mARNs e regula a expressão de gene por supressão traducional ou clivagem de ARNm.

As Figuras 14a-14c descrevem o genoma de miR-208. A Figura 14a mostra que uma sequência de miR-208 precursora de rato (SEQ ID NO: 34) é dobrado usando-se mFold e com a sequência de miR-208 madura

(SEQ ID NO: 4) à direita. A Figura 14b mostra um alinhamento de sequência de sequências de miR-208 precursoras de ratinho (SEQ ID NO: 35), de rato (SEQ ID NO: 36) e de humano (SEQ ID NO: 37). A sequência de miR-208 madura é mostrada no lado superior direito da Figura 14A. Os asteriscos denotam perfeita conservação de sequência. A Figura 14c mostra que miR-208 origina-se de um intrão de alfa-MHC. O miR-208 de ratinho está localizado dentro de 29 intrão de  $\alpha$ -MHC. Similarmente, o miR-208 humano está localizado dentro de 28 intrão de  $\alpha$ -MHC.

As Figuras 15a-15c mostram os dados que demonstram que miR-208 é regulado de maneira desenvolvida. ARN total de diferentes tecidos de ratinho foi corado e marcado com um oligodeoxinucleótido radiomarcado na posição 5' complementar a miR-208. Carregamento igual do ARN 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 cadiaco-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 ratinho 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 ratinho E13.5 e E16.5 em relação ao músculo do coração e esquelético adulto.

As Figuras 16a e 16b mostram dados da expressão de miR-208 ectópica em cardiomiócitos. A Figura 16a

mostra uma Northern blot preparada a partir de cardiomiócitos infectados com Ad-GFP ou Ad-208 marcado usando-se oligonucleótilo antissense de miR-208 radiomarcado. A Figura 16b mostra micrografias epifluorescentes de cardiomiócitos infectados em MOIs 1 e 10.

A Figura 17 mostra um diagrama de um sistema transgénico condicional divulgado no presente documento. Duas linhas independentes de linhas transgénicas de ratinhos são utilizadas: uma expressando a produto de fusão tTA-VP16 sob o controlo, o promotor  $\alpha$ -MHC e uma segunda linha abrigando o transgene miR-208 sob o controlo de um promotor mínimo do CMV. O promotor mínimo do CMV possui várias repetições do operão da tetraciclina (teto) localizado directamente a montante. As duas linhas são geradas juntas e produzidas, assumindo um padrão de herança Mendeliana, 1 em 4 ratinhos são duplo transgénicos. Se a doxiciclina (DOX) for administrada a um ratinho duplo transgénico, a proteína tTA-VP16 é ligada por DOX e a transcrição do miR-208 é inibida. Se a DOX estiver ausente, a proteína tTA liga-se ao concatámero 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. Adaptado de James *et al*, Am J Physiol 273: H2105-H2118, incorporado no presente documento por referência).

As Figuras 18A-18C são gráficos e um alinhamento de sequência que mostra os dados que demonstram que os miR-208 se direcccionam ao Thrap1. Os repórteres de luciferase com uma sequência de miR-208 antissense

(sensor de miR-208) ou UTRs 3' de Hemoglobina- $\beta$  (Hbb) e hormona da tireóide associada à proteína 1 (Thrap1) (Figura 18A) ou quatro cópias de locais de ligação de miR-208 suposto de Thrap 1 da UTR 3' (Figura 18B) foram fixados directamente a jusante do gene luciferase e foram co-transfetados com quantidades crescentes de miR208 pCDNA3.1 em células 293T. O sensor de miR208, os repórteres de Thrap1 e 4x Thrap1 eram ambos reprimidos de uma maneira dependente da dose, enquanto o CSNK de controlo negativo não foi mudado de forma significativa. A Figura 18C mostra a sequência de miR-208 madura (SEQ ID NO: 4) ligado ao local alvo de miR-208 previsto dentro da UTR 3' do gene Thrap1 de humano (SEQ ID NO: 38) e rato (SEQ ID NO: 39). Note-se a região de semente alvo perfeitamente conservada dentro de ambos os alvos previstos (o 2º e 8º nucleótidos 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 hormona da tireóide (TR) ligam-se às sequências dos Elementos Receptores da Tireóide (TREs) dentro dos promotores dos genes  $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC. O promotor de  $\alpha$ -MHC contém uma ligação de TRE-completa por dois TRs, enquanto que o  $\beta$ -MHC possui sua ligação por um único TR numa metade de TRE. Os monómeros de TR e dímeros podem ambos heterodimerizar com o complexo de TRAP, um cofator de TR. A hormona da tireóide ( $T_3$ ) liga-se a TRs e inibe a transcrição de  $\beta$ -MHC enquanto induz a expressão de  $\alpha$ -MHC. MiR-208 é conactualmente expresso com uma proteína  $\alpha$ -MHC e é previsto para regular a tradução de Thrap1, a maior subunidade do complexo de TRAP. Acredita-se que o miR-208 é um componente de um ciclo

de reacção negativa que regula a expressão da isoforma de cadeia pesada de miosina cardíaca através da inibição da sinalização do  $T_3$ .

As Figuras 20A e 20B mostram dados da análise de arranjo de miARN de músculo esquelético danificado/regenerado. A Figura 20A mostra dos dados de miARNs que são regulados negativamente em músculo danificado. A Figura 20B mostra dos dados de miARNs que são regulados positivamente em músculo danificado.

A Figura 21 lista as sequências exemplares para SEQ ID NOS: 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 miARN. As células satélites expressando estavelmente o sensor de miARN (dsRed::miR-1) 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 miosina do gene marcador de diferenciação do músculo (MF20). Baixa expressão de dsRed nas células de diferenciação expressa do sensor indica a expressão de miR-1 naquelas células. DAPI coloração o núcleo celular.

As Figuras 23A e 23B mostram dados que demonstram o estabelecimento do sistema de expressão de miR-1/206 (Figura 23a) 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 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 vector de expressão para miR-1/206 (SDSA::miR-1) e as imagens foram obtidas usando-se contraste de fase (2 93 células) ou fluorescência para mostrar a expressão no gene repórter dsRed (dsRed::miR-1) ou miARN::GFP (SDSA::miR-1) ou sobreposição de ambos (sobreposição). Note-se que a expressão do sensor de dsRed e miR-1 é exclusiva, indicando que miR-1 reprime especificamente a expressão do repórter do sensor.

As Figuras 24A e 24B descrevem os dados que mostram a repressão de UTRs 3' de Pax7 e BDNF por miR-1/206. A Figura 24 A é um alinhamento de sequência de UTR de Pax7 de rato (SEQ ID NO: 40-41) com miR-1 (SEQ ID NO: 1) e miR-206 (SEQ ID NO: 3). A Figura 24B divulga gráficos que mostra que os repórteres de luciferase contendo ou UTR 3' de Pax7 de rato (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 os vectores de expressão de miARN indicados. A actividade de luciferase foi determinada 48 horas após a transfeção. Os dados representam o desvio padrão ± médio de pelo menos três experiências independentes em duplicata. Note-se que miR-1/206 reprime fortemente a expressão de repórteres de UTR 3' de Pax7 e BDNF.

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 mARNs 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 sobre-expressas 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 miARN::GFP (painéis SDSA::miR-1/206) ou sobreposição (painéis sobrepostos) em células satélites de músculo esquelético. Note-se 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 miARN::GFP (painéis SDSA::miR-1/206) ou sobreposição (painéis sobrepostos) em células satélites de músculo esquelético. Note-se 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 miARN::GFP (painel de SDSA::miR-1+206). Menos células positivas para BrdU foram observadas em células satélites sobre-expressas de miR-1/206. A Figura 27B é um gráfico que mostra os resultados de experiências onde as células manchadas positivas para BrdU foram contadas em controlo e células satélites sobre-expressas 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 mostram os resultados de experiências onde as células satélites sobre-expressam de forma estável ou miR-1/206

(SDSA-miR-1+206) ou GFP (controlo), então são transferidas ao meio de diferenciação, onde bFGF foi removido, durante 24 horas (Figura 28A) ou 48 horas (Figura 28B) antes da imunocoloração para cadeia pesada de miosina (MyHC). Note-se a coloração de MyHC melhorada em células sobre-expressas de miR-1/206. DAPI marca o núcleo celular.

A Figura 29 é um gráfico que mostra os resultados de experiências onde a sobre-expressão de miR-1/206 melhora a cinética de diferenciação de célula satélite. As células satélites ou sobre-expressam miR-1/206 (■) ou GFP (controlo, ♦) 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) 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 regulação da proliferação e diferenciação de célula satélite de músculo esquelético.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS QUADROS

O Quadro 1 é uma lista de abreviações de nucleótido de uma letra usada no presente documento.

O Quadro 2 mostra o efeito na proliferação e diferenciação miogénica por miR-1 e miR-133. Os mioblastos C2C12 em cultura em meio de crescimento (GM) foram electroporados com dúplices de miARN de cadeia dupla ou oligos antissense de 2'-o-metil para miR-1, miR-133 ou GFP como um controlo negativo. 36 horas mais tarde, GM foi substituído com meio de diferenciação (DM) durante 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 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.

O Quadro 3 lista os nomes e sequências dos oligonucleótidos divulgados no presente documento.

#### BREVE DESCRIÇÃO DA LISTA DE SEQUÊNCIAS

A Lista de Sequências divulga, entre outras coisas, as sequências de vários miARNs, especificamente miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 e miR-145 (SEQ ID NOS: 1-11, respectivamente) assim como as sequências de polinucleótido adicionais aqui divulgadas. Em alguns casos as sequências de ARN são apresentadas na forma de ADN (isto é, com timidina presente em vez de uracilo), entende-se que estas sequências se pretendem também corresponder às transcrições de ARN destas sequências de ADN (isto é, com cada T substituído por um U).

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

Está divulgada no presente documento a determinação que miARNs particulares podem modular a expressão de genes específicos em miócitos que afectam a diferenciação e/ou proliferação dos miócitos. Esta descoberta possui aplicações terapêuticas, conforme divulgado no presente documento, incluindo o tratamento de lesão muscular possuindo uma ampla variedade de causas, tais como, por exemplo, traumatismo muscular mecânico, doenças

degenerativas musculares e ataques cardíacos. A aplicação das descobertas divulgadas no presente documento também inclui modular a expressão de um ou mais genes específicos em miócitos utilizando miARNs possuindo especificidade para os genes, e em seguida, modular a funcionalidade dos miócitos, tal como, por exemplo, diferenciação e/ou proliferação dos miócitos. Os miARNs cobertos pelo assunto presentemente divulgado incluem miARN-1 e miARN-133. O miARN-1 (miR-1) e miARN-133 (miR-133), que estão agrupados no mesmo loci cromossómico, 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 embriões *Xenopus in vivo*. miR-1 promove a miogénesis 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 factor de resposta do soro (SRF). Os resultados revelam, pela primeira vez, que dois miARNs maduros, derivados do mesmo policistrão de miARN e transcritos juntos podem executar funções biológicas distintas. A presente divulgação fornece desta forma mecanismos moleculares em que os miARNs participam em circuitos transcripcionais que controlam a expressão do gene do músculo e o desenvolvimento embrionico.

A expressão de Thrap1 é provavelmente regulada por miR-208, que não está compreendido dentro das presentes reivindicações. A UTR 3' de Thrap1 contém dois locais de ligação de miR-208 previstos (Figura 18). Os dois alvos estão localizados -80 pb a jusante do codão de parada de Thrap1 e estão separados entre si por apenas ~50 pb. Ambos os alvos são perfeitamente 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 hormona da tireóide) que é ubiquitariamente expresso. TRAP é um complexo de proteína de multisubunidade que é um coactivador 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 hormona.

### I. Considerações Gerais

Descobriu-se que primeiro miARN descrito, o gene lin-4, que controla o tempo de desenvolvimento da larva *C. elegans*, produz de forma inesperada um ARN não codificante longo de 21 nucleótidos que suprime a expressão da proteína lin-14 sem afectar de forma visível os níveis de ARNm lin-14. Descobriu-se que este pequeno ARN tem como alvo locais complementares na região não traduzida 3' (UTR 3') de lin-14<sup>49,50</sup>. Embora este fenómeno tenha sido inicialmente tratado como uma singularidade genética e efectivamente ignorada, é agora calculado que existem centenas de pequenos ARNs, agora chamados de miARNs, similares a lin-4 nos genomas de espécies divergentes e regulam a tradução de mARNs complementares. Embora relatos recentes sugiram funções para alguns miARNs nos processos biológicos notavelmente diversos, a maioria permanece amplamente não caracterizada.

#### I.A. Biogénese & Mecanismo de miARN

Um modelo geral para a biogénese de miARN é descrito na Figura 13. miARNs maduros são ~22 nucleótidos (nt) de comprimento que foram processados a partir de transcrições mais longas<sup>51,52</sup>. miARNs primários (pri-miARNs) podem ser transcritos por ARN Pol II como unidades transcricionais

independentes ou podem originar-se de intrônes unidos de genes hospedeiros<sup>53</sup>. A via de processamento de miARN pode começar com a clivagem nuclear de pri-miARN por endonuclease ARNse III Drosha, que produz um miARN-precursor intermediário longo de ~70 nt (pre-miARN) que possui uma estrutura de haste-alça<sup>54</sup>. A exportina-5 reconhece o corte escalonado deixado pela clivagem de Drosha e exporta o pre-miARN ao citoplasma de uma maneira dependente de Ran-GTP<sup>54-60</sup>. Uma vez no citoplasma, ambas as cadeias do pre-miARN podem ser clivados por Dicer, uma outra enzima ARNse II, aproximadamente duas voltas helicoidais distante da base da haste-alça<sup>61-63</sup>. O díplice de ARN de ~22 mer resultante é liberado por Dicer e um braço de haste único pode ser incorporado no RISC (complexo de silenciamento induzido por ARN). RISC é um complexo de ribonucleoproteína que contém elementos da família da proteína Argonauta e factores acessórios, junto com um miARN e ARNm alvo. As estabilidades térmicas relativas do díplice de braço de haste são pensadas para determinar que a cadeia torna-se incorporada em RISC: a cadeia que entra no RISC é frequentemente aquela que a extremidade 5' é menos estável<sup>64,65</sup>. A inibição da tradução é mediada pela complementaridade de miARN à(s) sequência(s) alvo dentro da UTR 3' do ARNm alvo por um mecanismo ainda desconhecido<sup>66,67</sup>. Geralmente, a complementaridade imperfeita resulta na supressão da tradução enquanto a complementaridade perfeita ou quase perfeita resulta na clivagem de mRNA<sup>68</sup>. Muitos aspectos da biogénese de miARN, trânsito, montagem de RISC e o mecanismo de função do RISC esperam esclarecimento, entretanto estudos funcionais de miARNs específicos e análises genética e bioquímica dos componentes da via de miARN mostraram que os miARNs são importantes em diversos processos biológicos.

#### I.B. miARNs em Desenvolvimento

O desenvolvimento de um organismo multicelular requer controlo espacial e temporal das vias genéticas. miARNs são propostos para controlar ou ajustar aquelas vias genéticas do complexo por regulação pós-transcricional de genes alvo. Um método para determinar a necessidade de miARNs no desenvolvimento animal tem sido criar mutações em Dicer, uma enzima a montante requerida para o processamento de miARNs para a sua forma activa matura. Acredita-se que os vertebrados tenham apenas uma única cópia de Dicer, que é provavelmente exigida para processar completamente todos os miARNs de vertebrado<sup>62, 63, 69</sup>. Em ratinhos, a ablação da função Dicer resultou em letalidade próxima ao dia embrionico (E) 7.5<sup>69</sup>. O ratinho Dicer null 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 ratinho<sup>70</sup>. O bloqueio de forma completa da formação de miARN em peixe zebra tornando-se os mutantes de Dicer maternal-zigótico revelou que a perda de miARNs não afecta a formação do eixo ou a padronização de muitos tipos de célula nos embriões. Entretanto, a morfogénese durante a gastrulação, formação de cérebro, somitogénesis e desenvolvimento do coração todos provaram ser anormais e resultou em letalidade. Colectivamente, a análise genética da função de Dicer sugere que os miARNs maduros são necessários para o desenvolvimento adequado. Estudos que removem todas as funções de miARN são informativos, entretanto eles são também ferramentas pouco precisas e não permitem compreender as funções precisas de miARNs específicos.

#### I.C. Funções Biológicas de miARNs Específicos

Há uma quantidade crescente de evidências que sugerem que os miARNs participam em diversos processos biológicos. Em células das ilhotas pancreáticas, a sobre-expressão de miR-375 suprimiu a secreção da insulina induzida por glicose, embora a inibição de miR-375 endógeno tenha melhorado a secreção de insulina<sup>72</sup>. Uma estratégia semelhante de sobre-expressão e inibição identificaram uma função para o miR- 143 na diferenciação de adipócitos através da regulação da expressão da proteína ERK5<sup>73</sup>. Num outro exemplo, um gene de miARN policistrônico que codifica 5 miARNs foi associado à tumorigénese<sup>74</sup>. Outras funções para os miARNs foram propostas em hematopoiiese<sup>75</sup>, diferenciação neuronal<sup>76,77</sup> e regulação da expressão do gene Hox<sup>78,79</sup>.

Há agora mais de 300 miARNs humanos conhecidos, entretanto apenas se sabe a função biológica de um número reduzido de miARNs. Estudos de miARNs específicos são necessários para a compreensão da prevalência e importância da regulação mediada por miARN no desenvolvimento e patologia. O assunto presentemente divulgado fornece para um primeiro momento uma função para miARNs na regulação da diferenciação e proliferação muscular.

#### I.D. miARNs no Desenvolvimento do Coração

A cardiógenese requer o controlo preciso de programas genéticos diferentes, assim é intrigante especular que os miARNs cardíacos-enriquecidos expressos de maneira diferencial podem ajudar a regular aquelas vias complexas. Tais padrões de expressão tecido-específico são divulgados aqui pelo assunto presentemente divulgado para vários miARNs. miR-1 e miR-133 são expressos 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 miARNs músculo-específico não eram claras.

#### I.E. Identificação do miARN alvo

A identificação dos miARNs alvos específicos facilita a compreensão de sua função precisa nas vias reguladoras.

A maior parte dos miARNs animais são imperfeitamente complementares ao seu local alvo, que dificulta a utilização de pesquisas de homologia simples para identificar os locais alvos do miARN animal. Para superar este obstáculo, vários métodos computacionais foram desenvolvidos os quais incorporam a conservação da sequência e as características de miARN alvo conhecidos como critérios para predizer novos alvos de miARN animal<sup>80-85</sup>. Por exemplo, alguns algoritmos levam em conta que a maioria dos miARNs exibiu alta complementaridade entre o segundo e o oitavo nucleótido dentro de locais 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 miARN pode compensar a fraca ligação da extremidade 5'. Estes algoritmos também classificam prognósticos pela conservação da sequência 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 locais alvo de miARN de mamífero. As previsões produzidas para qualquer miARN 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 relevante.

### I.F. Importância

Há actualmente várias áreas activas na pesquisa de miARN que procuram compreender os mecanismos moleculares precisos por trás da repressão direccional a miARN, para desenvolver melhores ferramentas para analisar a expressão de miARN e identificação de locais alvo, e para determinar as funções biologicamente relevantes para miARNS específicos dentro de vias reguladoras.

O desenvolvimento do coração e a patologia estão intimamente ligados à regulação das complexas vias genéticas, e muito esforço tem sido feito na tentativa de compreender estas vias. Muitos estudos têm focado na função dos factores de transcrição e sequências melhoradoras regulatórias exigidas para a transcrição do gene cardíaco. Foi provado que a regulação da expressão do gene cardíaco é bastante complexa, com genes cardíacos individuais sendo controlados por múltiplos melhoradores independentes que direccional padrões de expressão muito restritos no coração. Potencialmente, os miARNS 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 e de pesquisa para das descobertas. Também, as descobertas relacionadas ao controlo de miARN da diferenciação e proliferação do músculo aqui divulgadas servem como um modelo para compreensão da função dos miARNS em outras vias também.

### II. Definições

Por conveniência, certos termos utilizados na especificação, exemplos e reivindicações em anexo estão

aqui colhidos. Embora se acredite que os seguintes termos sejam bem compreendidos por qualquer perito na especialidade, 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 perito na especialidade à qual o assunto presentemente divulgado pertence. Embora quaisquer métodos, dispositivos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou teste do assunto presentemente divulgado, os métodos, dispositivos e materiais representativos são agora descritos.

Seguindo a convenção de longa data da lei de patentes, 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 referir a um ou a mais de um (isto é, a pelo menos um) do objecto gramatical do artigo. Por meio de exemplo, "um elemento" refere-se a um elemento ou a mais de um elemento.

Conforme usado no presente documento, o termo "aproximadamente", quando se referindo a um valor ou a uma quantidade de massa, peso, tempo, volume, concentração ou percentagem pretende abranger variações em algumas formas de realização  $\pm 20\%$  ou  $\pm 10\%$ , em algumas formas de realização  $\pm 5\%$ , em algumas formas de realização  $\pm 1\%$ , em algumas formas de realização  $\pm 0,5\%$ , e em algumas formas de realização  $\pm 0,1\%$  da quantidade especificada, como tal as variações são apropriadas para praticar o assunto presentemente divulgado. A menos que de outra forma indicado, todos os números que expressam quantidades de

ingredientes, condições de reacção e assim por diante, usados na especificação e reivindicações são para serem compreendidos como sendo modificados em todos os exemplos pelo termo "aproximadamente". Consequentemente, 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 objectivadas para serem obtidas pelo assunto presentemente divulgado.

Conforme usado no presente documento, os termos "aminoácido" e "resíduo de aminoácido" são usados de forma intercambiável e referem-se a qualquer um dos vinte aminoácidos que ocorrem naturalmente, assim como análogos, derivados e congêneros dos mesmos; os análogos de aminoácido possuindo cadeias laterais variadas; e todos os estereoisómeros de qualquer um dos precedentes. Assim, o termo "aminoácido" é alvo para abranger todas as moléculas, se naturais ou sintéticas, que incluem tanto uma funcionalidade de aminoácido quanto uma funcionalidade de ácido e são capazes de ser incluídas num polímero de aminoácidos que ocorrem naturalmente.

Um aminoácido pode ser formado sob digestão química (hidrólise) de um polipéptido nas suas ligações de péptido. Os resíduos de aminoácido descritos no presente documento estão, em algumas formas de realização, na forma isomérica "L". Entretanto, resíduos na forma isomérica "D" podem ser substituídos por qualquer resíduo de aminoácido na forma L (L-aminoácido), contanto que a propriedade funcional desejada seja mantida pelo polipéptido. NH<sub>2</sub> refere-se a um grupo amino livre presente na terminação amino de um polipéptido. COOH refere-se a um grupo carboxi livre presente na terminação carboxi de um polipéptido. De acordo com a nomenclatura de polipéptido padrão, as abreviações

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

Nota-se que todas as sequências de resíduo de aminoácido aqui representadas pelas fórmulas possuem uma orientação da esquerda para direita na direcção 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 sequência de resíduo de aminoácido indica uma ligação de péptido a uma sequência adicional de um ou mais resíduos de aminoácido ou uma ligação covalente a um grupo terminal amino tal como NH<sub>2</sub> ou acetil ou a um grupo terminal carboxi tal como COOH.

Conforme usado no presente documento, o termo "célula" é usado em seu sentido biológico usual. Em algumas formas de realização, a célula está presente num 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 gâmeto ou embrião, uma célula estaminal, ou uma célula completamente diferenciada.

Conforme usado no presente documento, 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 vector de expressão que codifica um miARN) podem ser introduzidas. Além disso, os termos referem-se não apenas à célula particular dentro das quais uma construção de expressão é inicialmente introduzida, mas também a geração ou geração potencial de tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações subsequentes devido à mutação ou influências ambientais, tal geração não pode, de fato, ser idêntica à célula mãe mas ainda está incluída no âmbito do termo conforme usado no presente documento.

Conforme usado no presente documento, o termo "gene" refere-se a um ácido nucleico que codifica um ARN, por exemplo, sequências de ácido nucleico incluindo, mas não limitadas, aos genes estruturais que codifica um polipeptídeo. O termo "gene" também se refere a qualquer segmento de ADN associado com uma função biológica. Como tal, o termo "gene" abrange sequências incluindo mas não limitadas a: uma sequência codificadora; uma região promotora; uma sequência reguladora transcricional; um segmento de ADN não expresso que é uma sequência de reconhecimento específica para as proteínas reguladoras; um segmento de ADN não expresso que contribui para a expressão do gene, tal como, por exemplo, um segmento de ADN que pode ser transcrito numa região não traduzida 3' de um ARNm, que é em seguida tido como alvo e ligado por miARNs do assunto presentemente divulgado; um segmento de ADN 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 informação de sequência conhecida ou prevista, e derivação recombinante a partir de uma ou mais sequências existentes.

Como se entende na técnica, um gene compreende

tipicamente uma cadeia codificante e uma cadeia não codificante. Conforme usado no presente documento, os termos "cadeia codificante" e "cadeia sense" são usados de forma intercambiável, e referem-se a uma sequência de ácido nucleico que possui a mesma sequência de nucleótidos de um ARNm do qual o produto do gene é traduzido. Como se entende também na técnica, quando a cadeia codificante e/ou a cadeia senso é usada para se referir a uma molécula de ADN, a cadeia codificante/sentido inclui resíduos de timidina em vez dos resíduos de uridina encontrados no ARNm correspondente. Adicionalmente, quando usado para se referir a uma molécula de ADN, a cadeia codificante/sentido pode também incluir elementos adicionais não encontrados no ARNm incluindo, mas não limitados a promotores, melhoradores e intrôns. Similarmente, os termos "cadeia modelo" e "cadeia antissense" são usados de forma intercambiável e referem-se a uma sequência de ácido nucleico que é complementar à cadeia codificante/sense. Deve-se notar, entretanto, que para aqueles genes que não codificam produtos de polipeptído, por exemplo, um gene de miARN, o termo "cadeia codificante" é usado para se referir à cadeia que compreende o miARN. Nesta utilização, a cadeia que compreende o miARN é uma cadeia sense com relação ao precursor de miARN, mas será antissense com relação ao seu ARN alvo (isto é, o miARN hibrida com o ARN alvo porque ele compreende uma sequência que é antissense ao ARN alvo).

Conforme usado no presente documento, os termos "complementaridade" e "complementar" referem-se a um ácido nucleico que pode formar uma ou mais ligações de hidrogénio com uma outra sequência de ácido nucleico por Watson-Crick tradicional ou outros tipos de interacções não tradicionais. Com referência às moléculas nucleicas do assunto presentemente divulgado, a energia livre de ligação para uma molécula de ácido nucleico com sua sequência

complementar é suficiente para permitir que a função relevante do ácido nucleico proceda, em algumas formas de realização, a actividade da ribonuclease. Por exemplo, o grau de complementaridade entre os filamentos sentido e antissense de um precursor de miARN pode ser o mesmo ou diferente do grau de complementaridade entre a cadeia contendo miARN de um precursor de miARN e a sequência 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 *et al*, 1986<sup>31</sup>; Turner *et al*, 1987<sup>32</sup>.

Conforme usado no presente documento, a expressão "complementaridade percentual", "identidade percentual" e "idêntico percentual" são usados de forma intercambiável no presente documento, referem-se ao percentual de resíduos contíguos numa molécula de ácido nucleico que podem formar ligações de hidrogénio (por exemplo, pares de base de Watson-Crick) com uma segunda sequência 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 sequência de ácido nucleico podem fazer ligação de hidrogénio com o mesmo número de resíduos contíguos numa segunda sequência de ácido nucleico. Como miARNs 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 miARN da expressão do gene, uma complementaridade percentual de pelo menos cerca de 70% entre um miARN e o ARN ao qual ele é dirigido deve ser suficiente para o miARN modular a expressão do gene a partir do qual o ARN alvo foi derivado.

O termo "expressão do gene" geralmente refere-se aos

processos celulares pelos quais um polipéptido biologicamente activo é produzido a partir de uma sequência de ADN e exibe uma actividade biológica numa 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 actividade biológica de um gene ou produto de gene. Estes processos incluem, mas não estão limitados à síntese de ARN, processamento e transporte, assim como à síntese de polipéptido, transporte e modificação pós-traducional de polipéptidos. Adicionalmente, os processos que afectam as interacções proteína-proteína dentro da célula podem também afectar a expressão do gene como definido no presente documento.

Entretanto, no caso de genes que não codificam produtos de proteína, por exemplo, os genes de miARN, o termo "expressão de gene" refere-se aos processos pelos quais um precursor de miARN é produzido a partir do gene. Tipicamente, este processo é referido como transcrição, embora diferente da transcrição dirigida pela ARN polimerase II para os genes que codifica proteína, os produtos da transcrição de um gene de miARN não são traduzidos para produzir uma proteína. Apesar de tudo, a produção de miARN maduro a partir de um gene de miARN é abrangida pelo termo "expressão do gene" como aquele termo é usado no presente documento.

Conforme usado no presente documento, o termo "isolado" refere-se a uma molécula substancialmente livre de outros ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono e/ou outros materiais com os quais ela está normalmente associada, tal associação sendo ou no material celular ou num meio de síntese. Assim, o termo "ácido nucleico isolado" refere-se a uma molécula de ácido

ribonucleico ou uma molécula de ácido desoxirribonucleico (por exemplo, um ADN genómico, ADNc, ARNm, miARN, etc.) de origem natural ou sintética ou alguma combinação dos mesmos, que (1) não está associada à célula na qual o "ácido nucleico isolado" é encontrado na natureza, ou (2) está operativamente ligada a um polinucleótido ao qual ela não está ligada na natureza. Similarmente, o termo "polipéptido isolado" refere-se a um polipéptido, em algumas formas de realização preparados a partir de ADN ou ARN recombinante, ou de origem sintética, ou alguma combinação dos mesmos, 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 outras proteínas da mesma fonte celular, (4) é expresso 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 de seu ambiente natural, por exemplo, como uma parte de um órgão, tecido ou organismo.

Conforme usado no presente documento, os termos "marcador" e "marcado" refere-se à fixação de uma metade, capaz de detecção por métodos espectroscópicos, radiológicos ou outros métodos, a 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 numa molécula, tal como um polipéptido. Vários métodos de marcação de polipéptido são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcadores para polipéptidos incluem, mas não estão limitados aos seguintes: radioisótopos, marcadores fluorescentes, átomos pesados, marcadores enzimáticos ou genes repórteres, grupos quimiluminescentes, grupos

biotinil, epítopos de polipéptido pré-determinados reconhecido por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zíperes de leucina, locais de ligação para anticorpos, domínios de ligação metálica, tags de epítopo). Em algumas formas de realização, os marcadores são fixados por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial.

Conforme usado no presente documento, o termo "modular" refere-se a um aumento, diminuição, ou outra alteração de qualquer, ou todas, as actividades ou propriedades químicas e biológicas 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 ARN ou moléculas de ARN equivalentes que codifica uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína; ou a uma actividade de uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína que é regulada de regulação positiva ou de regulação negativa, tal que a expressão, nível ou actividade seja maior que ou menor que aqueles observados na ausência do modulador. Por exemplo, o termo "modular" pode significar "inibir" ou "suprimir", mas a utilização da palavra "modular" não está limitado a esta definição.

O termo "modulação" conforme usado no presente documento refere-se tanto à regulação positiva (isto é, activação ou estimulação) e regulação negativa (isto é, inibição ou supressão) de uma resposta. Assim, o termo "modulação", quando usado com referência a uma propriedade funcional ou actividade biológica ou processo (por exemplo, actividade de enzima ou ligação de receptor), refere-se à capacidade de regular de regulação positiva (por exemplo, activar ou estimular), regular de regulação negativa (por exemplo, inibir ou suprimir), ou de outra forma mudar uma qualidade de tal propriedade, actividade ou processo. Em

certos exemplos, tal regulação pode ser dependente da ocorrência de um evento específico, tal como a activação de uma via de transdução de sinal, e/ou pode ser manifestada apenas em tipos de célula particulares.

O termo "modulador" refere-se a um polipéptido, ácido nucleico, macromolécula, complexo, molécula, molécula pequena, composto, espécies ou semelhantes (de ocorrência natural ou não naturalmente), ou um extracto feito de 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 actividade potencial como inibidores ou activadores (directamente ou indirectamente) de uma propriedade funcional, actividade ou processos biológicos, ou uma combinação dos mesmos (por exemplo, agonista, antagonista parcial, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, agentes antimicrobianos, inibidores de infecção ou proliferação microbiana, e etc.) pela inclusão em ensaios. Em tais ensaios, muitos moduladores podem ser seleccionados de uma vez. A actividade de um modulador pode ser conhecida, desconhecida ou parcialmente conhecida.

Os moduladores podem ser selectivos ou não selectivos. Conforme usado no presente documento, o termo "selectivo" quando usado no 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 ARN alvo de interesse) contra uma outra molécula similar mas não idêntica (por exemplo, um ARN derivado de um elemento da mesma família do gene como o ARN alvo de interesse).

Deve ser compreendido que para um modulador ser considerado um modulador selectivo, a natureza de sua

interacção com um alvo não necessita inteiramente excluir sua interacção 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 selectivo não é alvo para ser limitado àquelas moléculas que apenas se ligam às transcrições de ARNm de um gene de interesse e não para àquelas dos membros da família relacionada. O termo é também alvo para incluir moduladores que podem interagir com transcrições de genes de interesse e de membros da família relacionada, mas para a qual é possível projectar condições sob as quais as interacções diferenciais com os alvos contra os membros da família possuem um efeito biologicamente relevante. Tais condições podem incluir, mas não estão limitadas às diferenças no grau de identidade de sequência entre o modulador e os membros da família, e a utilização do modulador num 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 selectivo para um dado alvo num dado tecido se ele interage com o alvo para causar um efeito biologicamente relevante apesar do fato de que num outro tecido que 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.

Quando um modulador selectivo é identificado, o modulador liga-se a uma molécula (por exemplo, uma transcrição de ARNm 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 transcrição de ARNm de um gene relacionado ao gene de interesse). Conforme usado no presente documento, diz-se que modulador apresenta uma "ligação selectiva" ou "ligação

"preferencial" à molécula a qual ele se liga mais fortemente quando comparado a alguma outra molécula possível à qual o modulador pode se ligar.

Conforme usado no presente documento, os termos "inibir", "suprimir", "regular de regulação negativa" e variantes gramaticais destes são usados de forma intercambiável e referem-se a uma actividade pela qual o produto do gene (por exemplo, um polipéptido), expressão de um gene, actividade de um polinucleótido, tal como por exemplo um miARN, ou um nível de um ARN que codifica um ou mais produtos do gene são reduzidos abaixo daqueles observados na ausência de uma implementação de uma abordagem do assunto presentemente divulgado.

Em algumas formas de realização, a inibição com uma molécula de miARN resulta numa diminuição no nível de expressão do estado estável de um ARN alvo. Em algumas formas de realização, a inibição com uma molécula de miARN resulta num nível de expressão de um gene alvo que está abaixo daquele nível observado na presença de uma molécula inactiva ou atenuada que é incapaz de regular de regulação negativa o nível de expressão do alvo. Em algumas formas de realização, a inibição da expressão do gene com uma molécula de miARN do assunto presentemente divulgado é maior na presença da molécula de miARN que em sua ausência. Em algumas formas de realização, a inibição da expressão do gene está associada com uma taxa melhorada de degradação do ARNm codificado pelo gene (por exemplo, pela inibição mediada por miARN da expressão do gene). Em algumas formas de realização, a inibição com uma molécula de miARN do assunto presentemente divulgado resulta num nível de expressão de um produto de gene a partir de um gene alvo que está abaixo daquele nível observado na ausência do miARN.

Em algumas formas de realização, um miARN, tal como, por exemplo, um miARN endógeno, pode ser inibido por um inibidor de miARN, resultando num aumento na expressão de um gene tido como alvo para o miARN, comparado ao nível de expressão do gene (por exemplo, a produção de um produto de gene) quando o miARN não é inibido. Conforme usado no presente documento, os termos "inibidor de miARN" refere-se a uma molécula que inibe a actividade de um miARN.

Em algumas formas de realização, um inibidor de miARN é um polinucleótido que hibrida a um miARN alvo particular sob condições específicas, inibindo assim a actividade do miARN alvo. As condições sob as quais o inibidor de miARN pode hibridar ao miARN alvo incluem, por exemplo, condições fisiológicas. O inibidor de miARN pode se hibridar ao miARN alvo a um grau maior ou menor com base na complementaridade da sequência de polinucleótido do inibidor de miARN ao polinucleótido do miARN alvo. Em algumas formas de realização, o miARN pode ser totalmente complementar a todos ou a uma porção do miARN alvo, ou menos de totalmente complementar, incluindo por exemplo, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 80% ou 70% complementar ao miARN alvo, dependendo da aplicação particular e da necessidade por especificidade, como será geralmente compreendido por qualquer perito na especialidade. O inibidor de miARN necessita apenas compartilhar a complementaridade com o miARN alvo uma vez que é necessário inibir uma quantidade desejada da actividade do miARN alvo sob um conjunto particular de condições. Exemplos de inibidores de miARN úteis com o assunto presentemente divulgado incluem, mas não estão limitados a, polinucleótidos modificados tal como 2'-o-metil polinucleótidos. Exemplos representativos não limitativos são expostos nos quadros 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 actividade de miR-1, miR-133 ou miR-208, respectivamente.

Conforme usado no presente documento, o termo "mutação" carrega sua conotação tradicional e refere-se a uma mudança, herdada, de ocorrência natural ou introduzida, num ácido nucleico ou sequência de polipéptido, e é usado em seu sentido como geralmente conhecido dos peritos na especialidade.

Conforme usado no presente documento, 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 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 músculo liso (por exemplo, células do músculo intestinal) e células do músculo cardíaco. Também, "miócito" conforme usado no presente documento não é específico à espécie.

O termo "de ocorrência natural", como aplicado a um objecto, refere-se ao fato de que um objecto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipéptido ou polinucleótido que está presente num organismo (incluindo bactérias) que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório está a ocorrer naturalmente. Deve-se compreender, entretanto, que qualquer manipulação pela mão do homem pode tornar um objecto "de ocorrência natural", um objecto "isolado" conforme aquele termo é usado no presente documento.

Conforme usado no presente documento, os termos "ácido nucleico", "polinucleótido" e "molécula de ácido nucleico" referem-se a qualquer um entre ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos gerados pela reacção em cadeia da polimerase (PCR) e fragmentos gerados por qualquer um entre ligação, cisão, acção de endonuclease e acção de exonuclease. Ácidos nucleicos podem compreender monómeros que são nucleótidos de ocorrência natural (tal como desoxirribonucleótidos e ribonucleótidos), ou análogos de nucleótidos de ocorrência natural (por exemplo, formas  $\alpha$ -enantioméricas de nucleótidos de ocorrência natural), ou uma combinação de ambos. Os nucleótidos 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 halogéneos, grupos alquilo, 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 electronicamente, tal como aza-açúcares e análogos de açúcar carboxílico. Exemplos de modificações numa metade da base incluem purinas e pirimidinas alquiladas, purinas ou pirimidinas aciladas ou outros substitutos heterocíclicos bem conhecidos. Monómeros de ácido nucleico podem ser ligados por ligações de fosfodiéster ou análogos de tais ligações. Análogos de ligações de fosfodiéster incluem fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato, e etc. O termo "ácido nucleico" também inclui os chamados "ácidos péptido nucleico", que compreendem bases de ácido nucleico que ocorrem naturalmente ou modificadas fixadas a uma estrutura de poliamida. Os ácidos nucleicos podem ser de cadeia único ou de cadeia dupla.

O termo "operativamente ligado", quando descrevendo a relação entre as duas regiões de ácido nucleico, refere-se a uma justaposição onde as regiões estão numa relação que as permite funcionar da sua maneira objectivada. Por exemplo, uma sequência de controlo "operativamente ligada" a uma sequência codificadora pode ser ligada de tal forma que a expressão da sequência codificadora seja alcançada sob condições compatíveis com as sequências de controlo, tal como quando moléculas apropriadas (por exemplo, indutores e polimerases) são ligadas à(s) sequência(s) de controlo ou reguladora(s). Assim, em algumas formas de realização, a expressão "operativamente ligado" refere-se a um promotor conectado a uma sequência codificadora de tal forma que a transcrição daquela sequência codificadora seja controlada e regulada por aquele promotor. Técnicas para operativamente ligar um promotor a uma sequência codificadora são conhecidas na técnica; a orientação e localização precisas em relação a uma sequência 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 sequência de nucleótidos de tal forma que a transcrição daquela sequência de nucleótidos seja controlada e regulada por aquela região do promotor. Similarmente, diz-se que uma sequência de nucleótidos está sob "controlo transcripcional" de um promotor ao qual ela está operativamente ligada. As técnicas para ligar operativamente uma região de promotor a uma sequência de nucleótidos são conhecidas na técnica.

Assim, o termo "operativamente ligado" pode também se referir a uma sequência de terminação de transcrição que está conectada a uma sequência de nucleótidos de tal forma que a finalização da transcrição daquela sequência de

nucleótidos seja controlada pela sequência de terminação de transcrição. Em algumas formas de realização, uma sequência de terminação de transcrição compreende uma sequência que causa a transcrição por uma ARN polimerase III para finalizar no terceiro ou quarto "T" na sequência 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 sequências de proteína, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que têm em algumas formas de realização pelo menos 60%, em algumas formas de realização pelo menos 70%, em algumas formas de realização pelo menos 80%, em algumas formas de realização pelo menos 85%, em algumas formas de realização pelo menos 90%, em algumas formas de realização pelo menos 95%, em algumas formas de realização pelo menos 96%, em algumas formas de realização pelo menos 97%, em algumas formas de realização pelo menos 98% e em algumas formas de realização pelo menos 99% de identidade de nucleótido ou resíduo de aminoácido, quando comparadas e alinhadas para máxima correspondência, conforme medido usando-se um dos algoritmos de comparação de sequência a seguir ou por inspecção visual. A identidade percentual existe em algumas formas de realização sobre uma região das sequências que possui pelo menos cerca de 10 resíduos de comprimento, em algumas formas de realização sobre uma região que possui pelo menos cerca de 20 resíduos de comprimento, em algumas formas de realização sobre uma região das sequências que possui pelo menos cerca de 50 resíduos de comprimento, em algumas formas de realização sobre uma região de pelo menos cerca de 100 resíduos, e em algumas formas de realização a identidade percentual existe sobre pelo menos cerca de 150 resíduos. Em algumas formas de realização, a identidade percentual existe sobre o

comprimento inteiro de uma dada região, tal como uma região codificadora ou um miARN inteiro.

Para comparação de sequência, tipicamente uma sequência actua como uma sequência de referência à qual sequências de teste são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de sequência, as sequências de teste e de referência são introduzidas num computador, os coordenados da subsequência são designados se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo da sequência são apontados. O algoritmo de comparação de sequência então calcula o percentual de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste com relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa apontados.

O alinhamento ideal das sequências para comparação pode ser conduzido, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local descrito em Smith & Waterman, 1981<sup>33</sup>, pelo algoritmo de alinhamento de homologia descrito em Needleman & Wunsch, 1970<sup>34</sup>, pela procura por um método de similaridade descrito em Pearson & Lipman, 1988<sup>35</sup>, pelas implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no GCG® WISCONSIN PACKAGE®, disponível a partir de Accelrys, Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América), ou por inspecção visual. Veja geralmente, Ausubel *et al*, 1989<sup>36</sup>.

Um exemplo de um algoritmo que é adequado para determinação do percentual de identidade de sequência e similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, que está descrito em Altschul *et al*, 1990<sup>37</sup>. 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 sequência de alto ganho (HSPs) através

da identificação de palavras curtas de comprimento  $W$  na sequência *query*, que ou emparelha ou satisfaz algum ganho de limite avaliado positivo  $T$  quando alinhado com uma palavra do mesmo tamanho numa sequência de dados.  $T$  é referido como o limite do ganho da palavra vizinha<sup>37</sup>. Estes acertos da palavra vizinha iniciais actuam como sementes para iniciar pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo as mesmas. Os acertos da palavra são então estendidos em ambas as direcções ao longo de cada sequência até que o ganho de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Os ganhos cumulativos são calculados usando-se, para sequências de nucleótido, 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 sequências de aminoácido, a matriz de ganho é usada para calcular o ganho cumulativo. A extensão dos acertos de palavra em cada direcção 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 sequência é alcançada. Os parâmetros do algoritmo BLAST,  $W$ ,  $T$  e  $X$  determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleótido) usa como padrões um comprimento de palavra ( $W$ ) de 11, uma expectativa ( $E$ ) de 10, um corte de 100,  $M = 5$ ,  $N = -4$  e uma comparação de ambas as cadeias. Para as sequências 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 BLOSUM62<sup>38</sup>.

Além disso, para calcular a identidade de sequência percentual, o algoritmo BLAST também executa uma análise estatística da similaridade entre duas sequências. Veja, por exemplo, Karlin & Altschul 1993<sup>39</sup>. Uma medida de

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 nucleótidos ou sequências de aminoácido irá ocorrer por acaso. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico de teste é considerada similar a uma sequência de referência se a menor probabilidade da soma numa comparação da sequência de ácido nucleico de teste e a sequência de ácido nucleico de referência é em algumas formas de realização menor que cerca de 0,1, em algumas formas de realização menor que cerca de 0,01, e em algumas formas de realização menor que cerca de 0,001.

As expressões "substancialmente idêntico" no contexto de duas sequências de nucleótido, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que têm em algumas formas de realização pelo menos 70% de identidade de nucleótido, em algumas formas de realização pelo menos 75% de identidade de nucleótido, em algumas formas de realização pelo menos 80% de identidade de nucleótido, em algumas formas de realização pelo menos 85% de identidade de nucleótido, em algumas formas de realização pelo menos 90% de identidade de nucleótido, em algumas formas de realização pelo menos 95% de identidade de nucleótido, em algumas formas de realização pelo menos 97% de identidade de nucleótido e em algumas formas de realização pelo menos 99% de identidade de nucleótido, quando comparadas e alinhadas para máxima correspondência, conforme medido usando-se um dos algoritmos de comparação de sequência a seguir ou por inspecção visual. Num exemplo, a identidade substancial existe nas sequências de nucleótido de pelo menos 17 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 18 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 19 resíduos, em algumas formas de realização

na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 20 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 21 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 22 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 23 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 24 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 25 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 26 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 27 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 30 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 50 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 75 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 100 resíduos, em algumas formas de realização na sequência de nucleótidos de pelo menos cerca de 150 resíduos, e em ainda um outro exemplo nas sequências de nucleótido que compreende sequências codificadoras completas. Em algumas formas de realização, as sequências polimórficas podem ser sequências substancialmente idênticas. O termo "polimórfico" refere-se à ocorrência de duas ou mais sequências alternativas determinadas geneticamente ou alelos numa população. Uma diferença alélica pode ser tão pequena quando um par de base. Todavia, qualquer perito na especialidade irá reconhecer que as sequências polimórficas correspondem ao mesmo gene.

Uma outra indicação de que duas sequências de nucleótido são substancialmente idênticas é as duas

moléculas hibridam-se especificamente ou substancialmente entre si sob condições restringentes. No contexto de hibridação de ácido nucleico, duas sequências de ácido nucleico sendo comparadas podem ser designadas como uma "sequência marcadora" e uma "sequência de teste". Uma "sequência marcadora" é uma molécula de ácido nucleico de referência, e uma "sequência de teste" é uma molécula de ácido nucleico de teste, muitas vezes encontradas dentro de uma população heterogénea de moléculas de ácido nucleico.

Uma sequência de nucleótidos exemplar utilizada para os estudos de hibridação ou ensaios incluem sequências marcadora que são complementares a ou imitam em algumas formas de realização pelo menos cerca de 14 a 40 sequências de nucleótido de uma molécula de ácido nucleico do assunto presentemente divulgado. Num exemplo, os marcadores compreendem de 14 a 20 nucleótidos, ou até mesmo mais onde desejado, tal como 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300 ou 500 nucleótidos ou até o comprimento total de um dado gene. Tais fragmentos podem ser facilmente preparados através, por exemplo, da sintetização de forma directa do fragmento por síntese química, pela aplicação de tecnologia de amplificação de ácido nucleico, ou pela introdução de sequências seleccionadas em vectores recombinantes para produção recombinante.

A expressão "dirigido para" inclui "hibridar especificamente a", que se refere à ligação, duplexação ou hibridação de uma molécula apenas a uma sequência de nucleótidos particular sob condições restringentes quando essa sequência está presente numa mistura de ácido nucleico complexo (por exemplo, ADN ou ARN celular total).

Por meio de exemplo não limitativo, a hibridação pode ser executada em 5x SSC, 4x SSC, 3x SSC, 2x SSC, 1x SSC ou

0,2x SSC por pelo menos cerca de 1 hora, 2 horas, 5 horas, 12 horas ou 24 horas (veja-se, Sambrook & Russell, 2 001, para uma descrição de tampão de SSC e outras condições de hibridação). A temperatura da hibridação pode ser aumentada para ajustar a restringência da reacção, por exemplo, a partir de 25°C (temperatura ambiente), a cerca de 45°C, 50°C, 55°C, 60°C ou 65°C. A reacção de hibridação pode também incluir um outro agente que afecta a restringência; por exemplo, a hibridação conduzida na presença de 50% de formamida aumenta a restringência da hibridação a uma temperatura definida.

A reacção de hibridação 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 aumentada para ajustar a restringência 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 hibridação pode ser seguida por duas etapas de lavagem a 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 hibridação e lavagem que podem ser usadas para clonar sequências de nucleótido homólogas que são substancialmente idênticas às sequências de nucleótido de referência do assunto presentemente divulgado: uma sequência de nucleótidos marcadora hibrida-se num exemplo a uma sequência de nucleótidos alvo em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO<sub>4</sub> 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 formas de realização, uma sequência marcadora e de teste hibridam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5M, EDTA 1 mm a 50°C seguido por lavagem em 1x SSC, SDS 0,1% a 50°C; em algumas formas de realização, uma sequência marcadora de teste hibridam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5M, EDTA 1 mm a 50°C seguido por lavagem em 0,5x SSC, SDS 0,1% a 50°C; em algumas formas de realização, uma sequência marcadora de teste hibridam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO<sub>4</sub> 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 sequência marcadora de teste hibridam-se em dodecil sulfato de sódio 7% (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0,5M, EDTA 1 mm a 50°C seguido por lavagem em 0,1x SSC, SDS 0,1% a 65°C.

Condições de hibridação restringentes exemplares adicionais incluem hibridação durante a noite a 42°C numa solução que compreende ou que consiste em formamida 50%, 10x Denhardfs (Ficoll 0,2%, polivinilpirrolidona 0,2%, albumina sérica bovina 0,2%) e 200 mg/L de ADN transportador desnaturado, por exemplo, ADN 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 duas etapas de lavagem a 65°C, cada uma, por cerca de 20 minutos em 0,2x SSC, SDS 0,1%.

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

Assim, sob uma revisão da presente divulgação, as condições de restringência são conhecidas dos peritos na especialidade ou podem ser determinadas pelo técnico habilitado sem experimentação indevida<sup>36, 40-44</sup>.

A expressão "hibridar substancialmente a" refere-se à hibridação 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 restringência do meio de hibridação para alcançar a hibridação 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 da expressão dos genes dentro de uma célula ou organismo, e relacionam-se aos traços que são potencialmente observáveis ou avaliáveis.

Conforme usado no presente documento, os termos "polipéptido", "proteína" e "péptido", que são usados de forma 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 frequentemente usada com referência aos polipéptidos relativamente grandes, e "péptido" seja frequentemente usado com referência a pequenos polipéptidos, a utilização destes termos na técnica sobrepõe-se e varia. O termo "polipéptido" conforme usado no presente documento refere-se aos péptidos, polipéptidos e proteínas, a menos que de outra forma notado. Conforme usado no presente documento, os termos "proteína", "polipéptido" e "péptido" são usados de forma intercambiável aqui quando se referindo a um produto do gene. O termo "polipéptido" abrange proteínas de

todas as funções, incluindo enzimas. Assim, polipéptidos exemplares incluem produtos de gene, proteínas que ocorrem naturalmente, homólogos, ortólogos, parólogos, fragmentos e outros equivalentes, variantes e análogos dos precedentes.

Os termos "fragmento de polipéptido" ou "fragmento", quando usado com referência a um polipéptido de referência, referem-se a um polipéptido em que os resíduos de aminoácido são deletados conforme comparados ao próprio polipéptido de referência, mas onde a sequência de aminoácido restante é frequentemente idêntica às posições correspondentes no polipéptido de referência. Tais deleções podem ocorrer na terminação amino ou na terminação carboxi do polipéptido 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 actividade(s) biológica(s) do polipéptido 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 usado no presente documento, o termo "iniciador" refere-se a uma sequência que comprehende em algumas formas de realização dois ou mais desoxirribonucleótidos ou ribonucleótidos, em algumas formas de realização mais de três, em algumas formas de realização mais de oito e em algumas formas de realização pelo menos cerca de 20 nucleótidos de uma região exónica ou intrónica.

Tais oligonucleótidos possuem em algumas formas de

realização entre dez e trinta bases de comprimento.

O termo "purificado" refere-se a uma espécie objectivo que é a espécie predominante presente (isto é, numa base molar é mais abundante que qualquer outra espécie individual na composição). Uma "fracção purificada" é uma composição onde a espécie objectivada compreende pelo menos cerca de 50 por cento (numa 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 dissolvido ou dispersada não é frequentemente 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, mais de cerca de 85%, 90%, 95%, 99% ou mais de todas as espécies presentes. A espécie objectivada 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 dos peritos na especialidade, incluindo, por exemplo, análise de sequência de aminoácido com terminal amino, electroforese em gel e análise de espectrometria de massa.

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

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

O termo "sequência reguladora" é um termo genérico usado através da especificação para se referir às sequências de polinucleótido, tais como sinais de iniciação, melhoradores, reguladores, promotores e sequências de terminação, que são necessários ou desejáveis para afectar a expressão das sequências codificadoras e não codificadoras às quais eles são operativamente ligados. Sequências reguladoras exemplares são descritas em Goeddel, 1990<sup>45</sup>, e incluem, por exemplo, os promotores inicial e posterior do vírus simian 4 0 (SV4 0), 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 ARN polimerase, as principais regiões operadoras e promotoras de fago lambda, as regiões de controlo 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 factores de acasalamento de levedura, o promotor de poliedro do sistema baculovírus e outras sequências conhecidas para controlar a expressão de genes de células procariotas ou eucariotas ou seus vírus, e várias combinações destes. A natureza e o seu de tais sequências de controlo podem diferir dependendo do organismo hospedeiro. Em procariotas, tais sequências reguladoras geralmente incluem promotor, local de ligação ribossómica e

sequências de terminação de transcrição. O termo "sequência reguladora" é alvo 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, sequências líderes e sequências associadas de fusão.

Em certas formas de realização, a transcrição de uma sequência de polinucleótido está sob controlo de uma sequência promotora (ou outra sequência reguladora) que controlo a expressão do polinucleótido num tipo de célula em que a expressão é objectivada. Será também compreendido que o polinucleótido pode estar sob o controlo de sequências reguladoras que são as mesmas ou diferentes daquelas sequências que controlam a expressão da forma que ocorre naturalmente do polinucleótido. Em algumas formas de realização, uma sequência promotora é seleccionada a partir do grupo que consiste num promotor mínimo de CMV, creatinina quinase muscular (MCK), e um promotor de cadeia pesada de  $\alpha$ -miosina (MHC). Por exemplo, o promotor de creatinina quinase muscular (MCK) que direcciona a expressão do gene no músculo esquelético, pode ser usado para expressar miARNs, tal como por exemplo, miR-1, miR-133 ou miR-206 em tecido, incluindo o músculo esquelético actualmente disponível a partir de técnicas transgénicas. Entende-se que o promotor inteiro identificado por qualquer promotor (por exemplo, os promotores listados aqui) não necessitam ser utilizados, e que um derivado funcional deste pode ser usado. Conforme usada no presente documento, a expressão "derivado funcional" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que comprehende sequência suficiente para direcccionar a 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 sequência de polinucleótido é tipicamente regulado por uma sequência de terminação de transcrição operativamente ligada (por exemplo, uma sequência de terminação de ARN polimerase III). Em certos exemplos, os terminadores transcripcionais são também responsáveis pela poliadenilação de ARNm correcta. A sequência de ADN reguladora não transcrita em 3' inclui, em algumas formas de realização, de cerca de 50 a cerca de 1.000, e em algumas formas de realização de cerca de 100 a cerca de 1.000 pares de base de nucleótido e contém sequências de terminação de transcrição e tradução. Em algumas formas de realização, uma sequência de terminação de ARN polimerase III compreende a sequência de nucleótidos TTTTTT.

O termo "gene repórter" refere-se a um ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica uma proteína que é facilmente detectável ou pela sua presença ou actividade, incluindo, mas não limitada à luciferase, proteína fluorescente (por exemplo, proteína fluorescente verde), cloranfenicol acetil transferase, P-galactosidase, fosfatase alcalina placentária segregada, p-lactamase, hormona do crescimento humano e outros repórteres de enzimas segregadas. Geralmente, um gene repórter codifica um polipeptído não diferente produzido pela célula hospedeira, que é detectável pela análise da(s) célula(s), por exemplo, por análise fluorimétrica directa, 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 semiquantitativa ou activação transcricional. Enzimas exemplares incluem esterases,  $\beta$ -lactamase, fosfatases,

peroxidases, proteases (activador de plasminogénio do tecido ou uroquinase) e outras enzimas cuja função possa ser detectada pelos substratos cromogénico ou fluorogénico conhecidos dos peritos na especialidade ou desenvolvidos no futuro.

Conforme usado no presente documento, o termo "sequenciamento" refere-se à determinação da sequência linear ordenada de ácidos nucleicos ou aminoácidos de uma amostra alvo de ADN, ARN ou proteína, usando-se técnicas laboratoriais manuais ou automatizadas convencionais.

Conforme usado no presente documento, o termo "substancialmente puro" refere-se àquele polinucleótido ou polipéptido que é substancialmente livre das sequências 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 formas de realização pelo menos 5 0%, em algumas formas de realização pelo menos 70%, em algumas formas de realização 80% e em algumas formas de realização 90% livre dos materiais e compostos com os quais ela está associada na natureza.

Conforme usado no presente documento, o termo "célula alvo" refere-se a uma célula na qual é desejado inserir uma sequência de ácido nucleico ou polipéptido, ou de outra forma efectuar uma modificação das condições conhecidas como sendo padrões na célula não modificada. Uma sequência de ácido nucleico introduzida numa célula alvo pode ser de comprimento variável. Adicionalmente, uma sequência de ácido nucleico pode entrar numa célula alvo como um componente de uma plasmídeo ou outro vector ou como uma sequência aberta.

Conforme usado no presente documento, 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, comprehende uma sequência de ácido nucleico cujo nível de expressão, ou no nível de ARNm ou de polipéptido, é regulado de regulação negativa por um miARN. Similarmente, os termos "ARN alvo" ou "ARNm alvo" referem-se à transcrição de um gene alvo ao qual objectiva-se que o miARN se ligue, levando à modulação da expressão do gene 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 agente patogénico, 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 organismo, por exemplo, uma planta, animal, protozoário, vírus, bactéria ou fungo.

Conforme usado no presente documento, o termo "transcrição" refere-se a um processo celular envolvendo a interacção de uma ARN polimerase com um gene que direcciona a expressão como ARN da informação estrutural presente nas sequências 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 transcrição, (f) poliadenilação transcrição, (g) exportação nuclear da transcrição, (h) correcção da transcrição e (i) estabilização da transcrição.

Conforme usado no presente documento, o termo "factor de transcrição" refere-se a uma proteína citoplásrica ou nuclear que se liga a um gene, ou se liga a uma transcrição de ARN de um gene, ou se liga a uma outra proteína que se liga a um gene ou uma transcrição de ARN ou a uma outra proteína que sucessivamente se liga a uma gene ou uma

transcrição de ARN, de maneira que module assim a expressão do gene. Tal modulação pode adicionalmente ser alcançada por outros mecanismos, a essência de um "factor de transcrição para um gene" pertence a um factor que altera o nível de transcrição do gene de alguma forma.

O termo "transfecção" refere-se à introdução de um ácido nucleico, por exemplo, um vector de expressão, numa 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 ácido nucleico exógeno. Por exemplo, uma célula transformada pode expressar um miARN do assunto presentemente divulgado.

Conforme usado no presente documento, "significância" ou "significativo" refere-se a uma análise estatística da probabilidade que haja uma associação não aleatória entre duas ou mais entidades. Para determinar se uma relação é ou não é "significativa" ou se possui ou não "significância", manipulações estatísticas dos dados podem ser executadas para calcular uma probabilidade, expressa como um "valor-p". Aqueles valores-p que estejam abaixo de um ponto de corte definido pelo usuário são tratados como significativos. Num exemplo, um valor-p menor que ou igual a 0,05, em algumas formas de realização menor que 0,01, em algumas formas de realização menor que 0,005 e em algumas formas de realização menor que 0,001, é tratado como significativo.

Conforme usada no presente documento, a expressão "ARN alvo" refere-se a uma molécula de ARN (por exemplo, uma molécula de ARN que codifica um produto de gene) que é um alvo para modulação. Em algumas formas de realização, o ARN

alvo é codificado por um gene alvo. Similarmente, a expressão "local alvo" refere-se a uma sequência dentro de um ARN alvo que é "tida como alvo" para clivagem mediada por uma construção de miARN que contém sequências dentro de seu cadeia antissense que são complementares ao local alvo.

Também similarmente, a expressão "célula alvo" refere-se a uma célula que expressa um ARN alvo e dentro da qual um miARN é alvo para ser introduzido. Uma célula alvo é, em algumas formas de realização, um miócito.

Um miARN é "tido como alvo para" uma molécula de ARN se ela possuir similaridade de nucleótido suficiente às moléculas de ARN que se espera que modulem a expressão da molécula de ARN sob condições suficientes para que o miARN e a molécula de ARN interajam. Em algumas formas de realização, a interacção ocorre dentro de um miócito. Em algumas formas de realização, a interacção ocorre sob condições fisiológicas.

Conforme usado no presente documento, 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 a ser desenvolvido *in vitro*. Assim, conforme usado no presente documento, 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 usado no presente documento, a expressão "nível detectável de clivagem" refere-se a um grau de clivagem do ARN alvo (e formação dos ARNs de produto clivado) que é suficiente para permitir a detecção dos produtos da clivagem acima da base dos ARNs produzidos por

degradação aleatória do ARN alvo. A produção de produtos de clivagem mediada por miARN de pelo menos 1-5% do ARN alvo é suficiente para permitir a detecção acima da base para maior parte dos métodos de detecção.

Os termos "microRNA" e "miARN" são usados de forma intercambiável e referem-se a uma molécula de ácido nucleico de cerca de 17-24 nucleótidos que é produzida a partir de um pri-miARN, um pre-miARN ou um equivalente funcional. Os miARNs devem ser contrastados com ARNs interferentes curtos (siARNs), embora no contexto de miARNs e siARNs fornecidos de forma exógena, esta distinção pode ser de um pouco artificial. A distinção para manter em mente é que um miARN é necessariamente o produto da actividade da nuclease numa molécula em forma de grampo tal como foi aqui descrito, e um siARN pode ser gerado a partir de uma molécula de ARN de cadeia dupla ou uma molécula em forma de grampo. Informação adicional relacionada aos miARNs geralmente, assim como uma base de dados de miARNs publicados conhecidos e ferramentas de pesquisa para exploração da base de dados, pode ser encontrada em Wellcome Trust Sanger Institute miRBase::Sequences Website, incorporado no presente documento por referência. Veja também, The microRNA Registry, Griffiths- Jones S., NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111, incorporado no presente documento por referência.

Conforme usado no presente documento, o termo "ARN" refere-se a uma molécula que compreende pelo menos um resíduo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" pretende-se dizer um nucleótido com um grupo hidroxi na posição 2' de uma metade  $\beta$ -D-ribofuranose. Os termos abrangem ARN de cadeia dupla, ARN de cadeia único, ARNs com regiões tanto de cadeia dupla quanto de cadeia único, ARN isolado tal como ARN parcialmente purificado, ARN essencialmente puro,

ARN sintético e ARN produzido de forma recombinante. Assim, os ARNs incluem, mas não estão limitados às transcrições de ARNm, precursores de miARNs e miARN, e siARNs. Conforme usado no presente documento, o termo "ARN" é também alvo para abranger ARN alterado ou ARN análogo, que são ARNs que diferem do ARN que ocorre naturalmente pela adição, deleção, substituição e/ou alteração de um ou mais nucleótidos. Tais alterações podem incluir adição de material que não seja nucleótido, tal como à(s) extremidade(s) do ARN ou internamente, por exemplo, num ou mais nucleótidos do ARN. Os nucleótidos nas moléculas de ARN do assunto presentemente divulgado podem também compreender nucleótidos não padronizados, tais como nucleótidos que ocorrem de forma não natural ou nucleótidos quimicamente sintetizados ou desoxinucleótidos. Estes ARNs alterados podem ser referidos como análogos ou análogos de um ARN que ocorre naturalmente.

Conforme usada no presente documento, a expressão "ARN de cadeia dupla" refere-se a uma molécula de ARN 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 ARN que ou completamente ou apenas parcialmente de cadeia dupla. ARNs de cadeia dupla exemplares incluem, mas não estão limitados a moléculas que compreendem pelo menos dois filamentos de ARN distintos que são ou parcialmente ou completamente duplexados por hibridação intermolecular. Adicionalmente, o termo é alvo para incluir uma molécula de ARN única que por hibridação intramolecular pode formar uma região de cadeia dupla (por exemplo, um em forma de grampo). Assim, conforme usada no presente documento, as expressões "hibridação intermolecular" e "hibridação intramolecular" referem-se às moléculas de cadeia dupla para as quais os nucleótidos envolvidos na formação do díplice estão presentes em

moléculas diferentes ou na mesma molécula, respectivamente.

Conforme usada no presente documento, a expressão "região de cadeia dupla" refere-se a qualquer região de uma molécula de ácido nucleico que está numa conformação de cadeia dupla através de uma ligação de hidrogénio entre os nucleótidos incluindo, mas não limitado à ligação de hidrogénio entre citosina e guanosina, adenosina e timidina, adenosina e uracilo, e qualquer outro díplice de ácido nucleico como será compreendido por qualquer perito na especialidade. O comprimento da região de cadeia dupla pode variar de cerca de 15 pares de base consecutivos a vários milhares de pares de base. Em algumas formas de realização, a região de cadeia dupla possui pelo menos 15 pares de base, em algumas formas de realização entre 15 e 300 pares de base e em algumas formas de realização entre 15 e cerca de 60 pares de base. Conforme descrito aqui acima, a formação da região de cadeia dupla resulta da hibridação dos filamentos de ARN complementares (por exemplo, uma cadeia sense e uma cadeia antissense) ou através de uma hibridação intermolecular (isto é, envolvendo 2 ou mais moléculas de ARN distintas) ou através de uma hibridação intramolecular, esta última pode ocorrer quando uma molécula de ARN única contém regiões auto-complementares que são capazes de se hibridarem entre si na mesma molécula de ARN. Estas regiões auto-complementares são tipicamente separadas por um estiramento curto de nucleótidos (por exemplo, cerca de 5-10 nucleótidos) de forma que o evento da hibridação intramolecular forme o que é chamado na técnica como "em forma de grampo" ou "estrutura haste-alça"

### III. Ácidos Nucleicos

As moléculas de ácido nucleico utilizadas de acordo

com o assunto presentemente divulgado incluem moléculas de ácido nucleico que codifica 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 expressão de um gene de miócito (por exemplo, uma molécula de ácido nucleico de miARN). Assim, as moléculas de ácido nucleico utilizadas 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 utilizadas aqui incluem, mas não estão limitadas a miR-1 (UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA, SEQ ID NO: 1), miR-133 (UUGGUCCCCUUCACCAGCUGU, SEQ ID NO: 2), miR-206 (UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG, SEQ ID NO: 3), miR-208 (AUAAGACGAGCAAAAGCUUGU, SEQ ID NO: 4), miR-22 (AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU, SEQ ID NO: 5), miR-2 6 (UUCAAGUAAUyCAGGAUAGGy (U), SEQ ID NO: 6), miR-2 9 (UAGCACCAUyUGAAUCrGU (kUU), SEQ ID NO: 7), miR-3 0 (ykUwmAswysshhswyUvnvv (bC), SEQ ID NO: 8), miR-128 (UCACAGUGAACCGGUCUCUUy, SEQ ID NO: 9), miR-143 (UGAGAUGAAGCACUGUAGCUA, SEQ ID NO: 10) e miR-14 5 (GUCCAGUUUUCCCCAGGAAUCCUU, SEQ ID NO: 11), sequências substancialmente idênticas àquelas aqui descritas (por exemplo, em algumas formas de realização, sequências pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% OU 99% idênticas a qualquer SEQ ID NOS: 1-11), e subsequências e sequências alongadas destas. O assunto presentemente divulgado também abrange genes, cDNAs, genes quiméricos e vectores que compreendem as sequências de ácido nucleico divulgadas. Somente miR-1 e miR-133 estão cobertos pelas presentes reivindicações.

Os códigos de nucleótido de uma letra são usados acima e em qualquer lugar no presente documento e estão de acordo com o Padrão WIPO ST.25 (1998), Apêndice 2, Quadro 1, (M.P.E.P. 2422, Quadro 1), incorporado no presente

documento por referência. Particularmente, os códigos de uma letra a seguir representa, o(s) nucleótido(s) exposto(s) no Quadro 1. O(s) nucleótido(s) entre parênteses (por exemplo, (n)) é/são alvo(s) para significar que o(s) nucleótido(s) pode(m) estar presente(s) ou ausente(s). Também, a Figura 21 lista as sequências individuais possíveis para SEQ ID NOS: 5-11 com base nas permutações de nucleótidos expostas em SEQ ID NOS: 5-11.

Quadro 1

Abreviações de Nucleótido de Uma Letra	
A	adenina
G	guanina
C	citosina
T	timina
U	uracilo
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 sequência de nucleótidos exemplar utilizada nos métodos divulgados no presente documento compreendem sequências que são complementares entre si, as regiões complementares sendo capazes de formar um díplice de, em algumas formas de realização, pelo menos 15 a 300 pares de base, e em algumas formas de realização, pelo menos cerca de 15-24 pares de base. Uma cadeia do díplice compreende uma sequência de ácido nucleico de pelo menos 15 bases

contíguas possuindo uma sequência de ácido nucleico de uma molécula de ácido nucleico do assunto presentemente divulgado. Num exemplo, uma cadeia do díplice compreende uma sequência de ácido nucleico que compreende 15, 16, 17 ou 18 nucleótidos, ou mesmo mais longas onde desejado, tal como 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleótidos, ou até o comprimento total de qualquer uma daquelas sequências de ácido nucleico aqui descritas. Tais fragmentos podem ser facilmente preparados através, por exemplo, da sintetização de forma directa do fragmento por síntese química, pela aplicação de tecnologia de amplificação de ácido nucleico, ou pela introdução de sequências seleccionadas em vectores recombinantes para produção recombinante. A expressão "hibridar especificamente a" refere-se à ligação, duplexação ou hibridação de uma molécula apenas a uma sequência de nucleótidos particular sob condições restringentes quando essa sequência está presente numa mistura de ácido nucleico complexo (por exemplo, ADN ou ARN celular total).

O termo "subsequência" refere-se a uma sequência de uma molécula de ácido nucleico ou molécula de aminoácido que compreende uma parte de uma sequência de ácido nucleico ou aminoácido mais longa. Uma subsequência exemplar é uma sequência que compreende parte de uma região duplexada de um pri-miARN ou um pre-miARN ("precursores de miARN", incluindo, mas não limitada aos nucleótidos que se tornam miARN maduro após a acção da nuclease ou uma região de cadeia único num precursor de miARN).

O termo "sequência alongada" refere-se a uma adição de nucleótidos (ou outras moléculas análogas) incorporados no ácido nucleico. Por exemplo, uma polimerase (por exemplo, uma ADN polimerase) pode adicionar sequências na terminação 3' da molécula de ácido nucleico. Além disso, a sequência

de nucleótidos pode ser combinada com outras sequências de ADN, tais como promotores, regiões promotoras, melhoradores, sinais de poliadenilação, sequências intrónicas, locais de enzima de restrição adicionais, locais de clonagem múltipla e outros segmentos de codificação.

Os ácidos nucleicos do assunto presentemente divulgado podem ser clonados, sintetizados, recombinantemente alterados, mutagenizados ou submetidos a combinações destas técnicas. ADN recombinante padrão e técnicas de clonagem molecular usadas para isolar ácidos nucleicos são conhecidos na técnica. Métodos não limitativos exemplares são descritos por Silhavy *et al*, 1984<sup>46</sup>, Ausubel *et al*, 1989<sup>36</sup>, Glover & Hames, 1995<sup>47</sup> e Sambrook & Russell, 2001<sup>40</sup>. Mutagénese local-específica para criar mudanças, deleções ou pequenas inserções de par de base é também conhecida na técnica conforme exemplificado pela publicações (veja, por exemplo, Adelman *et al*, 1983<sup>48</sup>; Sambrook & Russell, 2001<sup>40</sup>).

#### IV. Vectores de Expressão de miARN

Em algumas formas de realização do assunto presentemente divulgado, as moléculas de miARN ou moléculas precursoras de miARN são expressas a partir das unidades de transcrição inseridas nos vectores de ácido nucleico (alternativamente referido aqui geralmente como "vectores recombinantes" ou "vectores de expressão"). Um vector pode ser usado para entregar uma molécula de ácido nucleico que codifica um miARN num miócito para ter como alvo um gene específico. Os vectores recombinantes podem ser, por exemplo, plasmídeos de ADN ou vectores virais. Uma variedade de vectores de expressão é conhecida na técnica. A selecção do vector de expressão apropriado pode ser feita com base em vários factores, mas não limitados ao tipo de

célula onde se deseja a expressão.

O termo "vector" refere-se a um ácido nucleico capaz de transportar um outro ácido nucleico ao qual ele foi ligado. Os vectores incluem aqueles capazes de replicação e expressão autónoma dos ácidos nucleicos aos quais eles estão ligados. Vectores capazes de direcccionar a expressão dos genes aos quais eles estão operativamente ligados são referidos aqui como "vectores de expressão". Em geral, os vectores de expressão de utilidade em técnicas recombinantes estão frequentemente na forma de plasmídeos. Entretanto, o assunto presentemente divulgado é alvo para incluir outras formas de vectores de expressão que apresentam funções equivalentes e que se tornam conhecidas na técnica subsequentemente até aqui.

O termo "vector de expressão" conforme usado no presente documento refere-se a uma sequência de nucleótidos capaz de direcccionar a expressão de uma sequência de nucleótidos particular numa célula hospedeira apropriada, que compreende um promotor operativamente ligado à sequência de nucleótidos de interesse que está operativamente ligada às sequências de terminação de transcrição. Ele também compreende tipicamente sequências exigidas para a tradução adequadas da sequência de nucleótido. A construção que compreende a sequência de nucleótidos de interesse pode ser químérica. A construção pode também ser uma que ocorra naturalmente mas que tenha sido obtida numa forma recombinante útil para a expressão heteróloga. A sequência de nucleótidos de interesse, incluindo quaisquer sequências adicionais determinadas para efectuar a expressão adequada das sequências de nucleótido, pode também ser referida como uma "cassete de expressão".

Os termos "gene heterólogo", "sequência de ADN

heteróloga", "sequência de nucleótidos heteróloga", "molécula de ácido nucleico exógena" ou "segmento de ADN exógeno", conforme usado no presente documentos, cada um, refere-se a uma sequência que origina-se de uma fonte alheia a uma célula hospedeira objectivada ou, se da mesma fonte, é modificada de sua forma original. Assim, um gene heterólogo numa célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular mas foi modificada, por exemplo por mutagénese ou por isolamento das sequências reguladoras transpcionais nativas. Os termos também incluem cópias múltiplas que não ocorrem naturalmente de uma sequência de ocorrência natural. Assim, os termos podem se referir a um segmento de ADN que é alheio ou heterólogo à célula, ou homólogo à célula mas numa 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 sequência de nucleótidos dentro de um gene que é está na posição 5' em relação a uma sequência codificadora e funciona para direcionar a transcrição da sequência codificadora. A região promotora compreende um local de inicio transpcionial, e pode adicionalmente incluir um ou mais elementos reguladores transpcionais. Em algumas formas de realização, um método do assunto presentemente divulgado emprega um promotor de ARN polimerase III.

Um "promotor mínimo" é uma sequência 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 subsequências de promotores que são capazes de direcionar um nível bases de transcrição de uma construção repórter num sistema experimental. Os promotores mínimos incluem mas

não estão limitados ao promotor mínimo de citomegalovírus (CMV), promotor mínimo de timidina quinase do vírus do herpes simplex (HSV-tk), promotor mínimo do vírus simian 40 (SV40), promotor mínimo de  $\beta$ -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 frequentemente aumentados com um ou mais elementos reguladores transcripcionais para influenciar a transcrição de um gene operativamente ligado. Por exemplo, os elementos reguladores transcripcionais específicos ao tipo de célula ou específicos a tecido podem ser adicionados aos promotores mínimos para criar promotores recombinantes que direcionam a transcrição de uma sequência de nucleótidos operativamente ligada de uma maneira específica ao tipo de célula ou específica a tecido. Conforme usado no presente documento, o termo "promotor mínimo" também abrange um derivado funcional de um promotor divulgado no presente documento, incluindo, mas não limitado a um promotor de ARN polimerase III (por exemplo, um promotor H1, 7SL, 5S ou U6), um promotor de adenovírus VAI, um promotor Vault, um promotor de ARN telomerase e um promotor do gene de tRNA.

Promotores diferentes possuem combinações diferentes de elementos reguladores transcripcionais. Se um gene é ou não expresso numa célula depende da combinação dos elementos reguladores transcripcionais particulares que constituem o promotor do gene e os factores de transcrição diferentes que estão presentes dentro do núcleo da célula. Como tal, os promotores são frequentemente classificados como "constitutivos", "específico a tecido", "específico ao tipo de célula" ou "induzível", dependendo de suas actividades funcionais *in vivo* ou *in vitro*. Por exemplo, um promotor constitutivo é um que seja capaz de direcionar a transcrição de um gene numa variedade de tipos de célula

(em algumas formas de realização, em todos os tipos de célula) de um organismo. Promotores constitutivos exemplares incluem os promotores para os seguintes genes que codificam certas funções constitutivas ou de "organização": hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), dihidrofolato reductase (DHFR; (Scharfmann *et al*, 1991), adenosina desaminase, fosfoglicerato quinase (PGK), piruvato quinase, fosfoglicerato mutase, o promotor de P-actina (veja-se, por exemplo, Williams *et al*, 1993), e outros promotores constitutivos conhecidos dos peritos na especialidade. 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 são inactivos 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 dos peritos na especialidade.

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

O termo "sequência reguladora transcricional" ou "elemento regulador transcricional", conforme usado no presente documento, cada um, refere-se a uma sequência de nucleótidos dentro da região promotora que permite receptividade a um factor de transcrição regulador. A receptividade pode abranger um decréscimo ou um aumento no rendimento transcricional e é mediado pela ligação do factor de transcrição à sequência de nucleótidos que compreende o elemento regulador transcricional. Em algumas

formas de realização, uma sequência reguladora transcricional é uma sequência de terminação de transcrição, alternativamente referida aqui como um sinal de terminação de transcrição.

O termo "factor de transcrição" refere-se de maneira geral a uma proteína que modula a expressão do gene pela interacção com o elemento regulador transcricional e componentes celulares para transcrição, incluindo ARN Polimerase, Factores Associados à Transcrição (TAFs), proteínas de remodelagem de cromatina e qualquer outra proteína relevante que impacte a transcrição do gene.

## V. Métodos para Modular a Expressão de Gene em Miócitos

O assunto presentemente divulgado fornece agentes para utilização em métodos para modular a expressão de genes em miócitos com especificidade. Em algumas formas de realização, os métodos compreendem contactar um miócito com um miARN ou um vector que codifica o miARN 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 nível de especificidade. Assim, em algumas formas de realização, o assunto presentemente divulgado também fornece métodos para modular a função do miócito ou o desenvolvimento pelo contacto de um miócito com um miARN tido como alvo para um gene no miócito que pode modular a função do miócito ou desenvolvimento.

Em algumas formas de realização, o miARN tido como alvo para um gene particular é seleccionado de miR-1 e miR-133 (SEQ ID NOs: 1-2, respectivamente), incluindo miARNS possuindo sequências pelo menos cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%

idênticas às sequências expostas em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1-2.

Um miARN é "tido como alvo para" uma molécula de ARN se ela possuir similaridade de nucleótido suficiente à molécula de ARN que se espera que module a expressão da molécula de ARN sob condições suficientes para que o miARN e a molécula de ARN interajam. Em algumas formas de realização, a interacção ocorre dentro de um miócito. Em algumas formas de realização, a interacção ocorre sob condições fisiológicas. Conforme usado no presente documento, 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 indivíduo, ou se aquele miócito está a ser desenvolvido *in vitro*. Assim, conforme usada no presente documento, 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*.

Em algumas formas de realização, o gene tido como alvo é um gene de diferenciação de miócito ou um gene de proliferação de miócito e quando expresso pode modular a diferenciação e/ou proliferação do miócito, respectivamente. Em algumas formas de realização, 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 miARN pode resultar num aumento na diferenciação e/ou proliferação do miócito tratado. Numa forma de realização exemplar não limitativo do assunto presentemente divulgado, o gene de diferenciação do miócito pode codificar um polipeptídeo de histona desacetilase 4 (HDAC4) ou uma proteína receptora de

hormona da tireóide 240 (TRAP240) e o gene da proliferação do miócito pode codificar um polipeptídeo do factor de resposta sérica (SRF).

A expressão de um ou mais genes de diferenciação ou proliferação de miócito pode ser alvejada para inibição da utilização de um dos miARNs divulgados no presente documento. Os miARNs, miR-1 e miARN-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 formas de realização do assunto presentemente divulgado, a diferenciação de um miócito pode ser aumentada contactando-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 formas de realização do assunto presentemente divulgado, a proliferação de um miócito pode ser aumentada contactando-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

O assunto presentemente divulgado fornece em algumas formas de realização agentes para utilização em métodos terapêuticos para tratar uma lesão muscular num indivíduo. Conforme divulgado no presente documento, miARNs pode ser dirigido a genes para modular a expressão dos genes. Particularmente, os genes que expressão produtos que funcionam para inibir a diferenciação e/ou proliferação do miócito podem ser dirigidos pelos miARNs para inibir a expressão destes genes, resultando em diferenciação e/ou proliferação aumentada de miócito. Também, os inibidores de

miARN podem ser dirigidos para miARNs endógenos para facilitar um aumento relativo na expressão de produtos de gene particulares de uma maneira benéfica para o tratamento da lesão muscular. Adicionalmente, combinações de miARNs e/ou inibidores de miARN podem ser co-administrados ao lesão muscular num método para optimizar a cura do dano. 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 formas de realização do assunto presentemente divulgado, os agentes proporcionados são usados em métodos para tratar uma lesão muscular num indivíduo que compreendem administrar a um local de lesão muscular num indivíduo uma quantidade eficaz de um miARN, um vector que codifica o miARN, um inibidor de um miARN ou combinações destes, onde o miARN é dirigido a um gene num miócito no local da lesão muscular.

O desenvolvimento do músculo é comparativamente o desenvolvimento e/ou a cura do músculo, tal como após a lesão, 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 num local da lesão muscular pode ser facilitado pela administração coordenada ao local do dado de miARNs e/ou inibidores de miARN que melhoram a proliferação de miócitos não diferenciados, e a administração ao local do dano de miARNs e/ou inibidores de miARN que melhoram a diferenciação dos miócitos proliferados em tecido muscular que funciona maduro.

Por exemplo, conforme divulgado no presente documento, 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 transcricional da expressão do gene muscular. Assim, numa forma de realização representativa não limitativo 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 da lesão muscular num 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 da lesão muscular num segundo ponto de tempo para aumentar a diferenciação dos miócitos proliferados. A coadministração temporariamente coordenada dos miARNs e/ou inibidores de miARN múltiplos podem também melhorar a recuperação da lesão muscular.

Em algumas formas de realização, a lesão muscular é o resultado de um traumatismo muscular mecânico, uma doença degenerativa muscular, uma lesão cardíaco, ou uma combinação dos mesmos. O traumatismo muscular mecânico pode ser um resultado de, por exemplo, trauma por força bruta tal como ocorre em acidentes de automóveis ou danos por perfuração, onde o tecido muscular é cortado ou dilacerado. Doenças degenerativas musculares não limitativas 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)). As lesões musculares por lesão cardíaca não limitativas exemplares

incluem enfarto do miocárdio e dano de músculo cardíaco por reperfusão.

O miARN dirigido para um gene particular é seleccionado a partir do grupo que consiste em miR-1 e miR-133 (SEQ ID NOS: 1-2), incluindo miARNs possuindo sequências pelo menos cerca de 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas às sequências expostas em qualquer uma de SEQ ID NOS: 1-2. Em algumas formas de realização, o gene é um gene de diferenciação de miócito (por exemplo, que codifica HDAC4 ou TRAP240) ou um gene de proliferação de miócito (por exemplo, que codifica 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 mamífero preferido é mais preferivelmente um humano. Conforme usado no presente documento, o termo "indivíduo" inclui tanto indivíduos humanos quanto indivíduo animais. Assim, usos terapêuticos veterinários são fornecidos de acordo com o assunto presentemente divulgado.

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 económica, 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 animais domésticos ou em zoológicos. Exemplos de tais animais incluem, mas não estão limitados a: carnívoros tais como gatos e cães; suínos, incluindo leitões, porcos e javali; ruminantes e/ou ungulados tais como gado, boi, ovelha,

girafas, cervos, 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 particularmente aves domésticas, tais como perus, galinhas, patos, ganso, galinha d'angola e etc., uma vez que são de importância económica para humanos. Assim, é também fornecido o tratamento de animais de criação em fazendas, incluindo, mas não limitados a suínos domesticados, ruminantes, ungulados, cavalos (incluindo cavalos de corrida), aves domésticas e etc.

Métodos adequados para administrar a um indivíduo um miARN ou um vector que codifica o miARN inclui mas não estão limitados a administração sistémica, administração parentérica (incluindo administração intravascular, intramuscular, intra-arterial), entrega oral, entrega bucal, administração subcutânea, inalação, instalação intratraqueal, implantação cirúrgica, entrega transdérmica, injecção local e injecção/bombardeamento com hiper-velocidade. Onde aplicável, a infusão contínua pode aumentar o acúmulo de droga num local alvo.

O modo de administração particular usado de acordo com os métodos do assunto presente depende de vários factores, incluindo mas não limitado ao miARN e/ou veículo do vector utilizado, da restringência da condição a ser tratada, e mecanismos para metabolismo ou remoção do(s) composto(s) activo(s) depois da administração.

O termo "quantidade eficaz" é usado aqui para se referir a uma quantidade da composição terapêutica (por exemplo, uma composição que compreende um miARN ou um vector que codifica o miARN) 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 activos numa composição terapêutica do assunto presentemente divulgado podem ser variados de forma a administrar uma quantidade do(s) composto(s) activo(s) que seja eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um indivíduo e/ou aplicação particular. O nível de dosagem irá depender da variedade de factores incluindo a actividade da composição terapêutica, formulação, via de administração, combinação com outras drogas ou tratamentos, restringência da condição que está a ser tratada, e da condição física e história médica anterior do indivíduo que está a ser tratado. Preferivelmente, a dose mínima é administrada, e a dose é gradativamente aumentada na ausência de toxicidade limitada por dose a uma quantidade minimamente eficaz. A determinação e ajuste de uma dose eficaz, assim como a avaliação de quando e como fazer tais ajustes, estão inseridos na habilidade ordinária 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, os peritos poderão avaliar que os seguintes Exemplos são alvos para serem exemplares apenas e que numerosas mudanças, modificações, e alterações podem ser utilizadas sem se afastar do âmbito do assunto presentemente divulgado.

#### EXEMPLO 1

A fim de compreender o envolvimento dos microARNs (miARNs) na proliferação e diferenciação de músculo esquelético, analisou-se a expressão dos miARNs durante a diferenciação do músculo esquelético usando-se a análise de

microarranjos estabelecida<sup>9</sup>. Escolheu-se usar mioblastos C<sub>2</sub>C12 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 de cultura<sup>10-12</sup>. Descobriu-se que a expressão de uma fração dos miARNs 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 foi confirmada por análise de Northern blot (Figura 1b e Figura 7).

#### EXEMPLO 2

miR-1 e miR-133 são especificamente expressos em tecido cardíaco de adulto e tecidos do músculo esquelético, mas não em outros tecidos testados (Figura 1C, Figura 8). Entretanto, pouco é conhecido sobre a distribuição temporal e espacial de miARNs específicos durante o desenvolvimento de mamíferos. Examinou-se portanto a expressão do miR-1 e miR-133 em embriões e recém-nascidos de ratinhos. MiR-1 e miR-133 são expressos a níveis 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 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 miARNs é expressa relativamente tarde durante a embriogénese<sup>16</sup>.

#### EXEMPLO 3

Tanto o miR-1 como o miR-133 estão agrupados (*clustered*) nos cromossomos 2 (separados POR 9,3 kb) e 18

(separados por 2,5 kb) de ratinho (Figura 9 e referência 14). Executou-se uma análise de Northern blot usando-se marcadores genómicos de ~300 pb incluindo as sequências de miR-1 e miR-133 (Figuras 9a-9e). Os marcadores de miR-1 e miR-133 do cromossoma 18 detectaram uma única transcrição primária de ~6 kb dos ARNs 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 marcadores tanto de miR-1 quanto de miR-133 do cromossoma 2 detectaram uma transcrição de ~10 kb do músculo do coração e esquelético, o marcador de miR-133 também se hibridou a duas transcrições adicionais de ~4,5 kb e ~2,2 kb, enquanto o marcador de miR-1 também detectou uma maior transcrição 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.

#### EXEMPLO 4

Considerou-se que os elementos reguladores que controlam a transcrição dos aglomerados (*clusters*) de miR-1 e miR-133 no cromossoma 2 e 18 são provavelmente conservados. Portanto, executou-se uma análise da sequência e identificou-se uma região altamente conservada (~2kb), que está situada a aproximadamente 5 kb a montante dos aglomerados de miR-1/133 em ambos os cromossomas 2 e 18 (Figura 10). Quando este fragmento genómico do cromossoma 2 foi usado para direcionar a expressão de um gene repórter dsRed em *Xenopus* transgénico, descobriu-se a 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 sobre-expressar miR-1 e miR-133 em células de mamíferos. Testou-se e validou-se a expressão e actividade de ambos os miARNs usando-se análise de Northern blot assim como os "sensores"<sup>17</sup> de miR-1 e miR-133, em que as sequências complementares para miR-1 ou miR-133 foram clonadas a jusante de uma sequência codificadora dsRed (Figura 11 e dados não mostrados). Transfectou-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 para o meio de diferenciação (DM) após a transfeção. MiR-1 aumentou fortemente a miogénesis conforme indicado pela expressão aumentada de cadeia pesada de miosina e miogenina de marcadores miogénicos iniciais e posteriores (MHC), respectivamente, assim como outros marcadores miogénicos, incluindo MyoD, Mef2 e  $\alpha$ -actina esquelética (Figuras 2a-2e, 2i, 2j e Quadro 2). MiR-1 induziu a expressão do gene do marcador miogénico em células mantidas em condição de crescimento de log-fase (Figura 2c) e em condição de diferenciação (Figuras 2, 2d e 2e). A diferenciação miogénica acelerada induzida por miR-1 é também acompanhada por um decréscimo na proliferação celular, conforme sinalizado por uma diminuição significativa na expressão de fosfo-histona H3 (Figuras 2, 2c, 2e e Quadro 2). De significação particular, a miogénesis induzida por miR-1 é específica, uma vez que a sobre-expressão de um controlo de GFP ou miR-208, que não é endogenamente expresso em miócitos esqueléticos, não mostrou nenhum efeito (Figuras 2a-2e). Além disso, as mutações introduzidas nas sequências "semente" de miR-1 anularam sua capacidade de activar a expressão do gene miogénico (Figuras 2d-2e). Contrariamente, a sobre-expressão de miR-133 reprimiu a expressão da miogenina e

MHC (Figura 2, a-e e Quadro 2) e promoveu a proliferação de mioblasto (Figuras 2c-2e e Quadro 2). Novamente, o efeito de miR-133 na proliferação de mioblastos é específica, uma vez que os controlos não mostraram nenhum efeito e a mutação introduzida anulou a função de miR-133 (Figuras 2a-2e, 2j).

## Quadro 2

**Efeito na proliferação e diferenciação miogénica por sobre-expressão e silenciamento de miR-1 e miR-133**

Tratamento	DM (8 h)		DM (12 h)				DM (24 h)				relação	
	Células	Em										
	positivas	relação	positivas	relação	positivas	relação	positivas	relação	positivas	ao	ao	
	em	ao	em	ao	em	Fosfo	em	ao	em	Fosfo	ao	
	miogenina	controlo	miogenina	controlo	-H3	controlo	miogenina	controlo	-H3	controlo	MHC	
											controlo	
GFP	172	100%	93	100%	135	100%	118	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-133	205	140,4%	211	145,5%	107	62,2%	498	143,1%	191	92,3%	44	200%

Executou-se a experiência recíproca onde se fez a transfeção dos mioblastos C2C12 com os oligos inibitórios antisense de 2'-o-metil de miR-1 ou miR-133 (ou GFP de controlo e miR-208), que mostraram inibir a função dos miARNs<sup>18,19</sup>. As células transfectadas com o inibidor de miR-1 apresentaram inibição de miogénesis e promoção da proliferação de mioblasto, conforme indicado por um decréscimo nos marcadores miogénicos e um aumento em fosfohistona H3 (Figuras 2f-2i e Quadro 2). Consistente com a 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 miogénesis foi aumentada e a proliferação celular reprimida (Figuras 2f-2j e Quadro 2). Contrariamente, os inibidores de 2'-o-metil de controlo não 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.

#### 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 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 estruturas anteriores e um aumento no tamanho do corpo ao longo do eixo dorsal-ventral comparado ou aos controlos não injectados ou injectados com miGFP (n > 45, dois experiências independentes) (Figura 3). Embora os somitos

formados nos embriões injectados com miR-1 (Figura 3), coloração 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, coloração de tropomiosina (Figuras 3f, 3j) e coloração de actina cardíaca. Além destes efeitos, há um decréscimo dramático na coloração de fosfohistona H3 (Figuras 3l-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 frequentemente 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). Colectivamente, estes dados sugerem que o tempo correcto 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 locais de miR-1 sabido como de ocorrência natural em sua UTR 3', que são evolucionariamente conservados entre as espécies dos vertebrados (Figura 12). Similarmente, dois locais de ligação de miR-133 conservados são encontrados na UTR 3' do gene SRF de mamífero (Figura 12), que mostraram executar um importante papel na proliferação e diferenciação muscular *in vitro* e *in vivo*<sup>11,24,25</sup>.

Fusionou-se as UTRs 3' de SRF e HDAC4 de ratinho a um gene repórter de luciferase e transfecção foi realizada dentro de células de mamífero. A sobre-expressão 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 sequências de "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 actividade da luciferase medida antes e após a indução da diferenciação celular, descobriu-se que a actividade 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 endógenos foram monitorados pelo "sensor" de miARN (Figura 11). Contrariamente, a actividade da luciferase do repórter MCK-luc, um indicador de diferenciação de músculo, foi aumentada nos miócitos diferenciados (Figura 4b). Além disso, a sobre-expressão de miR-1 levou à regulação negativa da proteína HDAC4 endógena nas células C2C12 tanto na 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 miARNs (Figura 4d), sustentando a ideia de que miARNs reprimem a função de seus genes alvo principalmente através da inibição da tradução. Quando os oligos de 2'-o-metil-antisense contra miR-1 ou miR-133 foram aplicados, eles abrandaram a repressão exercida nos níveis de proteína de HDAC4 ou SRF, respectivamente (Figura 4g), com nenhum efeito nos seus níveis de ARNm (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 plasmídeos de expressão para SRF ou HDAC4 poderão "suprimir" a miogénesis mediada por miARN. Realmente, conforme mostrado na Figura 4h, a sobre-expressão de SRF reverteu parcialmente a repressão do gene miogénico induzido por miR-133. Contrariamente, o HDAC4 agiu contra os efeitos de miR-1 na expressão do gene do músculo 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 de regulação negativa em células C2C12 diferenciadas, com um aumento concomitante na expressão de marcadores de diferenciação miogénicos 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 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 efeitos reguladores daqueles miARNs 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 controlo da proliferação e diferenciação de músculo esquelético. De importância, descobriu-se que o miR-1 e o miR-133, que estão aglomerados no mesmo loci cromossómico e transcritos juntos como uma transcrição única, tornaram-se dois miARNs maduros e independentes com funções biológicas

distintas alcançadas pela inibição de diferentes genes alvos. Isto implica no envolvimento de miARNs em mecanismos moleculares complexos. De forma interessante, enquanto a expressão tecido específica de miR-1 e miR-133 é controlada por myoD e SRF<sup>8</sup>, a expressão de SRF é reprimida por miR-133. Portanto, estas descobertas revelam um ciclo regulador negativo em que os miARNs participam nas vias 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

ARN total foi isolado de células C2C12 postas em cultura em meio de crescimento (GM) que consiste em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) ou meio de diferenciação (DM) que consiste em DMEM (Sigma) com soro de cavalo 2% (Sigma) em diferentes momentos (dias 0, 1, 3 e 5 com o primeiro dia de transferência em DM contacto como dia 0). A hibridação microarranjo foi executada e os dados foram analisados conforme descrito<sup>9</sup>. Resumidamente, 2,5 ug de ARN isolado foi marcado com 5'-fosfato-citidil-uridil-ci3-3' (Dharmacon, Inc., Lafayette, Colorado, EUA) usando-se ARN ligase e hibridado com mistura 0,5 mM de provas de oligonucleótido para 124 microARNs marcados com ALEXA 647® (Ci5) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) em câmaras descartáveis (MJ Research, Reno, Nevada, EUA; 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. O intervalo de sinal era de -4 vezes a +4 vezes. Amarelo denota alta expressão e azul denota baixa expressão, em relação ao valor médio.

Análise de Northern blot

O ARN total foi extraído de células C2C12, tecido adulto ou embrionário de ratinho usando-se Reagente TRIZOL® (Invitrogen). Para a análise de Northern blot de miARN, PG foi aplicado para remover ARNs de tamanho grande. Resumidamente, 30 µg de cada amostra de ARN total foram misturadas 1:1 com solução de PEG 5X e colocados em gelo durante 10 minutos. Após 10 minutos, centrifugou-se a uma velocidade máxima de 4°C, o sobrenadante foi transferido a um tubo novo. Os ARNs foram então precipitados adicionando-se 2,5 volumes de EtoH 100% e centrifugado durante 30 minutos à velocidade máxima. A análise de Northern blot para miARNs foi executada conforme descrito<sup>13</sup>. Sequências de oligonucleótido de miR-1 e miR-133 usadas como marcadores estão listadas no Quadro 3. A análise de Northern blot foi usada para detectar as transcrições primárias de miARNs e foi executada conforme descrito<sup>26</sup>, usando-se 20 µg de ARN total de cada amostra. Fragmentos genómicos para miR-1 e miR-133 foram clonados por PCR e servem como marcadores.

**Quadro 3****Sequências de Oligonucleótidos Aqui Divulgadas**

<b>Nome</b>	<b>Sequência</b>
Sonda de miR-1	TACATACTTCTTACATTCCA
Sonda de miR-133	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAA
miR-133a-1	deCATGTGACCCCTCACACACA
regulação positiva	
miR-133a-1	deACAAGGGGAGCCTGGATCCC
regulação negativa	
miR-133a-2	deGGACATATGCCTAACACAGTGA
regulação positiva	
miR-133a-2	deGAAACATCTTATCCAGTT
regulação negativa	
miR-1-2 de regulação	AGACTGAGACACAGGCGACACC
positiva	
miR-1-2 de regulação	TGCCGGTCCATCGGTCCATTGC
negativa	
miR-1-1 de regulação	CACTGGATCCATTACTCTTC
positiva	
miR-1-I de regulação	TTGGAATGGGCTGTTAGTA
negativa	
miR-1mut de regulação	TGAACATTCACTGCTATAAGAAGTATGTATTTGGG
positiva	TAGGTA
miR-1mut de regulação	TACCTACCCAAMTACATACTCTTATAGCACTGAAT
negativa	GTTCA
miR-133mut	deAATCGCCTTTCAATGGATrTGTCAACCAGCTGTAGC
regulação positiva	TATGCATTGAT
miR-133mut	deATCMTGCATAGCTACAGCTGGTTGACAAATCCATTGA
regulação negativa	AGAGGCGATT
Dúplice de miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA

(continuação)

<b>Nome</b>	<b>Seqüência</b>
Dúplice de miR-1-mut	CAUACUUCUUUACAUUCCAUA UUAACCAUAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUAUGGUUMUA
Dúplice de miR-133	UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGGGGACCAAAU
Dúplice de miR-133-mut	UCAAGUAACUUCAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGUUACUUGAAU
Dúplice de miR-208	AUMGACGAGCAAAAGCUUGU AAGCUUUUUGCUCGUCUUUAAC
Duplic de GFP	AACUUCAGGGUCAGCUUGCCUU GGCAAGCUGACCCUGAAGUUGG
2'-O-metil-miR-1	AAAUAACAUACUUUUACAUUCCAUAAGC
2'-O-metil-miR-133	AGCUACAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAUCCA
2'-O-metil-miR-208	GACCAACAAGCUUUUUGCUCGUCUUUAACGUG
2'-O-metil-GFP	AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
HDAC4-UTR	de CAGCACTGGTGTAGACTTGG
regulação positiva	
HDAC4-UTR	de CTTAAGAATAAGTTCAATAAGAC
regulação negativa	
SRF-UTR de regulação positiva	AGATATGGGGCTTGTGCC
SRF-UTR de regulação negativa	CTGGGAGAAAGGGGGTAGAC
Miogenina F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC
Miogenina R	TGGACAATGaCAGGGGTCCC
Miod F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC
Miod R	TGCAGTCGATCTCTCAAAGCACC
a-actina F	CAGAGCAAGCGAGGTATCC
Esquelética	
a-actina R	GTCCCCAGAATCCMCACG
Esquelética	
MEF2D F	CAAGCTGTTCCAGTATGCCAG

(continuação)

<b>Nome</b>	<b>Seqüência</b>
MEF2D R	AAGGGATGATGTCACCAGGG
HDAC4 F	GAGAGAATTCTGCTAGCAATGAGCTCCAA

Clonagem e Expressão de miR-1 e miR-133

Os fragmentos genómicos para os precursores de miR-1 e miR-133 de cromossomas de ratinho 2 e 18 (ch 2 e ch 8) foram amplificados por PCR usando-se ADN genómico de ratinho como um modelo (para iniciadores de PCR, veja-se Quadro 3 acima). Os produtos de PCR foram clonados no vector pCDNA™(+)3.1 (Invitrogen) e a expressão de miARNs foi determinada transfecção os vectores de expressão dentro de células de mamífero (C0S7, 10T1/2 ou C2C12) e fez-se a detecção por análise de Northern blot.

Cultura de célula, diferenciação de miogénesis *in vitro* e ensaio repórter de luciferase

As células dos mioblastos C2C12 foram colocadas em cultura e a miogénesis foi induzida conforme descrito<sup>12</sup>. Os ensaios repórteres de luciferase de transfecção transitória foram executados conforme descrito<sup>12,26</sup>. Os dúplices de miARN e oligorribonucleótidos antissense de 2'-o-metil para miR-1, miR-133, miR-208 e GFP foram adquiridos a partir de Dharmacon (Veja-se Quadro 3 para sequências). Eles foram introduzidos em células de mamífero usando-se ou transfecção com LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen) (200 nM) ou electroporação usando-se o sistema NUCLEOFECTOR® (5 µg) de Amaxa Biosystems (Gaithersburg, Maryland, EUA).

Para a construção repórter de luciferase-UTR 3', o local de clonagem múltipla do vector pGL3-Controlo (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) foi removido e colocado

a jusante do gene de luciferase. UTRs 3' para HDAC4 e SRF de ratinho foram amplificados por PCR e clonados no Vector pGL3-Controlo modificado para resultar nas construções SRF-3'UTR e HDAC4-3'UTR (veja-se Quadro 3 para sequências iniciadoras de PCR). Os ensaios repórteres de luciferase foram executados conforme descrito<sup>26</sup>.

#### Western blot e imunocoloração

Western blot foram executadas conforme descrito previamente<sup>27</sup>. Os seguintes anticorpos foram usados: anti-miogenina, SRF, MEF2, HDAC4 e  $\beta$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, EUA); e fosfohistona H3 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York, EUA). O anticorpo MF20, que reconhece o MHC específico a músculo estriado, foi obtido de DSHB (University of Iowa, Iowa City, Iowa, EUA).

Para imunocoloração, a célula C2C12 tratada em placas de 12 poços foi fixada com formaldeído 4% durante 5 minutos a 37°C e mudou-se para solução de NP40/PBS 0,1% durante 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Anticorpos primários foram incubados em NP40-PBS 0,1% com BSA 3% durante 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-ratinho/coelho conjugados à fluoresceína (diluição de 1:100, Vector Laboratories, Burlingame, Califórnia, EUA) foram adicionados em NP40-PBS 0,1% com BSA 3% durante 1 hora a 37°C. DAPI foi adicionado durante 5 minutos a TA. Após várias lavagens com PBS, as células foram submetidas à observação por microscopia de fluorescência. Os campos que cobre a cavidade inteira foram seleccionados e células positivas de fluorescência verde e células totais com coloração DAPI foram contadas para cada poço,

respectivamente.

#### Análises por RT-PCR

RT-PCR foi executada essencialmente conforme descrito<sup>27</sup>. ARN total foi extraído de células C2C12 usando-se reagente TRIZOL® (Invitrogen), e alíquotas de 2,0 µg foram transcritas de forma reversa a ADNc usando-se hexámeros aleatórios e transcriptase reversa MMLV (Invitrogen). Para cada caso, união de ADNc 2,5% foi usada para a amplificação e PCR foi executada durante 24-48 ciclos. As sequências para iniciadores de PCR podem ser encontradas no Quadro 3.

#### Injecções de embrião *Xenopus* e transgénese

Métodos padrões foram utilizados na obtenção e cultura de embriões de *Xenopus laevis*. As construções de ADN foram linearizadas com Kpn I e embriões transgénicos foram gerados de acordo com os métodos descritos por Kroll & Amaya<sup>28</sup>. A expressão do transgene foi analisada sob um microscópio Leica MZFLIII. A preparação e injecção de *Xenopus* com miARNs foi executada essencialmente conforme previamente descrito<sup>29</sup>. Entretanto, ARN não foi coberto antes da injecção. Análise imunohistológica integral foi executada conforme descrito<sup>30</sup>.

Os Exemplos 8-12 não estão sob o âmbito da invenção e são incluídos somente por razões comparativas.

#### EXEMPLO 8

miR-208 é um miARN específico a músculo cardíaco conservado entre humano, ratinho 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 ratinho escalonado e marcado com sonda radiomarcada complementar a miR-208. Os níveis de miR-208 foram dramaticamente maiores no coração de ratinho adulto em relação a E13.5, E16.5, e corações em estágio neonatal. miR-208 é hospedado por um intrão do gene de cadeia pesada de  $\alpha$ -miosina ( $\alpha$ -MHC) de músculo cardíaco (Figura 14). Uma das duas isoformas pesadas de miosina cardíaca,  $\alpha$ -MHC é fracamente expressa durante o desenvolvimento do ratinho mas depois torna-se a isoforma predominante no coração do ratinho adulto. miR-208 e  $\alpha$ -MHC são ambos específicos a coração e transcritos a partir da cadeia reverso, que sugere que miR-208 é processado do intrão  $\alpha$ -MHC é expresso paralelo a uma transcrição de  $\alpha$ -MHC.

#### EXEMPLO 9

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 electrofisiológicas de células cardíacas. Os cardiomiócitos neonatais não perdem sua capacidade de replicar após o nascimento, uma grande fracção passa por divisão mitótica e prolifera-se *in vitro* e *in vivo* onde a expressão do gene cardíaco é também activada. É provável que o miR-208 promova a diferenciação de cardiomiócito uma vez que ela é expressa 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 cardiogénesis.

### 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 económica em relação a todos os estudos de animal, confiável e permite um amplo espectro de experiências. Por razões económicas e técnicas, os cardiomiócitos são mais comumente isolados de ratos neonatais. Isolou-se cardiomiócitos de rato essencialmente como previamente descrito, com menores modificações<sup>86</sup>.

MiARNs maduros funcionais podem ser ectopicamente expressos usando-se uma sequência promotora Pol II de ARN para direcionar a transcrição da sequência precursora de miARN mais ~150 nucleótidos flanqueadores. As transcrições de ARN resultantes são reconhecidas pelo mecanismo de processamento de miARN e tornam-se miARNs completamente funcionais capazes de direcionar a repressão traducional.

Amplificou-se por PCR a sequência precursora de miR-208 e as regiões flanqueadoras do ADN genómico de ratinho e inseriu-se este fragmento num vector 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 sobre-expressão 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 afectam a

proliferação. Os cardiomiócitos são colocados em placa a baixa densidade e infectados com Ad-208. Embora o adenovírus tenha sido usados 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-2 08 para controlar os efeitos indirectos 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 contadas 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 teste t de Student 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 teste t de Student pareado pode determinar a probabilidade de que o número médio de células contado para 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 estudos para determinar o índice mitótico utilizando anticorpos de fosfohistona H3 e para determinar o percentual de células que passa pela síntese de ADN pela incorporação de BrdU. Células fixas são manchadas com TÚNEL para excluir a possibilidade de que a sobre-expressão de 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 proliferação do cardiomiócito em relação aos controlos uma vez que o miR-208 é normalmente altamente expresso em cardiomiócitos adultos diferenciados.

Um conjunto de factores de transcrição cardíaca, incluindo Nkx2.5, MEF2C, GATA4, miocardina e TBX5 mostrou ser expresso em cardiomiócitos de diferenciação inicial, tornando-os marcadores genéticos iniciais de diferenciação cardíaca. As proteínas contráteis específicas a músculo cardíaco, tais como  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC,  $\alpha$ -CA e MLV2V, são marcadores de diferenciação terminal de cardiomiócitos. Alguns destes genes cardíacos são regulados de forma diferencial durante o desenvolvimento. Por exemplo,  $\beta$ -MHC é altamente expresso em coração embriônico, mas torna-se regulado de regulação negativa de forma pós-neonatal, enquanto que  $\alpha$ -MHC possui um padrão de expressão oposto. A fim de 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 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) semi-quantitativos, os níveis de transcrição de ARNm relativos de vários genes marcadores cardíacos em cardiomiócitos de rato neonatal infectados com Ad-208 versus Ad-GFP são analisados. As bibliotecas de ADNC são feitas de ARN isolado de cardiomiócitos infectados por técnicas convencionais. GAPDH, que é expressa altamente em

quase todos os tecidos, é amplificada e usada para normalizar os níveis de ADNc. Todos os conjuntos de iniciador de PCR são projectados para amplificar o produto que transpõe um ou mais intrões, que irá produzir um produto amplificado por PCR maior se a contaminação de ADN está presente. Adicionalmente, anticorpos disponíveis 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 ARNm.

Além de estudar os efeitos de miR-208 sob expressão do gene cardíaco, quaisquer efeitos sob localização de várias proteínas cardíacas, incluindo factores de transcrição e componentes estruturais são determinados. A observação de cardiomiócitos infectados com Ad-208 sugere que estas 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 fixados em lamínulas de vidro, marcados com anticorpos primários e secundários apropriados, tingidos no núcleo, e montados em lâminas para análise microscópica.

#### Inactivação de miR-208

Paralelamente aos estudos de sobre-expressão de miR-208, os efeitos da inibição de miR-208 usando-se 2'-o-metiloligonucleótidos antisense a miR-208 são estudados. Os 2'-o-metiloligonucleótidos atuam como inibidores específicos a sequência e irreversíveis da função de miARN de uma forma estequiométrica. Este sistema de inibição de

miARN é adaptado aos cardiomiócitos. 2'-o-metiloligonucleótidos antissense de miR-208 ou, em controlos, 2'-o-metiloligonucleótidos aleatórios são transfectados em cardiomiócitos por um reagente lipídico catiónico, ou alternativamente por electroporação. Uma construção repórter com uma sequência de miR-208 antissense ligada directamente em 3' ao gene de luciferase (luc-miR-208-sensor) é usada como um controlo e para testar a eficácia do sistema em bloquear a função do miR-208. Os níveis de ARNm e proteína, assim como a localização da proteína, são estudados conforme descrito para os estudos de sobre-expressão de miR-208.

#### EXEMPLO 10

O miR-208 é fracamente expresso no coração embriónico 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 expresso fracamente no embrião. Contra este argumento, a dosagem de miR-208 adequada pode ser importante para regular certas vias genéticas durante o desenvolvimento. Além disso, o rato nocauteado de seu gene hospedeiro a-MHC, que é fracamente expresso durante o desenvolvimento em relação ao estágio adulto, sofreu de letalidade embriónica, embora não seja conhecido se a expressão do miR-208 é afectada naquele animal<sup>87</sup>. 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 rato nocauteado de miR-208 e um rato transgénico que

condicionalmente sobre-expressa miR-208.

#### Modelo de ratinho nocauteado de miR-208

Um ratinho funcionalmente inválido para miR-208 é designado e criado sem afectar a expressão de seu gene hospedeiro  $\alpha$ -MHC. A produção de célula estaminal embrionária derivada de ratinho nocauteado de miR-208 é um processo de três estágios: produção do vector alvo; introdução de sequências de ADN em células estaminais embrionárias por recombinação de homólogos e produção de ratinhos geneticamente modificados a partir de células estaminais embrionárias. Os miARNs relacionados estão agrupados em famílias com base na homologia de sequência dentro de suas 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 miARNs conhecidos numa árvore filogenética, tornando o miR-208 um candidato a nocaute de miARN adequado.

A construção que tem como alvo miR-208 é desenvolvida usando-se uma estratégia chamada de engenharia recombinogénica, que usa recombinação homóloga entre fragmentos de ADN lineares e plasmídeos circulares<sup>88,89</sup>. O plasmídeo circular pode conter um fragmento de 6-7 kb do gene  $\alpha$ -MHC em que o miR-208 está situado centralmente. O fragmento de ADN linear contém dois braços homólogos projectados para substituir a sequência de miR-208 de 22 nt com uma cassette de selecção "floxed". As bactérias transformadas com o plasmídeo circular são electroporadas com o fragmento de ADN linear, e subsequentemente, a resistência codificada pelo fragmento linear determina as colónias recombinantes. A construção resultante é usada para direcionar às células ES por recombinação homóloga.

Uma vez que a célula ES heterozigótica é identificada usando-se selecção baseada em PCR ou por coloração do Sul, ela é usada para gerar quimera por injecção de blastocisto. O modelo de nocaute presentemente divulgado deixa apenas uma pequena pegada de ADN exógeno no intrão de um  $\alpha$ -MHC e ajuda a assegurar que a transcrição de um  $\alpha$ -MHC ou o padrão de união de ARNm de  $\alpha$ -MHC permanece não afectado.

#### Modelo de ratinho transgénico condicional

A estratégia transgénica condicional é diagramada na Figura 17. O método transgénico condicional é um sistema binário que consiste em dois transgenes. Um transgene codifica miR-208 (tet208), enquanto o outro transgene codifica um transactivador (tTA) que activa o transgene de miR-208 através da ligação de uma sequência reguladora com seu promotor. A ligação de t TA 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 colónia de ratinho homozigótica para o transgene de miR-208 é estabelecida. Os ratinhos tet208 são acasalados com ratinhos transgénicos que abrigam um transgene tTA para criar transgénicos duplos para estudo. Assumindo a genética Mendeliana, 1 em 4 descendentes será transgénico duplo e expressa miR-208 sempre que tTA for expresso. Um promotor de  $\alpha$ -MHC é utilizado para direcionar a expressão de tTA. O promotor de  $\alpha$ -MHC foi bem caracterizado e é suficiente para direcionar adequadas a expressão específica a tecido no desenvolvimento inicial<sup>90</sup>. A utilização de um promotor de  $\alpha$ -MHC para expressar tTA aumentará a dosagem de miR-208 nos mesmos tecidos como miR-208 endógeno nos animais transgénicos duplos, uma vez que o miR-208 endógeno normalmente origina-se de um intrão dentro

do gene  $\alpha$ -MHC. Uma linha de ratinho transgénico que usa o promotor de  $\alpha$ -MHC de ratinho para direcccionar a expressão de t TA existe e foi usada de forma bem sucedida<sup>91,92</sup>. A linha de ratinho transgénico tet 208 permite o estudo dos efeitos da dosagem da expressão de miR-208 no embrião em desenvolvimento ou coração de ratinho adulto independentemente. Tipicamente, a letalidade embriónica inicial em iniciadores transgénicos 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 ratinho transgénico duplo onde a sobre-expressão 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 contractilidade que pode ser caracterizado por estudos electrofisiológicos.

### EXEMPLO 11

A identificação de alvos moleculares directos de miR-208 facilita a compreensão do mecanismo que fundamente sua função biológica. Prognósticos alvo são utilizados para

complementar observações relacionadas à investigação da função de miR-208 em modelos de ratinho *in vitro* e *in vivo*.

Sem desejar estar limitado pela teoria, criou-se uma hipótese de que a expressão de Thrap1 é regulada por miR-208. A UTR 3' de Thrap1 contém dois locais de ligação de miR-208 previstos (Figura 18). Os dois alvos estão localizados ~80 pb a jusante do codão de parada de Thrap1 e estão separados entre si por apenas ~50 pb. 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 hormona da tireoíde) que é ubiquitariamente expressa<sup>93</sup>. TRAP é um complexo de proteína de multisubunidade que é um coactivador para receptores nucleares. TRAP foi inicialmente caracterizada para receptor nuclear da hormona da tireoíde<sup>94</sup>. Thrap1 não foi caracterizado, mas defeitos em outras subunidades de TRAP mostraram afectar a sinalização do receptor nuclear. A ablação do gene de TRAP22 0 em ratinhos prejudicaram o desenvolvimento do sistema nervoso e do coração, enquanto que homólogos de *Drosophila* de TRAP23 0 e TRAP24 0 são exigidos para o desenvolvimento do disco olho-antena adequado<sup>95,96</sup>. Mutações num gene altamente similar a Thrap1, chamado de Thrap2, foram encontradas em pacientes com defeito do coração congénito, Transposition of the Great Arteries<sup>91</sup>. 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 a hormona da tireoíde exerce efeitos profundos na contractilidade cardíaca.

A hormona da tireoíde está ligada à troca da isoforma da miosina cardíaca. Em cardiomiócitos, a hormona da tireoíde causa um acúmulo rápido de  $\alpha$ -MHC ARNm enquanto

inibe simultaneamente a expressão de p-MHC<sup>98, 99</sup>. Vários elementos de resposta tireoidiana atuantes positivos (TREs) estão localizados no promotor de  $\alpha$ -MHC e um meio-TRE actuante negativo no promotor  $\beta$ -MHC foram identificados<sup>100, 101</sup>. Os genes  $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC estão dispostos em tandem no cromossoma 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 expressão de proteína afecta a contractilidade dos sarcómeros cardíacos;  $\alpha$ -MHC é "rápido" enquanto que p-MHC é "lento". Sua expressão é regulada de forma desenvolvida. Em rato,  $\beta$ -MHC é predominante na vida fetal posterior, mas imediatamente após o nascimento,  $\alpha$ -MHC torna-se a isoforma cardíaca adulta predominante. A transição é provavelmente causada pelo surto de hormona da tireoide circulante que ocorre imediatamente após o nascimento<sup>98</sup>. Em animais maiores, como coelhos e humanos,  $\alpha$ -MHC é a isoforma cardíaca adulta predominante. Entretanto, os promotores dos genes  $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC são altamente conservados entre rato e humano, sugerindo que eles são regulados de forma similar. Dada a origem de miR-208 a partir de um intrão de  $\alpha$ -MHC, e sem desejar estar preso pela teoria, é possível que o miR-208 actue como um inibidor específico a tecido da sinalização da hormona da tireoide num 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 rastreio inicial pergunta se a sobre-expressão de miR-208 regula de regulação negativa a expressão de um gene repórter portando supostos locais alvo em sua UTR 3'. Inseriu-se a Thrap1 UTR 3' directamente atrás da sequência codificadora de um gene repórter de luciferase expresso de forma constitutiva. Os resultados sugerem que miR-208 alveja Thrap1 UTR (Figura 18). Para

confirmar esta observação, mudou-se as regiões de semente de dois supostos locais alvo dentro de Thrap1 UTR, separadamente e em combinação. O polinucleótido mudado pode ser testado para determinar se eles podem aliviar a repressão mediada por miR-208.

Estudos prévios mostraram que o hormona tireoidiano activa de maneira transcricional a expressão da cadeia de  $\alpha$ -MHC e inibe a expressão de  $\beta$ -MHC em cardiomiócitos<sup>98, 99, 102</sup>. Os cardiomiócitos são infectados com Ad-208 para determinar se a expressão de miR-208 inibe a sinalização da hormona tireoidiano monitorando-se a transcrição e os níveis de proteína de um  $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC. A inibição da expressão de  $\alpha$ -MHC por miR-208 suportará indirectamente a hipótese de que o miR-208 alveja um componente da via de sinalização da hormona da tireóide.

Para também validar os alvos previstos, pode ser determinado se a expressão de miR-208 diminui os níveis de ARNm ou de proteína nos corações a partir de modelos de ratinho transgénico de miR-208 e nocaute de miR-208. Anticorpos específicos contra as proteínas alvo são utilizados. Thrap1 humano está comercialmente disponível. Se não for eficaz em estudos de ratinho, anticorpos específicos a Thrap1 de ratinho são desenvolvidos.

#### Alvos Candidatos Adicionais para miR-208

Além do Thrap1, clonou-se as UTR 3' de quatro outros alvos previstos de miR-208 de interesse directamente ao gene de luciferase para estudos repórteres. As UTR's 3' são de SP3 (factor 3 de transcrição trans-actuante Sp3), EYA4 (homólogo 4 ausente nos olhos), CSNK2A2 (caseína quinase 2, polipeptídeo alfa iniciador) e TTN (Titin).

A expressão da proteína SP3 é oposta à expressão de miR-208, SP3 é um factor de transcrição que interage com uma variedade de promotores contendo GC-Jboxes<sup>103,104,105</sup>. A proteína SP3 é facilmente detectada em corações do ratinho 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 sua ligação estabelecida à patologia no coração humano. As mutações foram identificadas em EYA4 humano que causam cardiomiopatia dilatada e falha associada do coração<sup>106,107</sup>. EYA4 é um coactivador transcricional que interage com os elementos da família sine-oculis (Six1-Six6) e factores de transcrição Dach levando à activação do gene<sup>108,109</sup>. 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 coração<sup>108</sup>. Actualmente, nenhum gene cardíaco potencial de EYA4 foi identificado.

CSNK2A2 é uma proteína serina/treonina quinase amplamente expressa que foi comprometida na replicação de ADN, regulação de transcrição basal e induzível, tradução e controlo de metabolismo<sup>110,111</sup>. Há interesse em CSKN2A2 por seu potencial na regulação de uma variedade de vias 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 expressa tanto em tecido do músculo cardíaco quanto em músculo esquelético e é importante para a montagem do sarcómero 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, a-MHC) possa focar a expressão de um outro (isto é, TTN) para ajustar as propriedades contrácteis 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 locais alvo previstos e para testar se a supressão de miR-208 é diminuída. Após a selecção repórter inicial dos alvos candidatos, os efeitos da sobre-expressão 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 é estudada *in vivo* usando-se os modelos de ratinho transgénico induzível 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 vias genéticas reguladas por miR-208 no coração.

#### EXEMPLO 12

Músculos esqueléticos são danificados e reparados repetidamente por toda a vida. A regeneração muscular mantém a função locomotora durante o 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 estaminais chamadas de células satélites localizadas entre a lâmina 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 miogénesis.

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

### Métodos

A cardiotoxina foi injectada em músculos tibiais anteriores (TA) de ratinhos C57BL/6 machos de seis semanas de vida de acordo com Yan *et al*<sup>114</sup>. Os músculos foram colhidos 3 dias após a injeção. Músculos TA não injectados foram usados como controlo. ARN total foi extraído do músculo TA e 5 µg foram usados para análise de microarranjo de microARNs.

### Resultados

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

Os dados de log normalizados (base 2) foram hierarquicamente aglomerados pelo gene e são colocados em gráfico como um mapa de calor. O intervalo 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. A Figura 20A mostra miARNs que são regulados de regulação negativa em músculo danificado e a Figura 20B mostra miARNs que são regulados de regulação

positiva 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 células precursoras do músculo esquelético adulto. Evidência recente sustenta a noção de que as células satélites são heterogéneas e possuem potencial semelhante à célula estaminal. Estas células são mantidas num estado quiescente, mas uma vez activadas, irão se proliferar extensivamente para formar um conjunto de mioblastos que irão se diferenciar e regenerar ou reparar o tecido muscular.

As vias genéticas e mecanismos moleculares que mantêm as células satélites em seu estado quiescente inactivo sob condições normais, assim como a maneira pela qual eles se tornam activados em resposta ao lesão muscular para facilitar a regeneração muscular estão começando a ser reveladas. Pax3 e Pax7, membros de uma família de factores de transcrição box pareados/homeodomínio, demonstraram 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 activação da célula satélite. De maneira intrigante, a expressão de Pax3 e Pax7 é regulada de regulação negativa na diferenciação de mioblastos. De maneira mais importante, a sobre-expressão ectópica de Pax3 ou Pax7 em mioblastos C2C12 bloqueia sua diferenciação. Estas observações sugerem que o status de aquiescência da

célula satélite e a auto-renovação assim como a proliferação e diferenciação de mioblastos está sob controlo transcripcional e pós-transcripcional rígido.

Além disso, o factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) é expresso nas células satélites de músculo esquelético e inibe a diferenciação miogénica. Foi descoberto e é agora divulgado no presente documento 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.

#### Sobre-expressão de miARN estabelecida e sistema de detecção em células satélites

A fim de sobre-expressar de forma eficiente os miARNs em células satélites ectopicamente, um sistema de sobre-expressão com base retroviral foi adaptado. As sequências genómicas que flanqueiam miR-1 e miR-206 (em torno de 300-400 pb) são flanqueadas com um dador de splice (SD) e um acceptor de splice (SA) dentro de um vector de retrovírus derivado de vírus de célula estaminal de murina (MSCV) em que uma sequência codificadora de proteína fluorescente verde (GFP) é localizada a jusante da sequência de miARN-SDSA. Desta forma, ambos miR-1/206 e GFP serão expressos simultaneamente e a expressão de GFP servirá como uma excelente indicação da expressão de miR- 1/206 (Figura 23) .

A fim de monitorar a expressão e o efeito inibidor de miARNs em células satélites, criou-se um "sensor de miARN" em que a expressão de um gene dsRed está sob controlo transcripcional de um promotor CMV activo de forma constitutiva. A sequência complementar do miR-1/206 estava ligada à 3' de um gene repórter dsRed e inserida num vector

de retrovírus derivado de MSCV de forma que um miARN 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 miARN em células satélites, que fornece ferramentas poderosas para também estudar a função de miARNs no músculo esquelético.

Pax7 e BDNF são alvos reguladores de miR-1/2 06 em células satélites

Descobriu-se que os genes Pax7 e BDNF contêm locais alvo de miR-1/206 altamente conservados em suas UTRs 3' (Figuras 24, 25 e 26). Estas sequências UTR 3' foram clonadas num repórter de luciferase e foi testado se elas podem ser reprimidas pelos miARNs. Conforme mostrado na Figura 24, tanto miR-1 quanto miR-206 reprimem potencialmente estes repórteres. A repressão mediada por miARN é anulada quando as sequências de ligação de miARN conservadas foram mudadas, indicando a especificidade da repressão. Estes dados sugerem que miR-1/2 06 podem controlar a proliferação e diferenciação das células 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 respondedoras ao desenvolvimento pós-natal e regeneração. Sem desejar estar limitado pela teoria, há a hipótese de que os miARNs 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 ratinhos 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 num 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 factor de crescimento bFGF, imitam exactamente 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 ratinhos adultos são plaqueadas em placas de cultura de tecido de 24 poços e miR-1/206 é introduzido nas células usando-se um retrovírus baseado no vector SDSA. A expressão e actividade de miARNs expressos ectopicamente são monitoradas de várias formas: Análise da coloração no Norte foi aplicada para detectar e medir quantitativamente a expressão de miR-1. A actividade de miR-1/206 é também monitorada usando-se repórteres "sensores" em que a sequência complementar para miR-1/206 é clonada na região 3' em direcção a um gene repórter dsRed.

Para os ensaios de proliferação, a cultura de célula satélite foi marcada com BrdU 1 hora 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 sobre-expressão de 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 poços revestidas com colagénio em DMEM adicionado com FBS 20% e 10 ng/mL de bFGF. As células foram plaqueadas a uma densidade em torno de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> e infectadas com retrovírus de miR-1/206 ou retrovírus de controlo. Uma vez que o bFGF é removido do meio de cultura, as células satélite sairão espontaneamente do ciclo celular e se diferenciarão. Conforme mostrado nas Figuras 28 e 29, a sobre-expressão 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 no controlo 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 são importantes para regeneração do músculo esquelético (Figura 30).

### Referências

As referências listadas abaixo assim como todos as referências citadas na memória descriptiva estão no presente documento incorporadas por referência à extensão em que suplementam, explicam, fornecem uma fundamentação para ou ensinam metodologia, técnicas e/ou composições utilizadas no presente documento.

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

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. et al, A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-33 (2005).

7. Giraldez, A.J. et al, 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 (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. et al, Plasticity of the differentiated state. *Science* 230, 758-66 (1985).

11. Soulez, M. et al, 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. 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 (2001).
14. Lagos-Quintana, M. et al, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-9 (2002).
15. Sempere, L. F. et al, Expression profiling of 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. et al, MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310-1 (2005).
17. Mansfield, J. H. et al, MicroRNA-responsedore '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 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).
20. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. e Burge, C. B., Prediction of mammalian microRNA targets. *Ceil* 115, 787-98 (2003).

21. Kiriakidou, M. *et al*, A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165-78 (2004).
22. Krek, A. *et al*, Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500 (2005).
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. *et al*, Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 97-105 (2002).
25. Li, S. *et al*, 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).
26. Wang, D. *et al*, Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-62 (2001).
27. Cao, D. *et al*, 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 transplants reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173-83 (1996).

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, 2421-35 (1996).
30. Brown, D. D. et al, Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development* 132, 553-63 (2005).
31. Freier et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9373-9377.
32. Turner et al, (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.
36. Ausubel et al, ed. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, New York, Estados Unidos da América.
37. Altschul et al, (1990) *J Mol Biol* 215:403-410.
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<sup>a</sup> 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.
42. Tijssen, (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes. Elsevier, New York, Estados Unidos da América.
43. Tibanyenda *et al*, (1984) Eur J Biochem 13 9:19-27.
44. Ebel *et al*, (1992) Biochem 31:12083-12086.
45. Goeddel, (1990) Gene Expression Technology. Methods in Enzymology. Volume 185, Academic Press, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América.
46. Silhavy, (1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, Estados Unidos da América.
47. Glover e Hames, (1995) ADN Cloning: A Practical Approach. 2<sup>a</sup> ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York.
48. Adelman *et al*, (1983) ADN 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.
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 Pasquinelli, 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.

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.

55. Basyuk, 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.

57. Yi, R., Qin, Y., Maçara, I. G., e Cullen, B. R., (2003), Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3

016.

58. Yi, R., Doehle, B. P., Qin, Y., Maçara, 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., Maçara, 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 RNAM 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.
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., 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., (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., et al, (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.

76. Johnston, R. J., e Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845-849.

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 RNAm. *Science* 304, 594-

596.

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. et al, (2004), MicroRNA-respondedore '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.
81. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., e Burge, C. B., (2003), Prediction of mairunalian 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. *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. *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, 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.
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.
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 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 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 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. 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 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 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.

96. Xto, 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.

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.

98. Lompre, A. M., Nadai-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.

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 RNAm levels in rabbit heart. *Biochemistry* 23, 1596-1599.

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.

101. Subramaniam, A., Gulick, J., Neumann, J., Knotts, S., e Robbins, J., (1993), Transgenic analysis of the thyroid-respondedore 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), Spl-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 Spl 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., et al, (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., et al, (1999), EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. Hum Mol Genet 8, 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 12, 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': ADNC 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 *et al* (2003), *J. Biol. Chem.* 278(10), 8826-8836.

Será compreendido que vários pormenores do assunto presentemente divulgado podem ser modificados sem se afastar do âmbito do assunto presentemente divulgado. Além disso, a descrição acima possui propósito meramente ilustrativo, e não é para o propósito de limitação.

**LISTA DE SEQUÊNCIAS**

<110> University of North Carolina at Chapel Hill Wang, Da-Zhi Chen, Jianfu  
<120> MICROARNs QUE REGULAM A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIACÃO DE CÉLULAS MUSCULARES  
<130> 421-166 PCT  
<150> 60/749.544  
<151> 2005-12-12  
<160> 82  
<170> Patent In versão 3.3  
<210> 1  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 1  
uggaauguua agaaguaugu a 21  
<210>2  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 2  
uugguccccu ucaaccagcu gu 22  
<210>3  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 3  
uggaauguua ggaagugugu gg 22  
<210>4

<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 4  
auaagacgag caaaaagcuu gu 22  
<210>5  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 5  
aagcugccag uugaagaacu gu 22  
<210>6  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> y pode ser C ou U  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> y pode ser C ou U  
<400>6  
uucaaguaau ycaggauagg yu 22  
<210>7  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(10)  
<223> y pode ser C ou U  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> r pode ser G ou A  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> k pode ser G ou U  
<400> 7  
uagcaccauy ugaaaucrgu kuu 23  
<210>8  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(22)  
<223> y pode ser C ou U; k pode ser G ou U; w pode ser U ou A; m pode ser C ou A; s pode ser G ou C; h pode ser A, C, ou U; v pode ser G, A, ou C; n pode ser A, G, C, ou U; b pode ser C, G, ou U  
<400> 8  
ykuwmaswys shhswyuvnv vbc 23  
<210>9  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (22)..(22)  
<223> y pode ser C ou U  
<400>9  
ucacagugaa ccggucucuu uy 22  
<210> 10  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 10  
ugagaugaag cacuguagcu ca 22  
<210> 11  
<211> 24  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 11  
guccaguuuu cccagggaauc ccuu 24  
<210> 12  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 12  
uucaaguaau ccaggauagg c 21  
<210> 13  
<211> 22  
<212> ARN

<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 13  
uucaaguaau ucaggauagg uu 22  
<210> 14  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 14  
uagcaccauc ugaaaucggu u 21  
<210> 15  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 15  
uagcaccauu ugaaaucagu guu 23  
<210> 16  
<211> 20  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 16  
uagcaccauu ugaaaucggu 20  
<210> 17  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente

<400> 17  
cuuucagucg gauguuugca gc 22  
<210> 18  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 18  
uguaaacauc cuacacucag cu 22  
<210> 19  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 19  
uguaaacauc cuacacucuc agc 23  
<210> 20  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 20  
uguaaacauc cccgacugga ag 22  
<210> 21  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> miARN sintetizado artificialmente  
<400> 21  
cuuucagucg gauguuuaca g 2 1  
<210> 22

<211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> miARN sintetizado artificialmente  
 <400> 22  
 ucacagugaa ccggucucuu uu 22  
 <210> 23  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> miARN sintetizado artificialmente  
 <400> 23  
 ucacagugaa ccggucucuu uc 22  
 <210> 24  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
**tttttttttt tgatcagaac attcccttctt tactggtcac agccacgtgc tcattccatt** 60  
**ctt** 63  
 <210> 25  
 <211> 63  
 <212> ADN  
 <213> Pan troglodytes  
 <400> 25  
**tttttttttt tgatcagaac attcccttctt tactggtcac agccacgtgc tcattccatt** 60  
**ctt** 63  
 <210> 26  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 26  
**tgttttttcc ctcagaacat tccttcttca ctggtcacag ccacgtgctc attccatcct** 60  
**t** 61

<210> 27  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 27

---

**tgttttttc ctcagaacat tccttccttc ttcaactggtc ccagccacgt gtcattcca** 60

**tcctt** 65

<210> 28  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Canis familiaris  
 <400> 28

---

**gttttacttt tcgatcagaa cattccttct ttcaactggtc cagccatgtg ctcattccat** 60

**t** 61

<210> 29  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Gallus gallus  
 <400> 29

---

**tttttacttt cgatacggaa cattccttct ttcaactggtc cagccatgtg ttcattccat** 60

**tctt** 64

<210> 30  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 30

gctcctgggt tggagggAAC cac 23

<210> 31  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 31

tttagcttacc caatgggacc gt 22

<210> 32  
 <211> 26

<212> ADN  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 32  
 ggggctttg ggttgaaggg aaccac 26  
 <210> 33  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 33  
 ttagcttacc caatggacc gt 22  
 <210> 34  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 34

---

uuccuuugac gggugagcuu uuggccggg uuauaccuga cacucacqua uaagacgagc 60  
 aaaaagcuuug uuggucagag gag 83

<210> 35  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 35  
 uuccuuugac gggugagcuu uuggccggg uuauaccuga' cacucacqua uaagacgagc 60  
 aaaaagcuuug uuggucagag gag 83

---

<210> 36  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> Rattus rattus  
 <400> 36  
 uuccuuugac gggugagcuu uuggccggg uuauaccuga cucucacqua uaagacgagc 60  
 aaaaagcuuug uuggucagag gag 83

---

<210> 37  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 37	
ugacggggcga gcuuuuugcc cgguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag	60
cuuuguugguc a	71
<210> 38	
<211> 24	
<212> ARN	
<213> Homo sapiens	
<400> 38	
cuaaaaauua uguaaucguc uuaa 24	
<210> 39	
<211> 24	
<212> ARN	
<213> Mus musculus	
<400> 39	
cuaaaaauua uguaaucguc uuaa 24	
<210> 40	
<211> 32	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	
<400> 40	
acccaaatgca tcctcctcca cattccttgc tc 32	
<210> 41	
<211> 31	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	
<400> 41	
gtcccagcca agggagcaac attccaacgc t 31	
<210> 42	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Artificial	
<220>	
<223> sonda de miR-1	
<400> 42	
tacatacttc tttacattcc a 21	

<210> 43  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de miR-133  
<400> 43  
acagctggtt gaaggggacc aa 22  
<210> 44  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação positiva miR-133a-1  
<400> 44  
catgtgaccc ctcacacaca 20  
<210> 45  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação negativa miR-133a-1  
<400> 45  
acaaggggag cctggatccc 20  
<210> 46  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação positiva miR-133a-2  
<400> 46  
ggacatatgc ctaaacacgt ga 22  
<210> 47  
<211> 20  
<212> ADN

<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação negativa miR-133a-2-  
<400> 47  
gaaacatctt tatccagttt 20  
<210> 48  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação positiva miR-1-2-  
<400> 48  
agactgagac acaggcgaca cc 22  
<210> 49  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação negativa miR-1-2-  
<400> 49  
tgccggtcca tcggtccatt gc 22  
<210> 50  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação positiva miR-1-1-  
<400> 50  
cactggatcc attactcttc 20  
<210> 51  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação negativa miR-1-1-

<400> 51  
ttggaatggg gctgttagta 20  
<210> 52  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação positiva miR-1mut-  
<400> 52  
tgaacattca gtgctataaa gaagtatgta ttttggtag gta 43  
<210> 53  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação negativa miR-1mut-  
<400> 53  
tacccatcca aaatacatac ttctttatag cactgaatgt tca 43  
<210> 54  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação positiva miR-133mut-  
<400> 54  
aatcgccctct tcaatggatt tgtcaaccag ctgttagctat gcattgat 48  
<210> 55  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sonda de regulação negativa miR-133mut-  
<400> 55  
atcaatgcat agctacagct gggtgacaaa tccattgaag aggcgatt 48  
<210> 56

<211> 42  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> dúplice de miR-1 sintetizado artificialmente  
<400> 56  
uggaauguuaa agaaguaugu acauacuucu uuacauucca ua 42  
<210> 57  
<211> 42  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> dúplice de miR-1-mut sintetizado artificialmente  
<400> 57  
uuaaccauuaa agaaguaugu acauacuucu uuaugguuuaa ua 42  
<210> 58  
<211> 44  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> dúplice de miR-133 sintetizado artificialmente  
<400> 58  
uugguccccu ucaaccagcu guagcugguu gaaggggacc aaau 44  
<210> 64  
<211> 32  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> 2'-O-metil-miR-208 sintetizado artificialmente  
<400> 64  
gaccaacaag cuuuuugcuc guuuauacg ug 32  
<210> 65  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> 2'-O-metil-GFP sintetizado artificialmente  
<400> 65  
aaggcaagcu gaccuugaag uu 22  
<210> 66  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> HDAC4-UTR-de regulação positiva sintetizado  
artificialmente  
<400> 66  
cagcactgggt gatagacttg g 21  
<210> 67  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> HDAC4-UTR-de regulação negativa sintetizado  
artificialmente  
<400> 67  
cttaagaata agttcaataa gac 23  
<210> 68  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> SRF-UTR-de regulação positiva sintetizado  
artificialmente  
<400> 68  
agatatatgggg gcttgtgccc 20  
<210> 59  
<211> 44  
<212> ARN  
<213> Artificial

<220>  
<223> dúplice de miR-133-mut sintetizado artificialmente  
<400> 59  
ucaaguaacu ucaaccagcu guagcugguu gaaguuacuu gaau  
44  
<210> 60  
<211> 44  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> dúplice de miR-208 sintetizado artificialmente  
<400> 60  
auaagacgag caaaaagcuu guaagcuuuu ugcucgucuu auac 44  
<210>61  
<211> 44  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> dúplice de GFP sintetizado artificialmente  
<400> 61  
aacuucaggg ucagcuugcc uuggcaagcu gacccugaag uugg 44  
<210> 62  
<211> 28  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> 2'-O-metil-miR-1 sintetizado artificialmente  
<400> 62  
aaauacauac uucuuuacau uccauagc 28  
<210> 63  
<211> 31  
<212> ARN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> 2'-O-metil-miR-133 sintetizado artificialmente

<400> 63  
agcuacagcu gguugaaggg gaccaaaucc a 31  
<210> 69  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> SRF-UTR-de regulação negativa sintetizado  
artificialmente  
<400> 69  
ctgggagaaa gggggttagac 20  
<210> 70  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de Miogenina F PCR sintetizado  
artificialmente  
<400> 70  
tggagctgta tgagacatcc c 21  
<210> 71  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de Miogenina R PCR sintetizado  
artificialmente  
<400> 71  
tggacaatgc tcaggggtcc c 21  
<210> 72  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de MyoD F PCR sintetizado artificialmente

<400> 72  
gcaggctctg ctgcgcgacc 20  
<210> 73  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de MyoD R PCR sintetizado artificialmente  
<400> 73  
tgcaagtgcat ctctcaaagc acc 23  
<210> 74  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de actina-esquelética F PCR sintetizado  
artificialmente  
<400> 74  
cagagcaagc gaggtatcc 19  
<210> 75  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de actina-esquelética R PCR sintetizado  
artificialmente  
<400> 75  
gtccccagaa tccaaacacg 19  
<210> 76  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de MEF2D F PCR sintetizado artificialmente  
<400> 76

caagctgttc cagtatgcc a g 21  
<210> 77  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador de MEF2D R PCR sintetizado artificialmente  
<400> 77  
aaggatgat gtcaccagg 20  
<210> 78  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador HDAC4 F PCR sintetizado artificialmente  
<400> 78  
gagagaattc tgcttagaat gagctccaa 30  
<210> 79  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador HDAC4 R PCR sintetizado artificialmente  
<400> 79  
gagactcgag ctatgcagg tccaaaggca gtga 34  
<210> 80  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> iniciador SRF F PCR sintetizado artificialmente  
<400> 80  
gtccccatgc agtgatgtat g 21  
<210> 81  
<211> 20

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> iniciador SRF R PCR sintetizado artificialmente  
 <400> 81  
 gtagctcggt gaggttgctg 20  
 <210> 82  
 <211> 2620  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 82

<b>gagcaagttt</b>	<b>cactaggccc</b>	<b>acacagtatac</b>	<b>attgagcaact</b>	<b>gagcgtggaa</b>	<b>ggagacagat</b>	<b>60</b>
<b>gggccacgtt</b>	<b>tctcctccct</b>	<b>ctttctagcc</b>	<b>ttcccttctcc</b>	<b>ctcccttttc</b>	<b>ttatbacatta</b>	<b>120</b>
<b>tatcctggcg</b>	<b>gcagtttcc</b>	<b>ctccctccac</b>	<b>tcctcccagt</b>	<b>tccttcccca</b>	<b>cttccattct</b>	<b>180</b>
<b>cccccaagatc</b>	<b>cattcctctt</b>	<b>atgccccccc</b>	<b>cccccaagag</b>	<b>caggtttcc</b>	<b>atgaatacccc</b>	<b>240</b>
<b>accaaacatg</b>	<b>gcataacaag</b>	<b>ttacaataag</b>	<b>atcaggaaca</b>	<b>aaccctata</b>	<b>tcaaggctgg</b>	<b>300</b>
<b>atgaggcaac</b>	<b>ccaacaggag</b>	<b>gaaaaggccc</b>	<b>ccaagagcag</b>	<b>gcaaaaaact</b>	<b>cccactgttg</b>	<b>360</b>
<b>tgtcttctgc</b>	<b>tagaacacaa</b>	<b>agctacacaa</b>	<b>ctataatgtt</b>	<b>tatgcagagg</b>	<b>acccagctca</b>	<b>420</b>
<b>gtctcatcag</b>	<b>ggtccgtgtt</b>	<b>tgttgctaca</b>	<b>gtttctgtga</b>	<b>acctctgtgg</b>	<b>gtctcgctta</b>	<b>480</b>
<b>gttggttctg</b>	<b>tgggttgtgt</b>	<b>tcttgtggca</b>	<b>tcctcaactc</b>	<b>ctctggctcc</b>	<b>tacaatcttt</b>	<b>540</b>

cctcccccattt tctttggagt tccctggcc atgcctgatg tttgggttggc ttggctgtgt	600
gggcctctgc atttatttcc gtcagttgtc ggaaagcata cctctgttga cagttggtcc	660
atgcactgat ctatgaggat agcagagtat cacttaggaat tacatttatttgc tcttttttgc	720
cagtcgtttt tggttcttc ccgagtctct gggctgttca gtctctggtt cctggcattc	780
cagacactgt cagttgtggg ttcccttttg tgggtgtggc ctcaacttgg ccagtcatttgc	840
gttggccatt cccacaagtt ctacaccacc attacccttag catgtctcgc aggcaggaca	900
gattgtacgc ggaaggattt atggctgggt tatgtctcgt tcccaggggct ggaagccttg	960
cctggtaaaa gaagacagct agttctgact cagttttccc tttttactagc agaatttcaact	1020
aggattaccc tcaccctcag ggcatttcca cagcacttagg gttctgcatt gctcttccaa	1080
taccccccattt aattccagtc gcctttccaa gaactctctt ccccccagect gatccctatt	1140
gttcccaccc ccatccaccc ccagtcacc tacaaagctc ttcccttc ccaagaagat	1200
ccatgagttt ctctgtgtct gtggatttggaa gtatgatctg tggatttagc agctaatgtt	1260
cacttaccag tgagttacaca ccgtttgtct tttgggtctg gtttacctca ctcagggtgg	1320
attttggatt tttttttttgg agtgcatacc atttgtctgc aaatgtcatg atgtcatttt	1380
tttttaacagc tgaggaatttctc tctcagaacc acattttctt tatccattat tcagattgtt	1440
cccgatttctt ggetattata aggtgtctat gaacatgggtt gaacaagggtt ctttgggttgc	1500
tccgtacaca ggtatgtggca tccctttgggtt atatgccttag gagtggtatc gatgggtctc	1560
gaggtagatc aattcccgat ttcttgagaa actgcctatctt ctgtttccaa agtggctgtg	1620
taagtttgcg ctccaccacag caacggagga gtgttctctt tactcttccc acattatcaa	1680
cagttgtgagc tgtaacttgtt gttttgtatc ttgcctttc tgacagggtgt aagatggaaat	1740
ctccaaagtag ctttgattttg cattttccctg ctggcttaagg atgttgaaca tttcttttaag	1800
tgtttctcag ccatttgaga ttatccattt gagaattctg tttagatctg aactccaccc	1860
tctaaatttggaa ttatttggttt taaaatccactttctc gagttttttaa tgggtttttgg	1920
atatttttttttcc tctgtcaaat gtggagttgg tgaagatctt tcccatctg gtgggtttttgg	1980
tcctatttgcg agtgcctttt gtttccacaga agtctttctg ttcatgagg tccctttttat	2040
tgttttttttttgcg atcttgggtct ttttagtgcg tggctatttgc atgtctatttcc aggaagggtgt	2100
ctccctgtgcc aatgcgttca aggctatttc ccactttctc ttctatttgc ttcagttgtat	2160
ctcattttat gtttggggctt ttgttccact tagagttggag tttttgtgcag agtgcataat	2220
atggatctat ttgcatttttctt ctacatgcag atatccagta agaccagcat cattttattgc	2280
ggatgtttttt taaaattttttcc gctttgtgtt tttttgggtt ctttataaaa atcagggtgtt	2340

EP1969125B1

cactgatttc attgatcagc caatgc <del>ttt</del> ctgccgatac catgtgg <del>ttt</del> tattgtata	2400
gctctgaggt acagctttag tcagggatgt gatgccc <del>ttt</del> gacgtcc <del>ttt</del> tattgtacag	2460
gagtatccta gg <del>ttt</del> tagcta tcctagg <del>ttt</del> ttgg <del>ttt</del> c cacatggagt taagtattgt	2520
ccttcaagg tctatagaga attgcattgg gat <del>ttt</del> ggtg gagattgtat tgcatttgta	2580
gatttggtag ggtggccatt tttactatgg taatcctacc	2620

## **DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO**

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

### **Documentos de patente referidos na descrição**

- US 60749544 PCT [0210]

### **Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição**

- Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. **ZHAO Y et al.** NATURE. NATURE PUBLISHING GROUP, 01 July 2005, vol. 436, 214-220 [0003]
- **GRIFFITHS-JONES S.** The microRNA Registry. NAR, 2004, vol. 32, D109-D111 [0103]
- **BARTEL, D.P.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004, vol. 116, 281-97 [0208]
- **AMBROS, V.** The functions of animal microRNAs. Nature, 2004, vol. 431, 350-5 [0208]
- **LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V.** The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 1993, vol. 75, 843-54 [0208]

- **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*, 1993, vol. 75, 855-62 **[0208]**
- **CHEN, C.Z.; LI, L.; LODISH, H.F.; BARTEL, D.P.** MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, vol. 303, 83-6 **[0208]**
- **HE, L. et al.** A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, vol. 435, 828-33 **[0208]**
- **GIRALDEZ, A.J. et al.** MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 2005, vol. 308, 833-8 **[0208]**
- **ZHAO, Y.; SAMAL, E.; SRIVASTAVA, D.** Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, vol. 436, 214-20 **[0208]**
- **THOMSON, J.M.; PARKER, J.; PEROU, C.M.; HAMMOND, S.M.** A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods*, 2004, vol. 1, 47-53 **[0208]**
- **BLAU, H.M. et al.** Plasticity of the differentiated state. *Science*, 1995, vol. 230, 758-66 **[0208]**
- **SOULEZ, M. et al.** Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol Cell Biol*, 1996, vol. 16, 6065-74 **[0208]**
- **LU, J.; MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N.** Regulation of skeletal myogenesis by association of the

MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell*, 2000, vol. 6, 233-44 [0208]

- **LEE, R.C.; AMBROS, V.** An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, vol. 294, 862-4 [0208]
- **LAGOS-QUINTANA, M. et al.** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 2002, vol. 12, 735-9 [0208]
- **SEMPERE, L.F. et al.** Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 2004, vol. 5, R13 [0208]
- **WIENHOLDS, E. et al.** MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 2005, vol. 309, 310-1 [0208]
- **MANSFIELD, J.H. et al.** MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet*, 2004, vol. 36, 1079-83 [0208]
- **HUTVAGNER, G.; SIMARD, M.J.; MELLO, C.C.; ZAMORE, P.D.** Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*, 2004, vol. 2, E98 [0208]
- **MEISTER, G.; LANDTHALER, M.; DORSETT, Y.; TUSCHL, T.** Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna*, 2004, vol. 10, 544-50 [0208]
- **LEWIS, B.P.; SHIH, I.H.; JONES-RHOADES, M.W.; BARTEL,**

**D.P.; BURGE, C.B.** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, vol. 115, 787-98 [0208]

- **KIRIAKIDOU, M. et al.** A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*, 2004, vol. 18, 1165-78 [0208]
- **KREK, A. et al.** Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 2005, vol. 37, 495-500 [0208]
- **MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; LU, J.; OLSON, E.N.** Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, 2000, vol. 408, 106-11 [0208]
- **WANG, D. et al.** Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2002, vol. 67, 97-105 [0208]
- **LI, S. et al.** Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, vol. 102, 1082-7 [0208]
- **WANG, D. et al.** Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*, 2001, vol. 105, 851-62 [0208]
- **CAO, D et al.** Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol*, 2005, vol. 25, 364-76 [0208]
- **KROLL, K.L.; AMAYA, E.** Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling

requirements during gastrulation. *Development*, 1996, vol. 122, 3173-83 [0208]

- **CONLON, F.L.; SEDGWICK, S.G.; WESTON, K.M.; SMITH, J.C.** Inhibition of Xbra transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of Xbra in dorsal meso-derm. *Development*, 1996, vol. 122, 2427-35 [0208]
- **BROWN, D.D. et al.** Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development*, 2005, vol. 132, 553-63 [0208]
- **FREIER et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 9373-9377 [0208]
- **TURNER et al.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1987, vol. LII, 123-133 [0208]
- **SMITH; WATERMAN.** *Adv Appl Math*, 1981, vol. 2, 482-489 [0208]
- **NEEDLEMAN; WUNSCH.** *J Mol Biol*, 1970, vol. 48, 443-453 [0208]
- **PEARSON; LIPMAN.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0208]
- Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, 1989 [0208]
- **ALTSCHUL et al.** *J Mol Biol*, 1990, vol. 215, 403-410 [0208]
- **HENIKOFF; HENIKOFF.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992,

vol. 89, 10915-10919 [0208]

- **KARLIN; ALTSCHUL.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, vol. 90, 5873-5877 [0208]
- **SAMBROOK; RUSSELL.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0208]
- Methods in Molecular Biology. Humana Press, vol. 20 [0208]
- **TIJSSEN.** Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes. Elsevier, 1993 [0208]
- **TIBANYENDA et al.** *Eur J Biochem*, 1984, vol. 139, 19-27 [0208]
- **EBEL et al.** *Biochem*, 1992, vol. 31, 12083-12086 [0208]
- Gene Expression Technology. **GOEDDEL.** Methods in Enzymology. Academic Press, 1990, vol. 185 [0208]
- **SILHAVY.** Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, 1984 [0208]
- DNA Cloning: A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press, 1995 [0208]
- **ADELMAN et al.** *DNA*, 1983, vol. 2, 183-193 [0208]
- **LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V.** The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 1993, vol.

75, 843-854 [0208]

- **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*, 1993, vol. 75, 855-862 [0208]
- **LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N.** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*, 2004, vol. 23, 4051-4060 [0208]
- **BRACHT, J.; HUNTER, S.; EACHUS, R.; WEEKS, P.; PASQUINELLI, A. E.** Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *Rna*, 2004, vol. 10, 1586-1594 [0208]
- **RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J. L.; BRADLEY, A.** Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 2004, vol. 14, 1902-1910 [0208]
- **LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, vol. 425, 415-419 [0208]
- **BASYUK, E.; SUAVET, F.; DOGLIO, A.; BOR-DONNE, R.; BERTRAND, E.** Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*, 2003, vol. 31, 6593-6597 [0208]
- **LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHL-BERG, J. E.; KUTAY, U.** Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004, vol. 303, 95-98 [0208]

- **YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R.** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-micro-RNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 2003, vol. 17, 3011-3016 [0208]
- **YI, R.; DOEHLE, B. P.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R.** Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna*, 2005, vol. 11, 220-226 [0208]
- **BOHNSACK, M. T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D.** Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-bind-ing protein that mediates nuclear export of pre-miR-NAs. *Rna*, 2004, vol. 10, 185-191 [0208]
- **GWIZDEK, C.; OSSAREH-NAZARI, B.; BROWNAWELL, A. M.; EVERS, S.; MACARA, I. G.; DARGEMONT, C.** Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 884-891 [0208]
- **GRISHOK, A.; PASQUINELLI, A. E.; CONTE, D.; LI, N.; PARRISH, S.; HA, I.; BAILLIE, D. L.; FIRE, A.; RUVKUN, G.; MELLO, C. C.** Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 2001, vol. 106, 23-34 [0208]
- **HUTVAGNER, G.; MCLACHLAN, J.; PAS-QUINELLI, A. E.; BALINT, E.; TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D.** A cellular function for the RNA-in-terference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001, vol. 293, 834-838 [0208]
- **KETTING, R. F.; FISCHER, S. E.; BERNSTEIN, E.; SIJEN,**

- T.; HANNON, G. J; PLASTERK, R. H.** Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 2001, vol. 15, 2654-2659 **[0208]**
- **SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D.** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003, vol. 115, 199-208 **[0208]**
  - **KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D.** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003, vol. 115, 209-216 **[0208]**
  - **PILLAI, R. S.; ARTUS, C. G.; FILIPOWICZ, W.** Tethering of human go proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna*, 2004, vol. 10, 1518-1525 **[0208]**
  - **DOENCH, J. G.; SHARP, P. A.** Specificity of micro-RNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 2004, vol. 18, 504-511 **[0208]**
  - **BARTEL, D. P.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, vol. 116, 281-297 **[0208]**
  - **BERNSTEIN, E.; KIM, S. Y.; CARMELL, M. A.; MURCHISON, E. P.; ALCORN, H.; LI, M. Z.; MILLS, A. A.; ELLEDGE, S. J.; ANDERSON, K. V.; HANNON, G. J.** Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 2003, vol. 35, 215-217 **[0208]**
  - **HARFE, B. D.; McMANUS, M. T.; MANSFIELD, J. H.; HOMSTEIN, E.; TABIN, C. J.** The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the

vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2005 [0208]

- **GIRALDEZ, A. J.; CINALLI, R. M.; GLASNER, M. E.; ENRIGHT, A. J.; THOMSON, J. M.; BASKER-VILLE, S.; HAMMOND, S. M.; BARTEL, D. P.; SCHIER, A. F.** MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 2005, vol. 308, 833-838 [0208]
- **POY, M. N.; ELIASSON, L.; KRUTZFELDT, J.; KUWAJIMA, S.; MA, X.; MACDONALD, P. E.; PF-EFFER, S.; TUSCHL, T.; RAJEWSKY, N.; RORS-MAN, P.** A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 2004, vol. 432, 226-230 [0208]
- **ESAU, C.; KANG, X.; PERALTA, E.; HANSON, E.; MARCUSSON, E. G.; RAVICHANDRAN, L. V.; SUN, Y.; KOO, S.; PERERA, R. J.; JAIN, R. et al.** MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 52361-52365 [0208]
- **HE, L.; THOMSON, J. M.; HEMANN, M. T.; HER-NANDO-MONGE, E.; MU, D.; GOODSON, S.; POWERS, S.; CORDON-CARDO, C.; LOWE, S. W.; HANNON, G. J.** A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, vol. 435, 828-833 [0208]
- **CHEN, C. Z.; LI, L.; LODISH, H. F.; BARTEL, D. P.** MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, vol. 303, 83-86 [0208]
- **JOHNSTON, R. J.; HOBERT, O.** A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003, vol. 426, 845-849 [0208]
- **CHANG, S.; JOHNSTON, R. J., JR.; FROKJAER-JENSEN, C.**

**LOCKERY, S.; HOBERT, O.** MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature*, 2004, vol. 430, 785-789 [0208]

- **YEKTA, S.; SHIH, I. H.; BARTEL, D. P.** MicroR-NA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, vol. 304, 594-596 [0208]
- **MANSFIELD, J. H.; HARFE, B. D.; NISSEN, R.; OBENAUER, J.; SRINEEL, J.; CHAUDHURI, A.; FARZAN-KASHANI, R.; ZUKER, M.; PAS-QUINELLI, A. E.; RUVKUN, G. et al.** MicroRNA-re-sponsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet*, 2004, vol. 36, 1079-1083 [0208]
- **ZHAO, Y.; SAMAL, E.; SRIVASTAVA, D.** Serum response factor regulates a muscle-specific microR-NA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*, 2005, vol. 436, 214-220 [0208]
- **LEWIS, B. P.; SHIH, I. H.; JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B.** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, vol. 115, 787-798 [0208]
- **JOHN, B.; ENRIGHT, A. J.; ARAVIN, A.; TUSCHL, T.; SANDER, C.; MARKS, D. S.** Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 2004, vol. 2, 363 [0208]
- **KIRIAKIDOU, M.; NELSON, P. T.; KOURANOV, A.; FITZIEV, P.; BOUYIOUKOS, C.; MOURELA-TOS, Z.; HATZIGEORGIOU, A.** A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*, 2004, vol. 18, 1165-1178 [0208]

- **KREK, A.; GRUN, D.; POY, M. N.; WOLF, R.; ROSENBERG, L.; EPSTEIN, E. J.; MACME-NAMIN, P.; DA PIEDADE, I.; GUNSAULUS, K. C.; STOFFEL, M.** Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 2005, vol. 37, 495-500 [0208]
- **RAJEWSKY, N.; SOCCI, N. D.** Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol*, 2004, vol. 267, 529-535 [0208]
- **NICOL, R. L.; FREY, N.; PEARSON, G.; COBB, M.; RICHARDSON, J.; OLSON, E. N.** Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J*, 2001, vol. 20, 2757-2767 [0208]
- **JONES, W. K.; GRUPP, I. L.; DOETSCHMAN, T.; GRUPP, G.; OSINSKA, H.; HEWETT, T. E.; BOIVIN, G.; GULICK, J.; NG, W. A.; ROBBINS, J.** Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest*, 1996, vol. 98, 1906-1917 [0208]
- **LIU, P.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.** A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res*, 2003, vol. 13, 476-484 [0208]
- **COTTA-DE-ALMEIDA, V.; SCHONHOFF, S.; SHI-BATA, T.; LEITER, A.; SNAPPER, S. B.** A new method for rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res*, 2003, vol. 13, 2190-2194 [0208]
- **SUBRAMANIAM, A.; JONES, W. K.; GULICK, J.; WERT, S.; NEUMANN, J.; ROBBINS, J.** Tissue-specific regulation of

the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1991, vol. 266, 24613-24620 [0208]

- SANBE, A.; GULICK, J.; HANKS, M. C.; LIANG, Q.; OSINSKA, H.; ROBBINS, J. Reengineering in-ducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res*, 2003, vol. 92, 609-616 [0208]
- CZUBRYT, M. P.; MCANALLY, J.; FISHMAN, G. I.; OLSON, E. N. Regulation of peroxisome prolifer-ator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, vol. 100, 1711-1716 [0208]
- ITO, M.; YUAN, C. X.; MALIK, S.; GU, W.; FON-DELL, J. D.; YAMAMURA, S.; FU, Z. Y.; ZHANG, X.; QIN, J.; ROEDER, R. G. Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell*, 1999, vol. 3, 361-370 [0208]
- FONDELL, J. D.; GE, H.; ROEDER, R. G. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, vol. 93, 8329-8333 [0208]
- TREISMAN, J. Drosophila homologues of the trans-criptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development*, 2001, vol. 128, 603-615 [0208]
- ITO, M.; YUAN, C. X.; OKANO, H. J.; DARNELL, R. B.;

- ROEDER, R. G.** Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell*, 2000, vol. 5, 683-693 [0208]
- **MUNCKE, N.; JUNG, C.; RUDIGER, H.; ULMER, H.; ROETH, R.; HUBERT, A.; GOLDMUNTZ, E.; DRISCOLL, D.; GOODSHIP, J.; SCHON, K.** Mis-sense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries. *Circulation*, 2003, vol. 108, 2843-2850 [0208]
  - **LOMPRE, A. M.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V.** Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem*, 1984, vol. 259, 6437-6446 [0208]
  - **EVERETT, A. W.; SINHA, A. M.; UMEDA, P. K.; JAKOVUSIC, S.; RABINOWITZ, M.; ZAK, R.** Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry*, 1984, vol. 23, 1596-1599 [0208]
  - **DARLING, D. S.; CARTER, R. L.; YEN, P. M.; WELBORN, J. M.; CHIN, W. W.; UMEDA, P. K.** Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, 10221-10227 [0208]
  - **SUBRAMANIAM, A.; GULICK, J.; NEUMANN, J.; KNOTTS, S.; ROBBINS, J.** Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy

chain gene promoter. *J Biol Chem*, 1993, vol. 268, 4331-4336 [0208]

- **GUSTAFSON, T. A.; MARKHAM, B. E.; BAHL, J. J.; MORKIN, E.** Thyroid hormone regulates expression of a transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, vol. 84, 3122-3126 [0208]
- **SANTALUCIA, T.; BOHELER, K. R.; BRAND, N. J.; SAHYE, U.; FANDOS, C.; VINALS, F.; FERRE, J.; TESTAR, X.; PALACIN, M.; ZOR-ZANO, A.** Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, 17626-17634 [0208]
- **HAGEN, G.; MULLER, S.; BEATO, M.; SUSKE, G.** Spl-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J*, 1994, vol. 13, 3843-3851 [0208]
- **HAGEN, G.; MULLER, S.; BEATO, M.; SUSKE, G.** Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res*, 1992, vol. 20, 5519-5525 [0208]
- **SCHONBERGER, J.; WANG, L.; SHIN, J. T.; KIM, S. D.; DEPREUX, F. F.; ZHU, H.; ZON, L.; PIZ-ARD, A.; KIM, J. B.; MACRAE, C. A. et al.** Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet*, 2005, vol. 37, 418-422 [0208]
- **WAYNE, S.; ROBERTSON, N. G.; DECLAU, F.; CHEN, N.; VERHOEVEN, K.; PRASAD, S.; TRANEBJARG, L.; MORTON, C. C.; RYAN, A. F.; VAN CAMP, G.** Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset

deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet*, 2001, vol. 10, 195-200 [0208]

- **BORSANI, G.; DEGRANDI, A.; BALLABIO, A.; BULFONE, A.; BERNARD, L.; BANFI, S.; GAT-TUSO, C.; MARIANI, M.; DIXON, M.; DONNAI, D. et al.** EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. *Hum Mol Genet*, 1999, vol. 8, 11-23 [0208]
- **BONINI, N. M.; LEISERSON, W. M.; BENZER, S.** The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell*, 1993, vol. 72, 379-395 [0208]
- **HEANUE, T. A.; RESHEF, R.; DAVIS, R. J.; MAR-DON, G.; OLIVER, G.; TOMAREV, S.; LASSAR, A. B.; TABIN, C. J.** Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev*, 1999, vol. 13, 3231-3243 [0208]
- **XU, X.; RICH, E. S., JR.; SELDIN, D. C.** Murine protein kinase CK2 alpha': cDNA and genomic cloning and chromosomal mapping. *Genomics*, 1998, vol. 48, 79-86 [0208]
- **PINNA, L. A.; MEGGIO, F.** Protein kinase CK2 (''casein kinase-2'') and its implication in cell division and proliferation. *Prog Cell Cycle Res*, 1997, vol. 3, 77-97 [0208]
- **GRANZIER, H. L.; LABEIT, S.** The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 2004, vol. 94, 284-295 [0208]

- **YAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278 (10), 8826–8836 [0208]

Lisboa, 9 de Agosto de 2012.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Uma quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização num método para tratar uma lesão muscular num indivíduo, preferentemente um mamífero, em que miR-133 e um inibidor de miR-1 são administrados em combinação ao local de lesão muscular num primeiro ponto de tempo e miR-1 e um inibidor de miR-133 são administrados em combinação ao local de lesão muscular num segundo ponto de tempo.
2. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a lesão muscular é o resultado de um traumatismo muscular mecânico, um distúrbio degenerativo muscular, uma lesão cardíaca, ou uma combinação dos mesmos.
3. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que miR-1 compreende uma sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1.
4. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que miR-133 compreende uma sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 2 ou uma sequência pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 2.
5. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de miR-1 é um polinucleotídeo modificado que compreende uma sequência de nucleótidos que é pelo menos 70% complementar a miR-1.

6. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de miR-1 é 2'-O-metil-miR-1 (SEQ ID NO: 62).

7. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de miR-133 é um polinucleótido modificado que compreende uma sequência de nucleótidos que é pelo menos 70% complementar a miR-133.

8. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o inibidor de miR-133 é 2'-O-metil-miR-133 (SEQ ID NO: 63).

9. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que miR-1 e/ou miR-133 são codificados por um vector.

10. A quantidade eficaz de miR-1, um inibidor de miR-1, miR-133, e um inibidor de miR-133 para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o vector compreende:

(a) um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico que codifica miR-1 e/ou miR-133; e

(b) uma sequência de terminação da transcrição.

11. Uma quantidade eficaz de um inibidor de miR-1 e miR-133 para utilização num método para tratar uma lesão muscular num indivíduo, preferentemente um mamífero, em que o dito miR-133 e o dito inibidor de miR-1 aumentam a proliferação de miócitos quando se administram em

combinação a um local de lesão muscular.

12. Uma quantidade eficaz de miR-1 e um inibidor de miR-133 para utilização num método para tratar uma lesão muscular num indivíduo, preferentemente um mamífero, em que o dito miR-1 e o dito inibidor de miR-133 aumentam a diferenciação de miócitos quando se administram em combinação a um local de lesão muscular.

13. Um método *in vitro* para aumentar a diferenciação de miócitos que compreende colocar em contacto um miócito com miR-1 e um inibidor de miR-133.

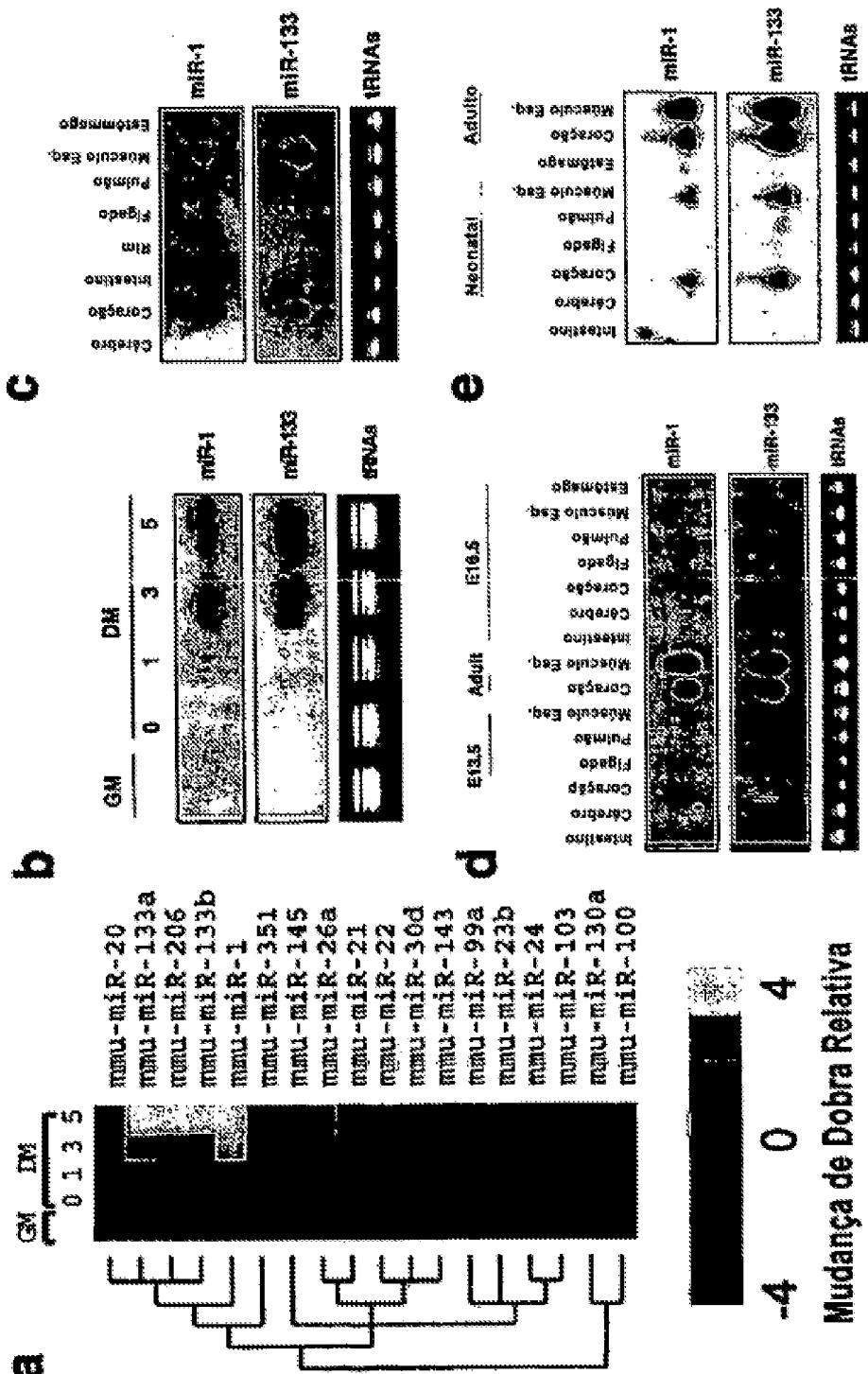
14. O método *in vitro* de acordo com a reivindicação 13, em que miR-1 compreende uma sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 1.

15. Um método *in vitro* para aumentar a proliferação de miócitos que compreende colocar em contacto um miócito com miR-133 e um inibidor de miR-1.

16. O método *in vitro* de acordo com a reivindicação 15, em que miR-133 compreende uma sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 2 ou uma sequência pelo menos 70% idêntica à SEQ ID NO: 2.

17. O método *in vitro* de acordo com a reivindicação 13 ou reivindicação 15, em que miR-1 ou miR-133 são codificados por um vector.

Lisboa, 9 de Agosto de 2012.



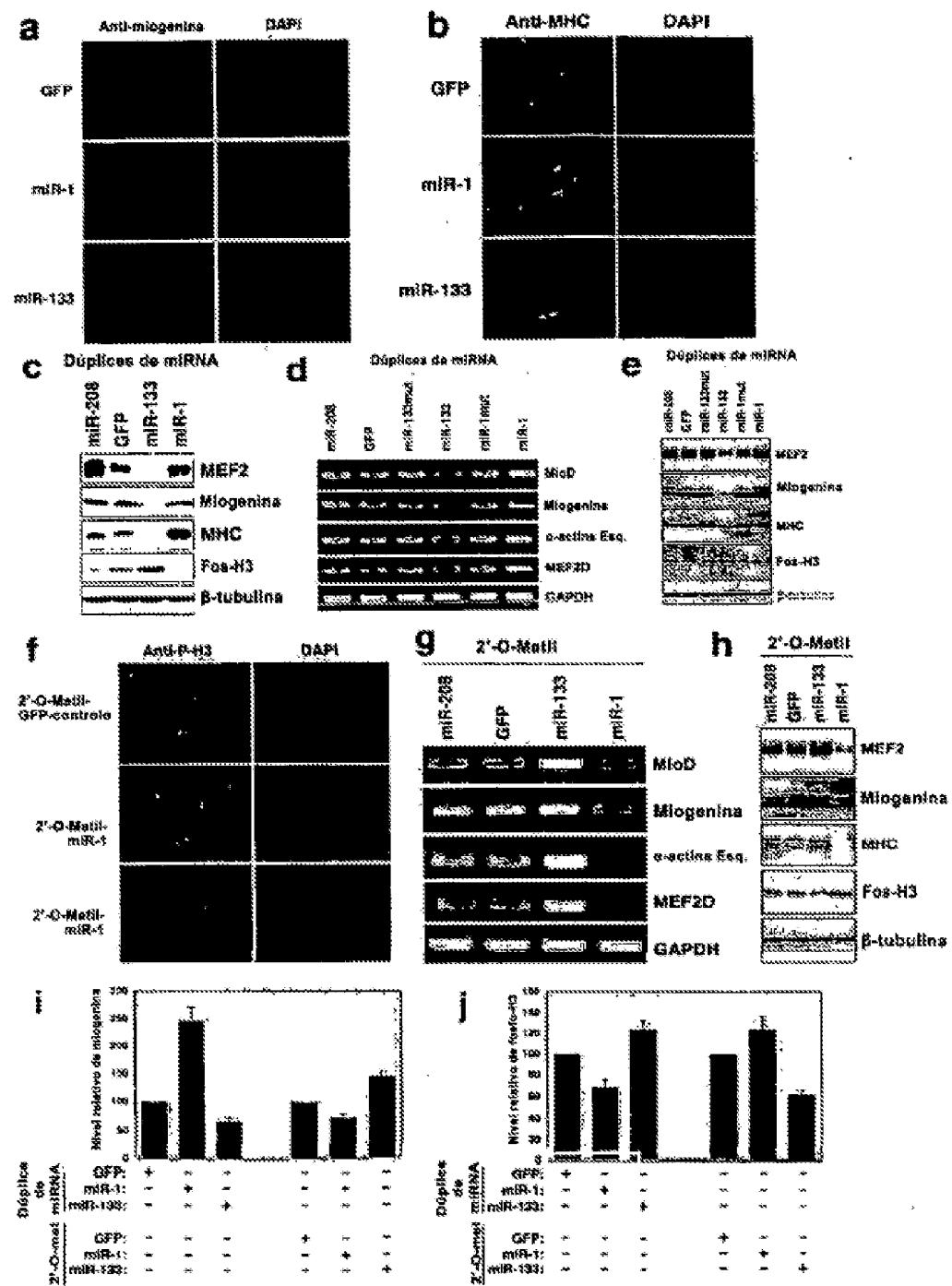


FIGURA 2

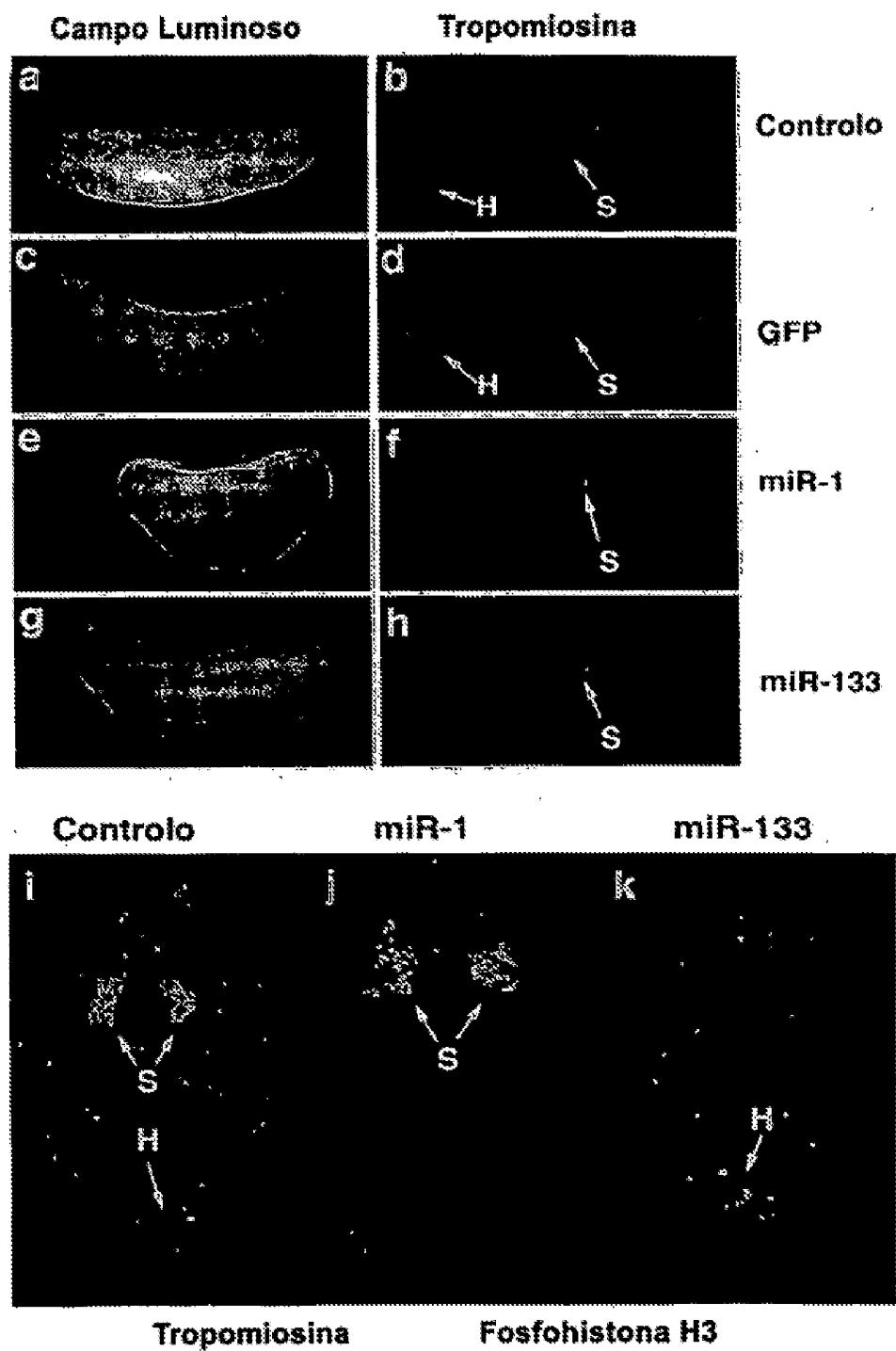


FIGURA 3

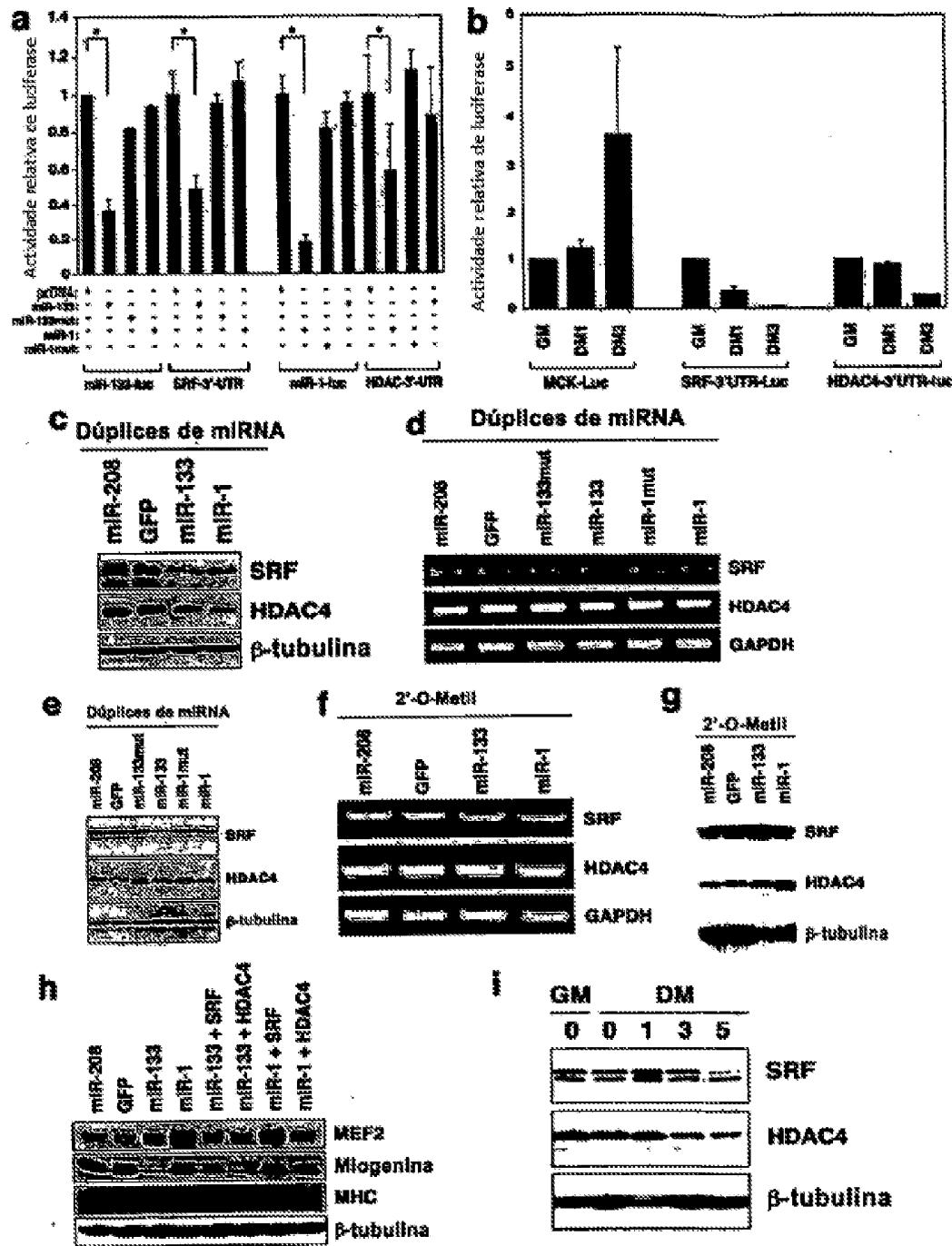


FIGURA 4

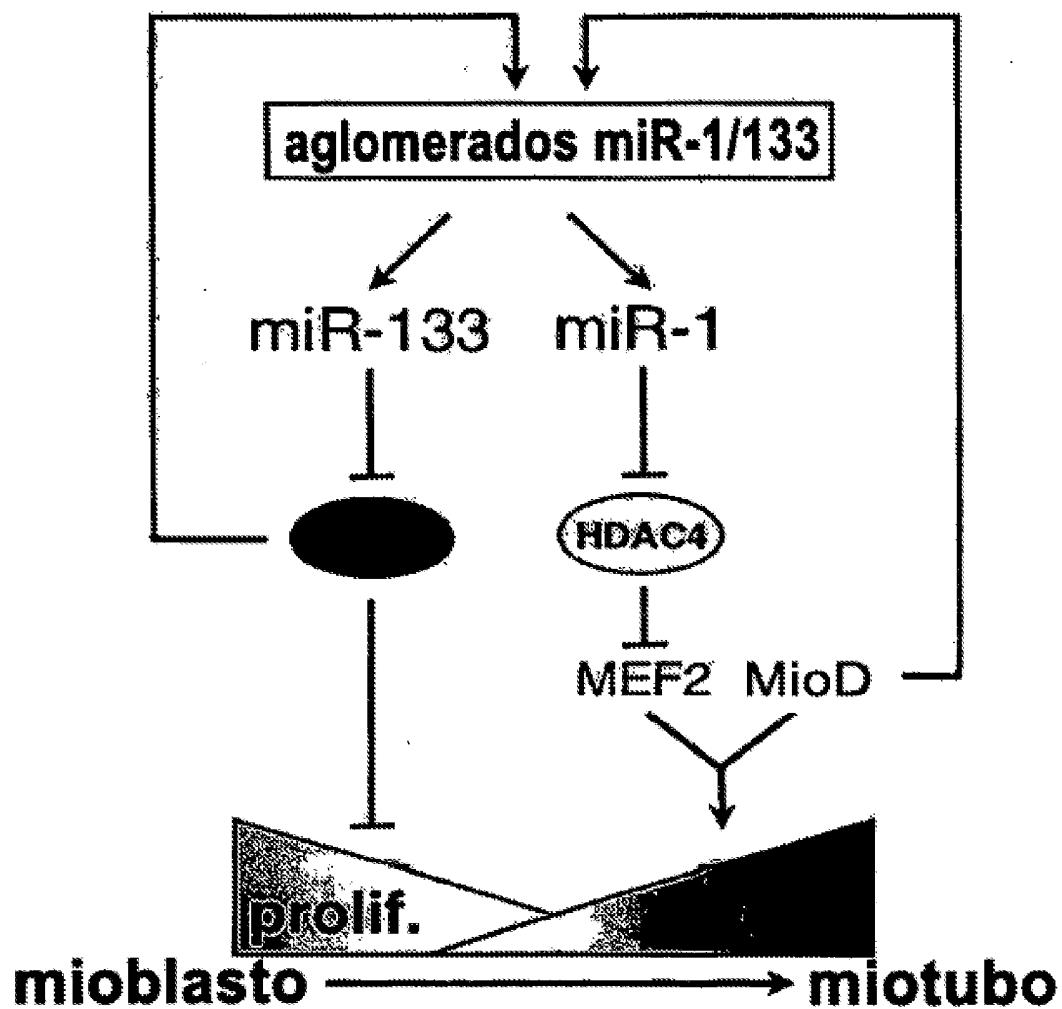


FIGURA 5

**FIGURA 6**

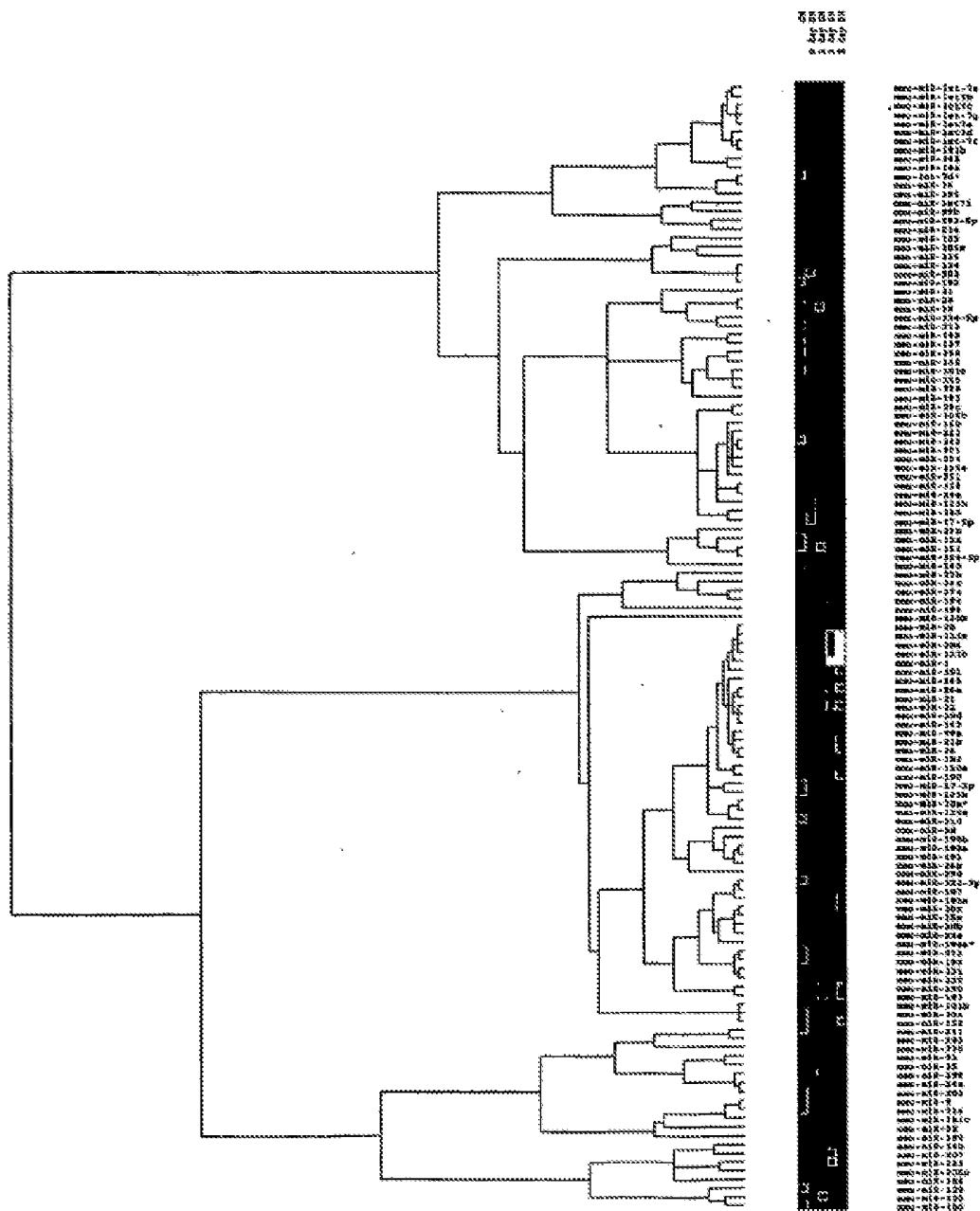


FIGURA 7

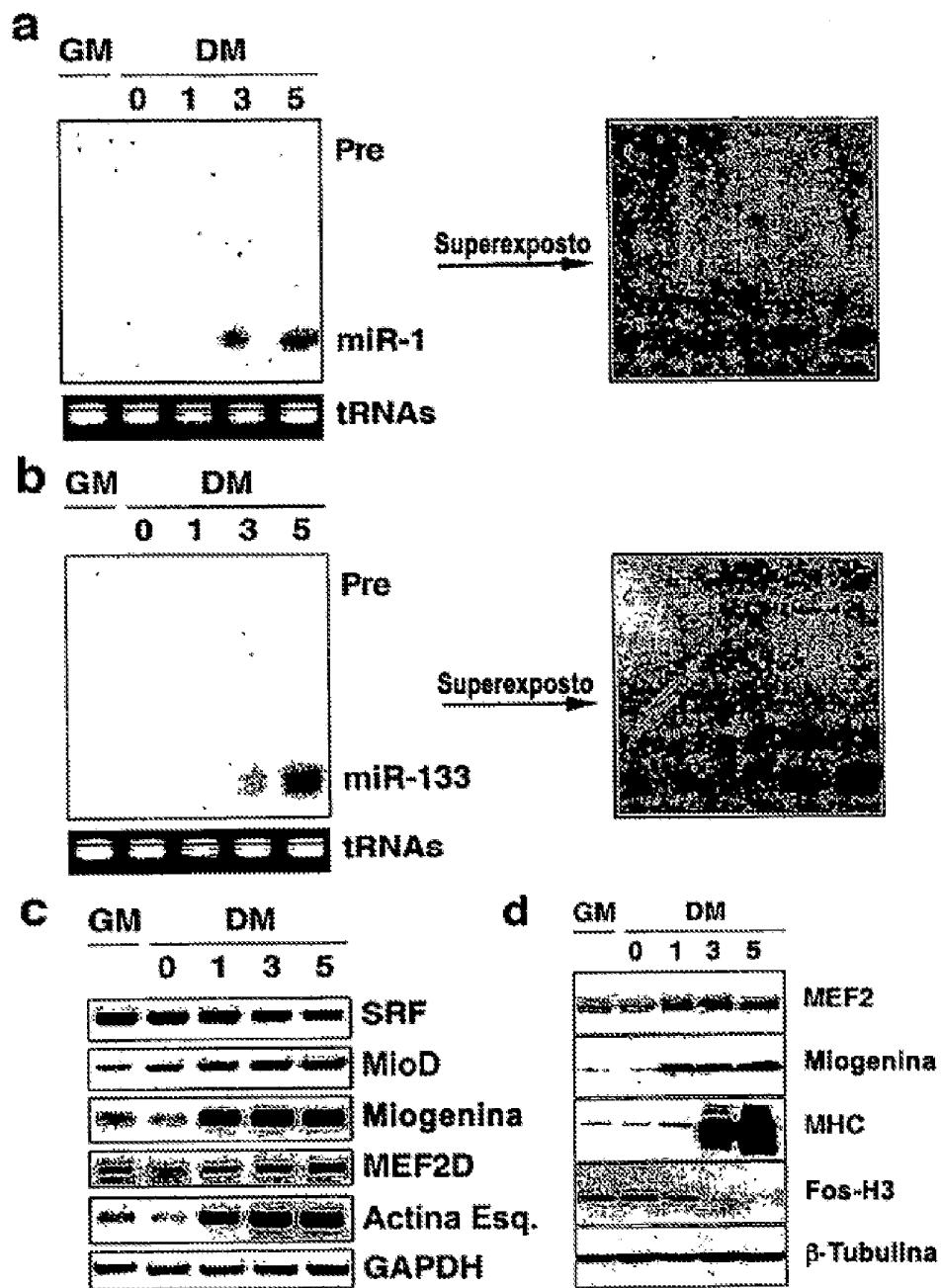


FIGURA 8

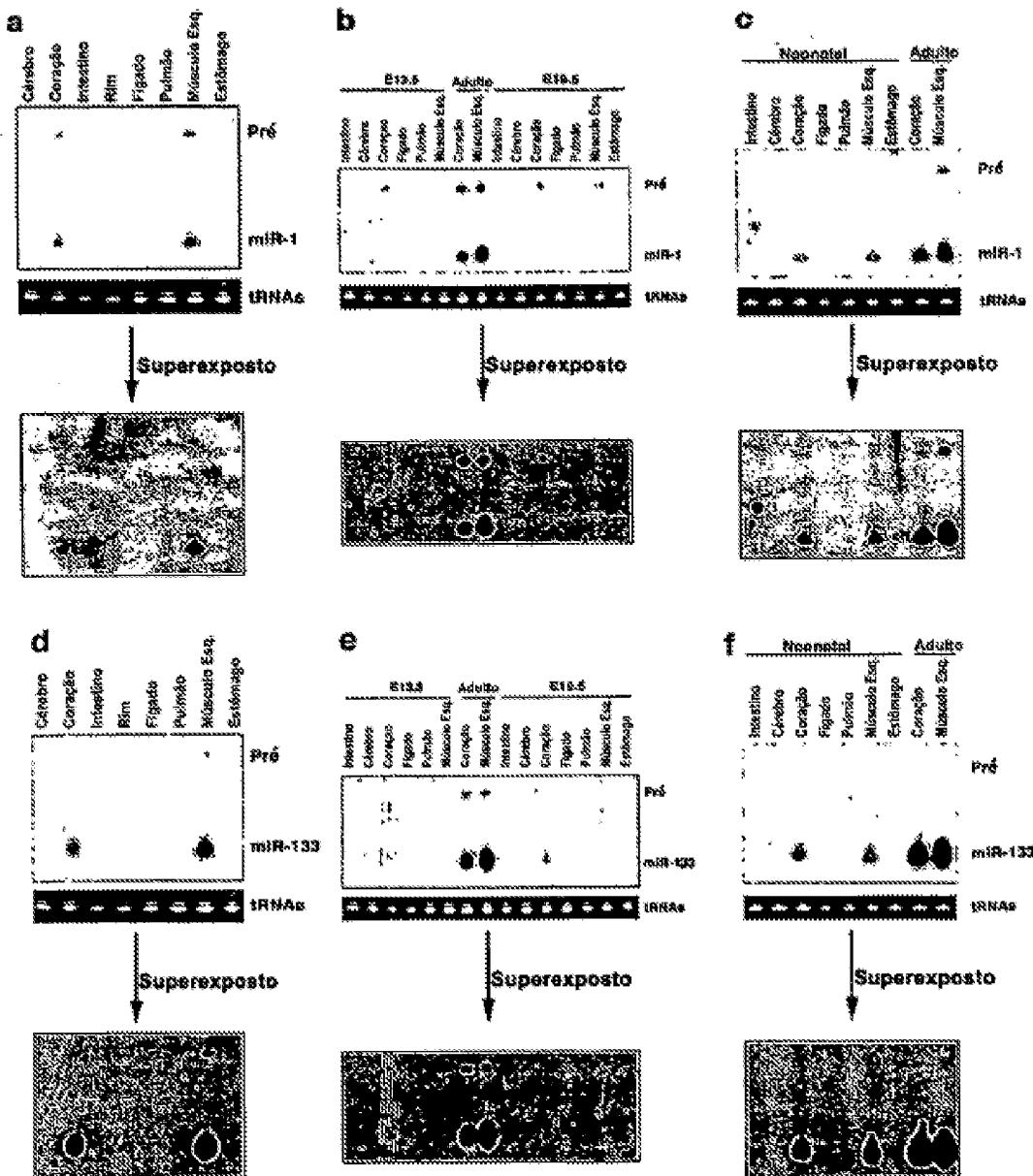


FIGURA 9

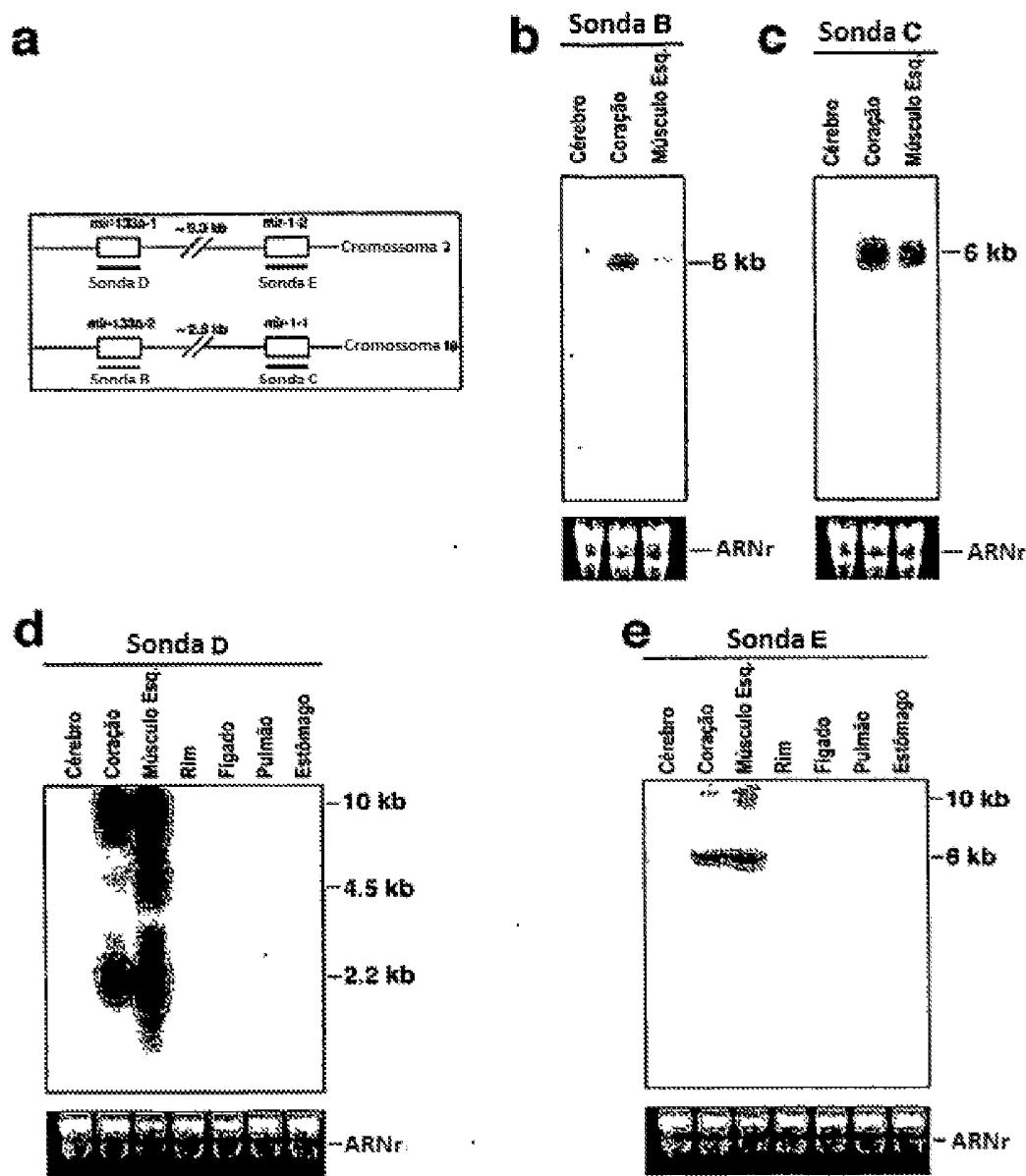
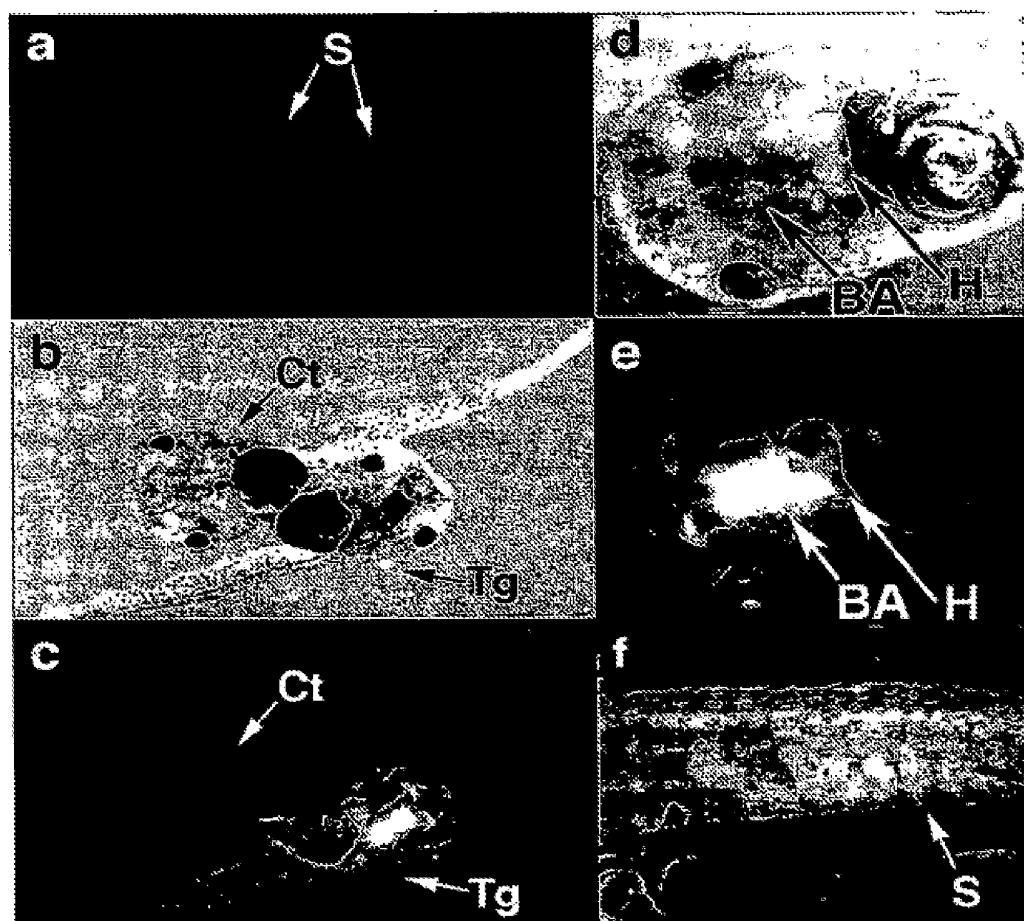


FIGURA 10



**FIGURA 10G**

## Sequências melhoradoras de aglomerado de miR-1/133 do Cromossomo 2

FIGURA 11

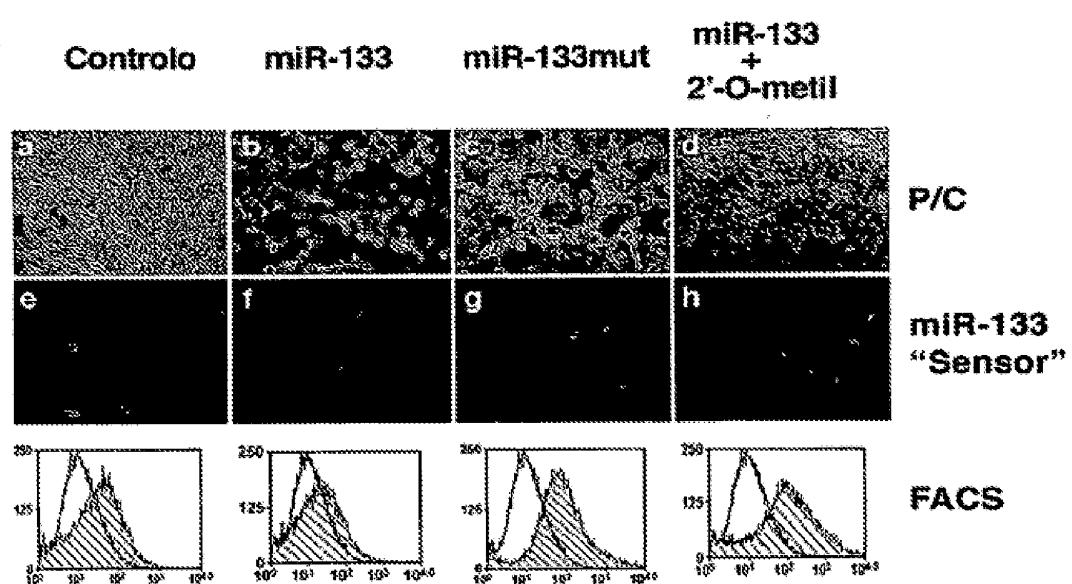
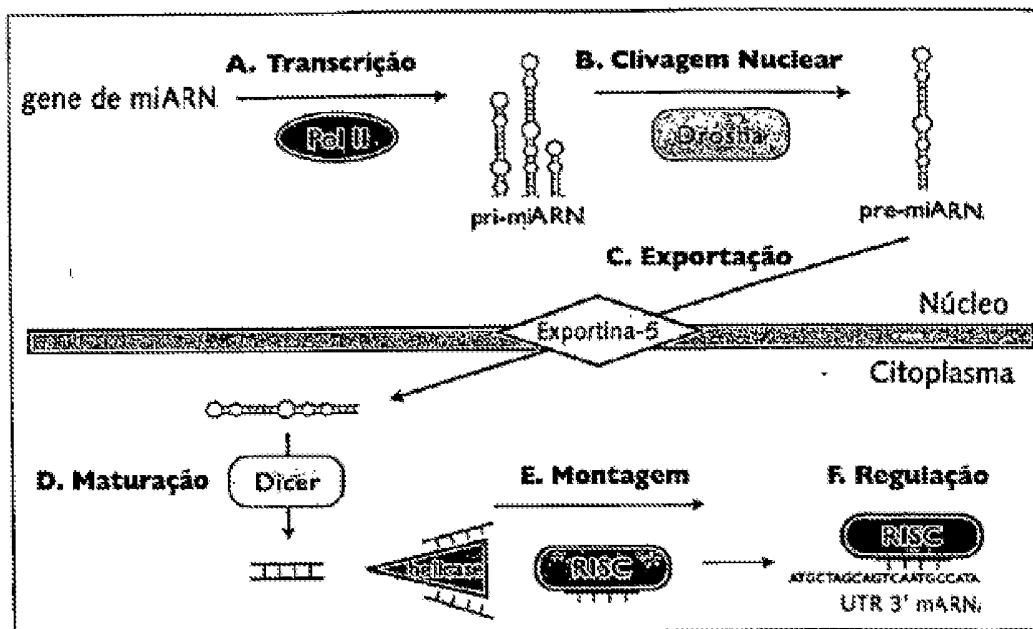
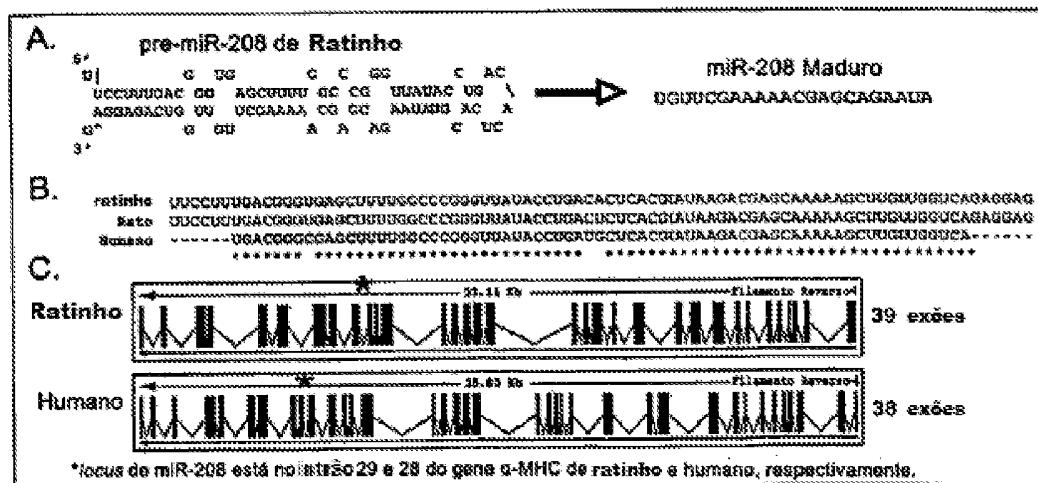


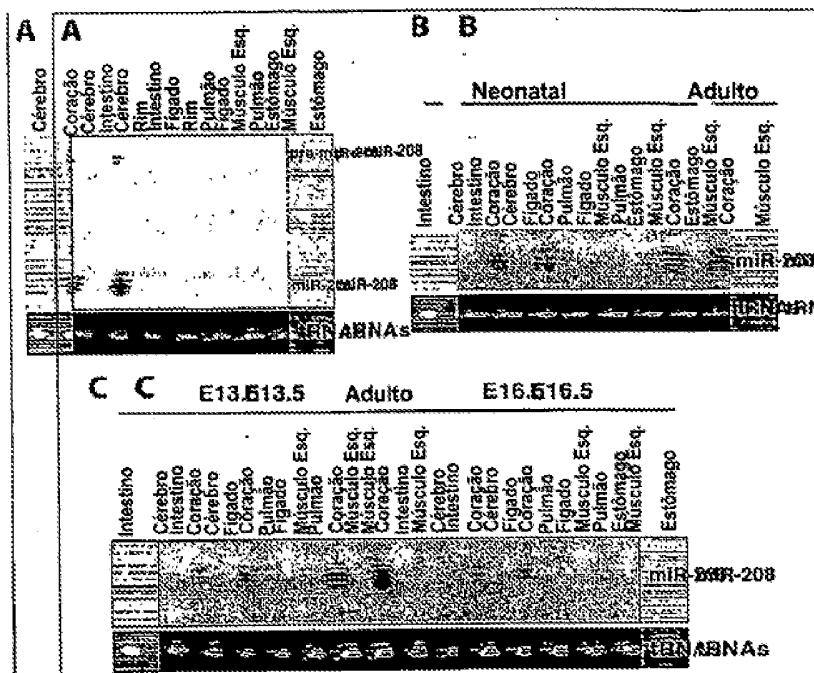
FIGURA 12



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**



**FIGURA 15**

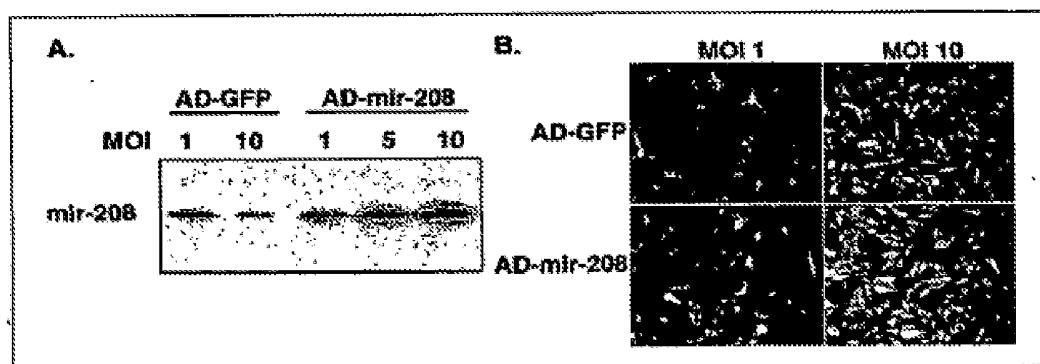


FIGURA 16

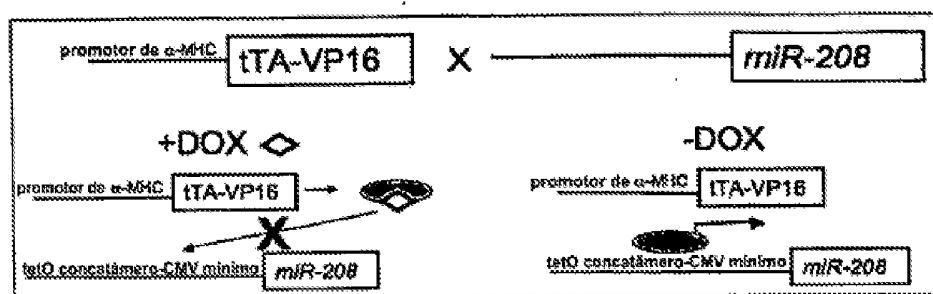
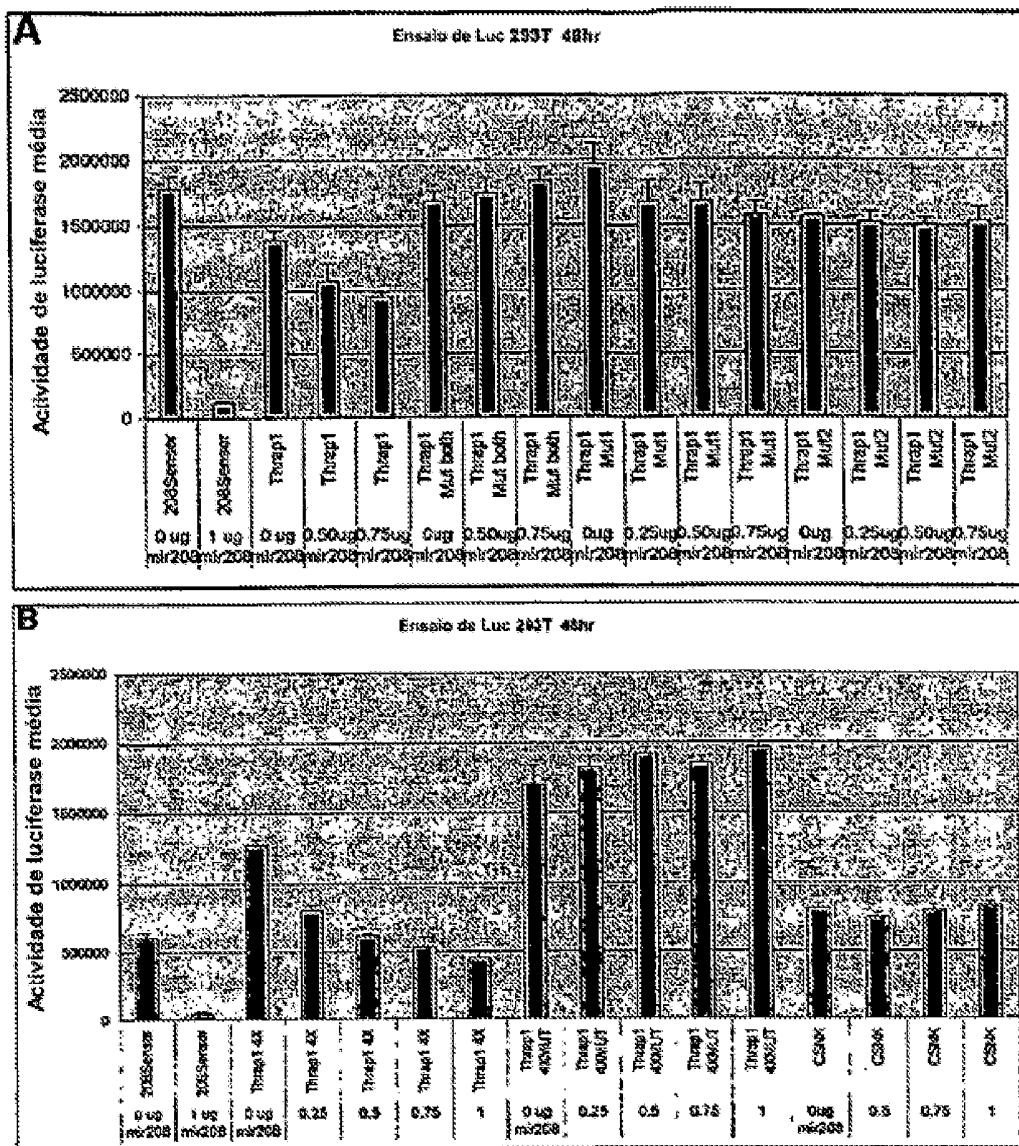


FIGURA 17



5

## FIGURA 18

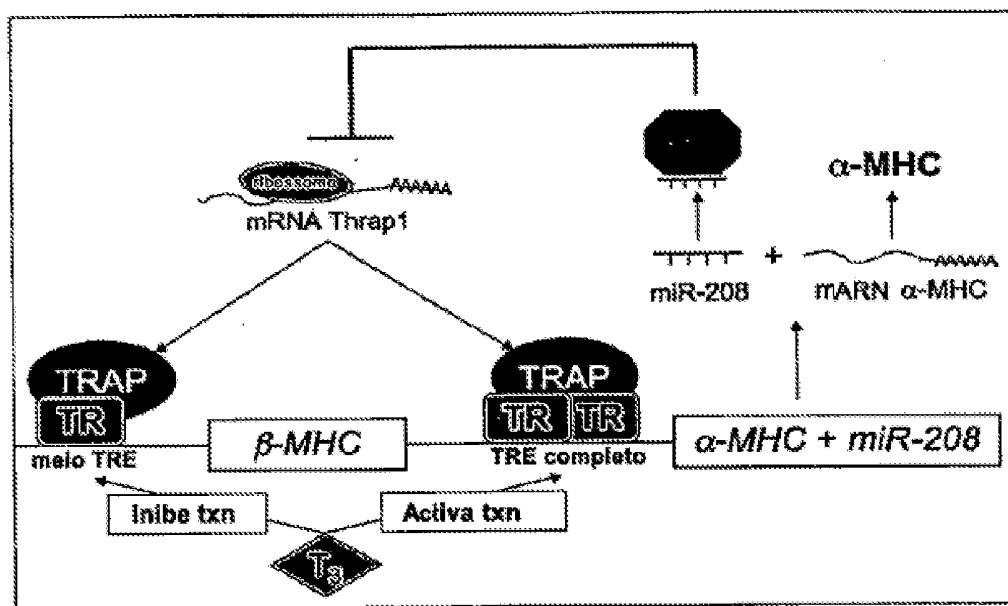


FIGURA 19

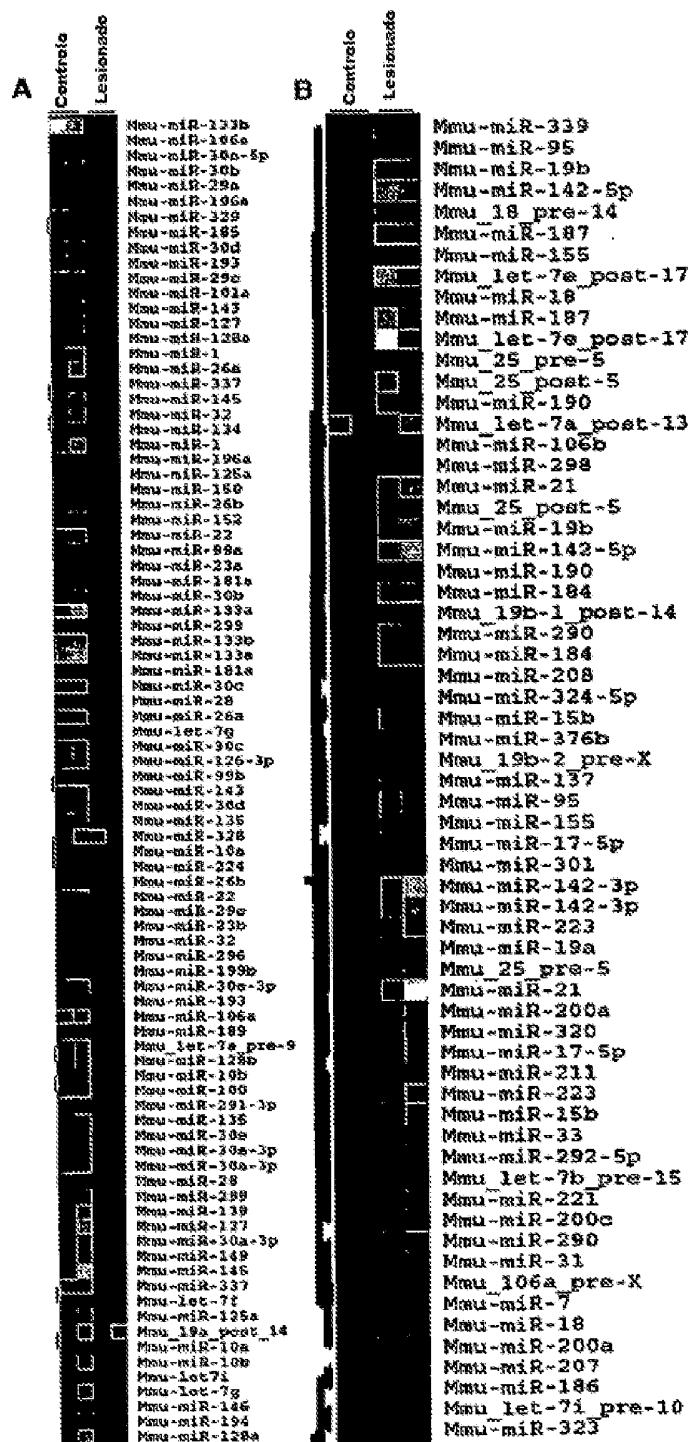


FIGURA 20

**miR-26 (SEQ ID NO:6)**

mmu-miR-26a MIMAT0000533  
UUCAAGUAUCCAGGAUAGGC (SEQ ID NO:12)

mmu-miR-26b MIMAT0000534  
UUCAAGUAUUCAGGAUAGGUU (SEQ ID NO:13)

**miR-29 (SEQ ID NO:7)**

mmu-miR-29a MIMAT0000535  
UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU (SEQ ID NO:14)

mmu-miR-29b MIMAT0000127  
UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (SEQ ID NO:15)

mmu-miR-29c MIMAT0000536  
UAGCACCAUUUGAAAUCGGU (SEQ ID NO:16)

**miR-30 (SEQ ID NO:8)**

mmu-miR-30a-3p MIMAT0000129  
CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (SEQ ID NO:17)

mmu-miR-30b MIMAT0000130  
UGUAAACAUCCUACACUCAGCU (SEQ ID NO:18)

mmu-miR-30c MIMAT0000514  
UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC (SEQ ID NO:19)

mmu-miR-30d MIMAT0000515  
UGUAAACAUCCCCGACUGGAAAG (SEQ ID NO:20)

mmu-miR-30e\* MIMAT0000249  
CUUUCAGUCGGAUGUUUACAG (SEQ ID NO:21)

**miR-128 (SEQ ID NO:9)**

mmu-miR-128a MIMAT0000140  
UCACAGUGAACCGGUCUCUUUU (SEQ ID NO:22)

mmu-miR-128b MIMAT0000675  
UCACAGUGAACCGGUCUCUUUC (SEQ ID NO:23)

FIGURA 21

Figura 22

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

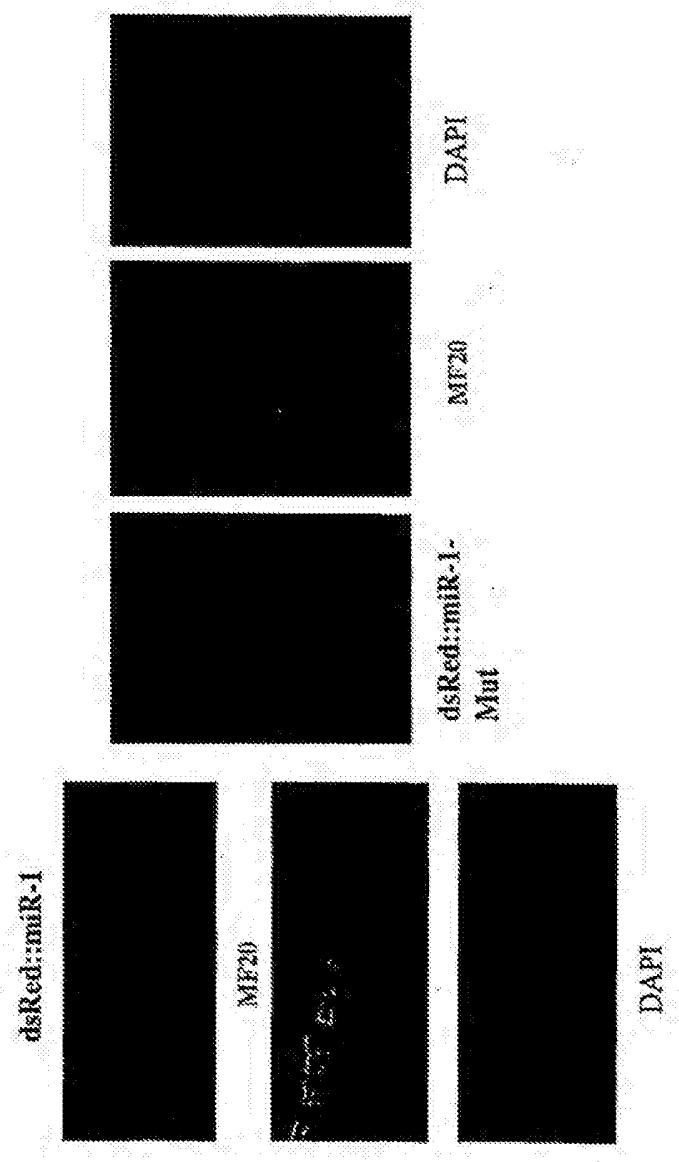


Figura 23

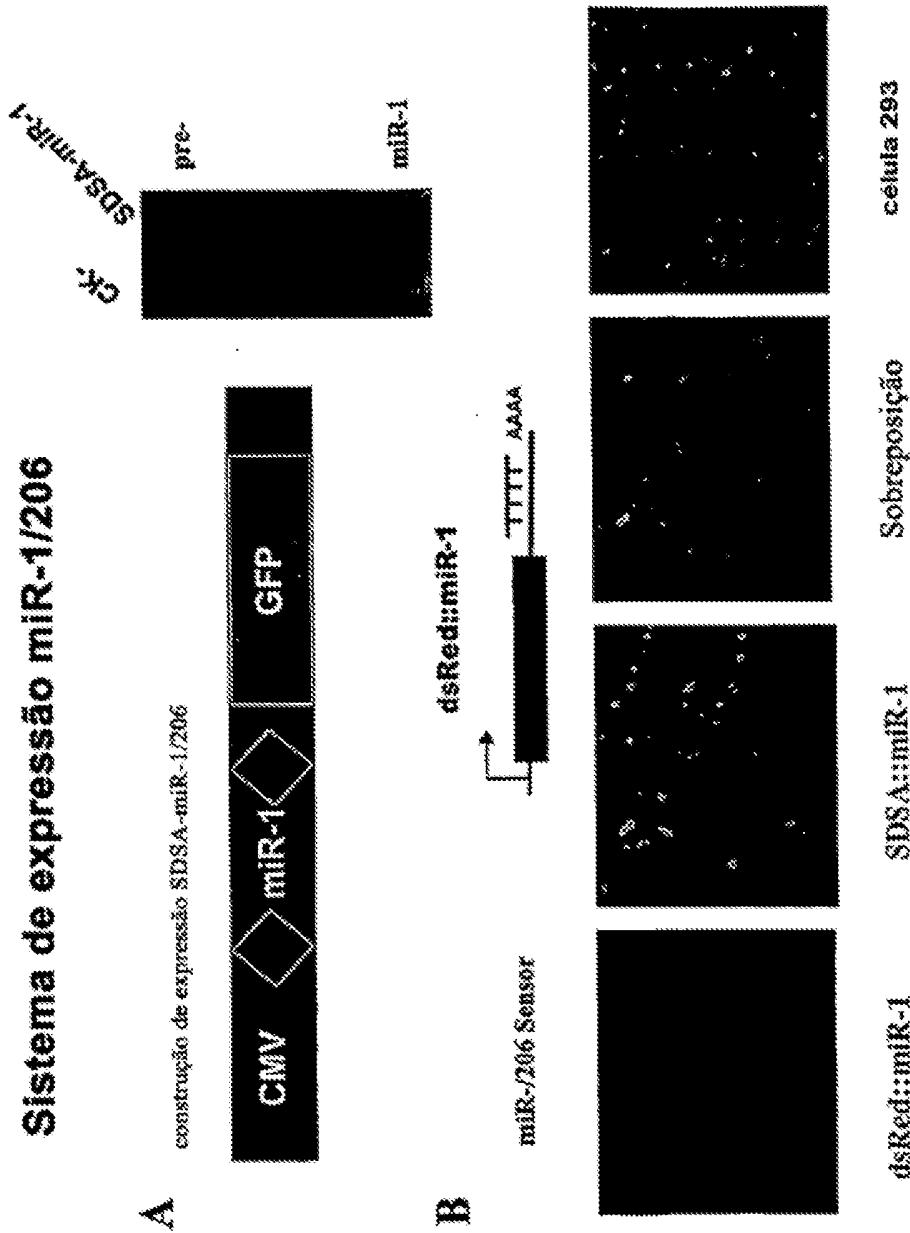
**Sistema de expressão miR-1/206**

Figura 24

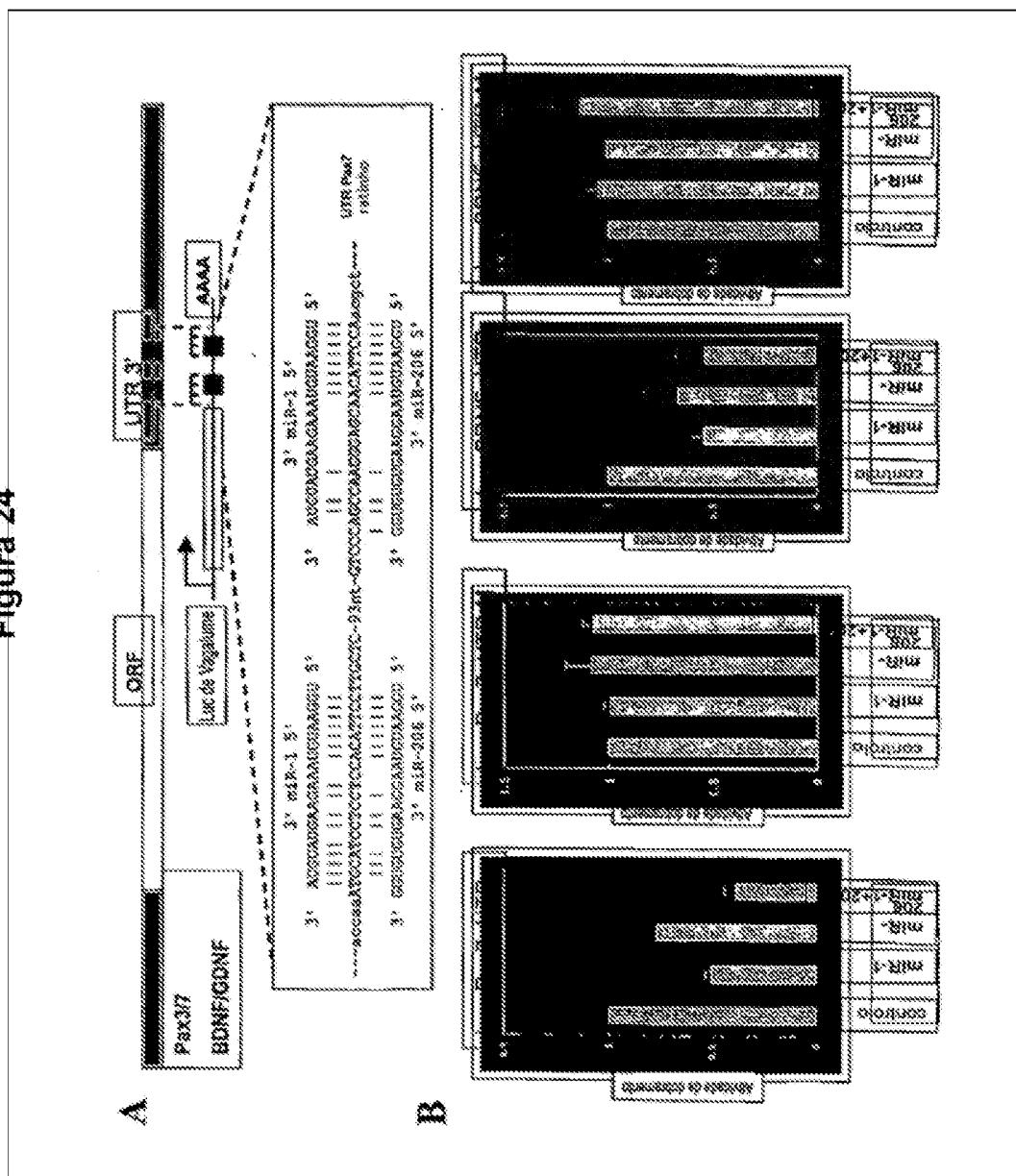


Figura 25

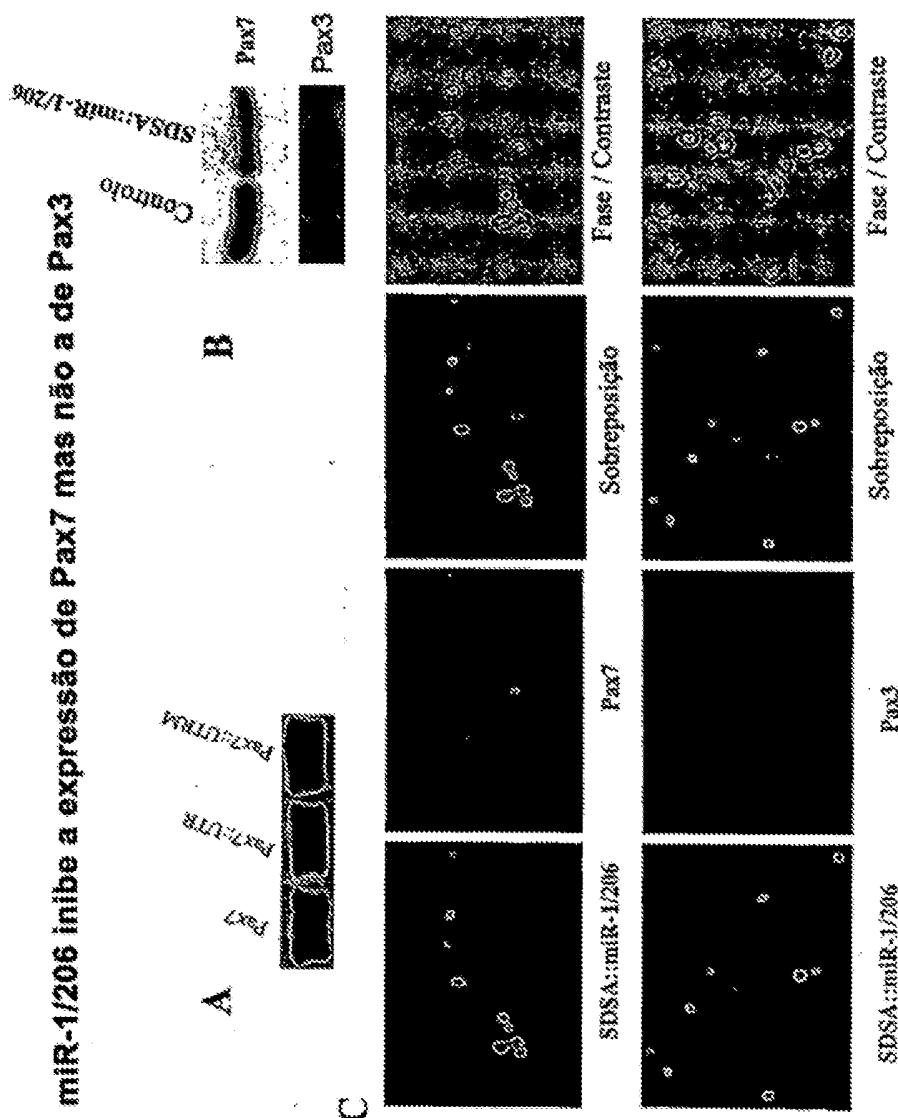


Figura 26

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

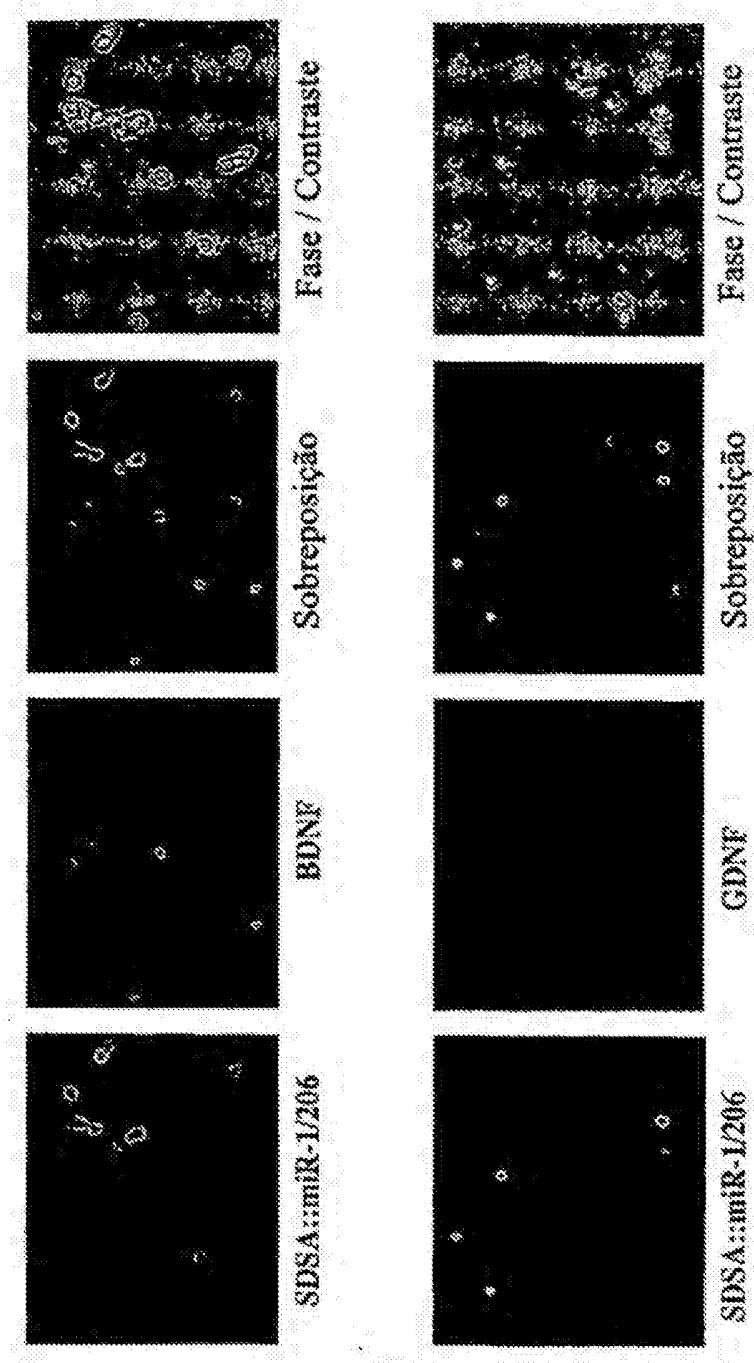


Figura 27

miR-1/206 inibe proliferação de célula satélite

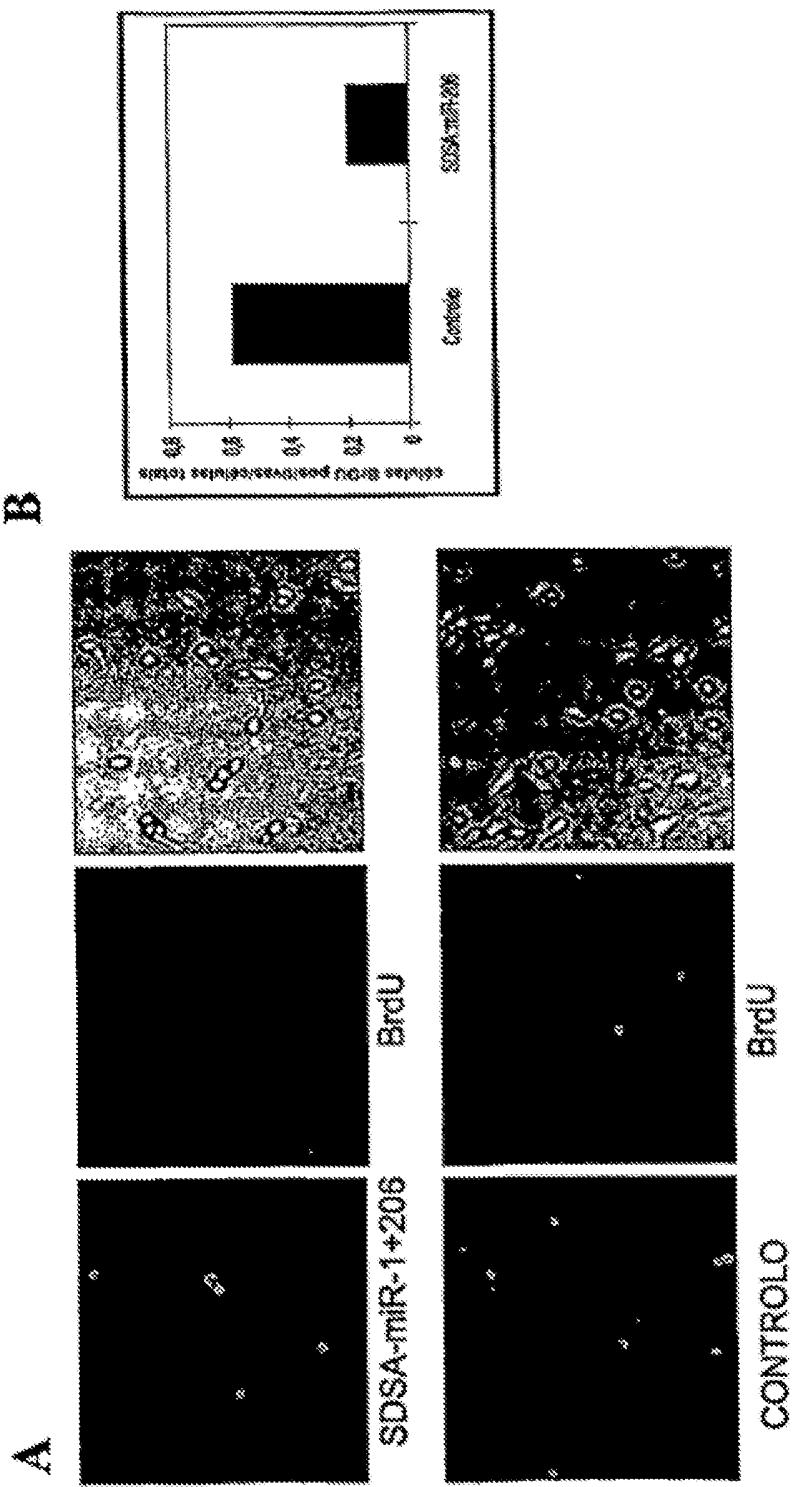


Figura 28

miR-1/206 melhora a diferenciação de célula satélite

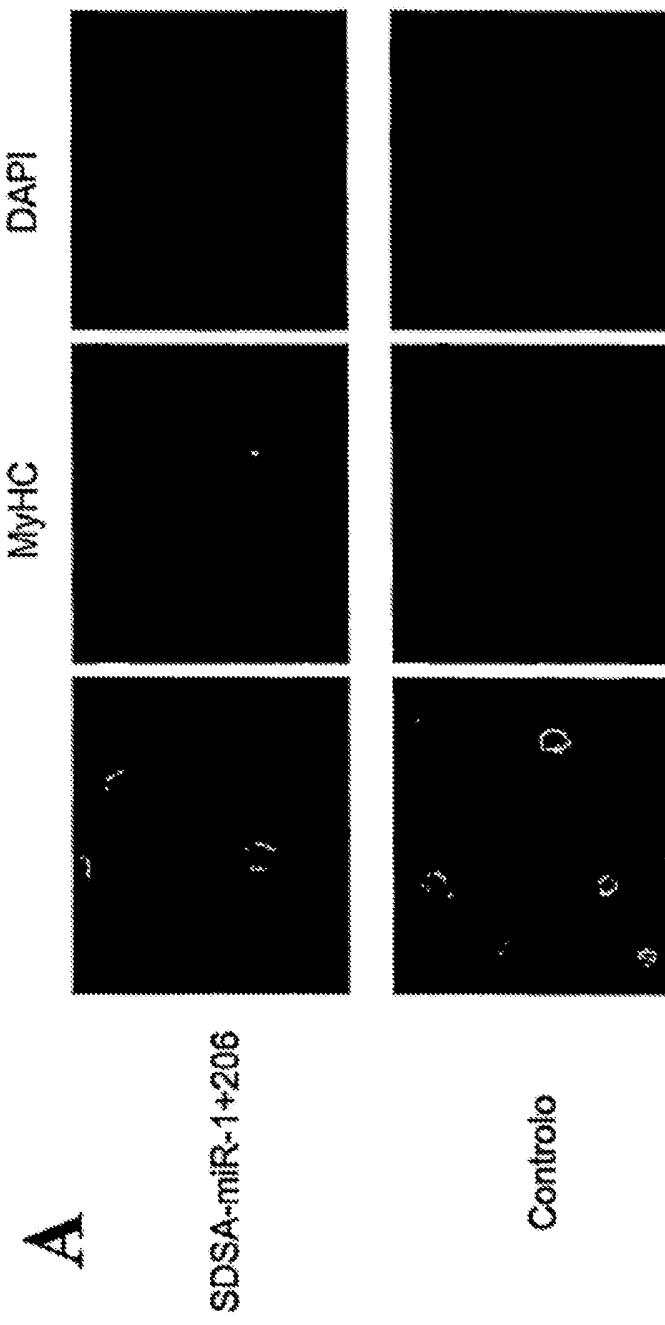


Figura 28

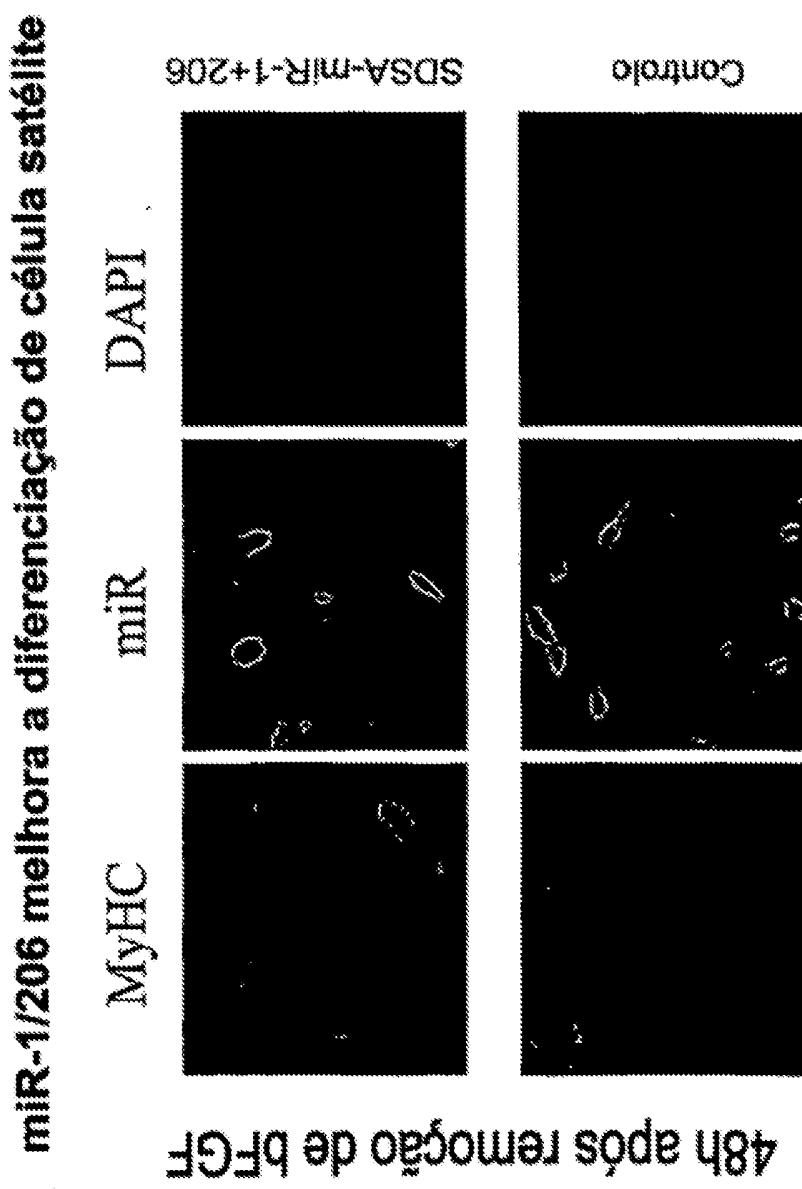
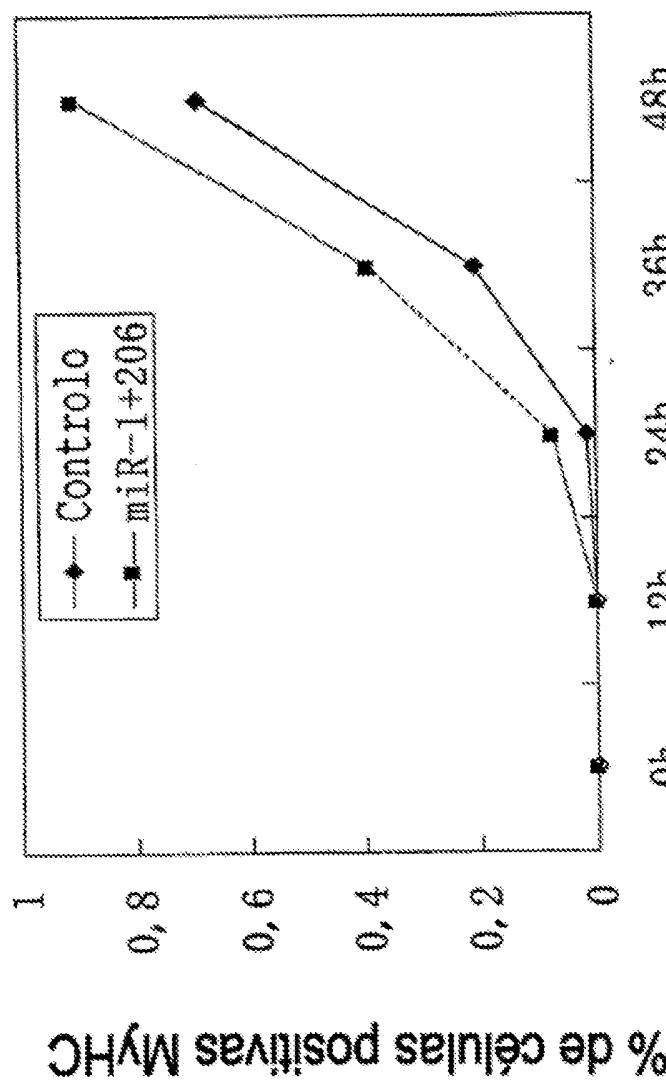


Figura 29

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



Horas após remoção de bFGF

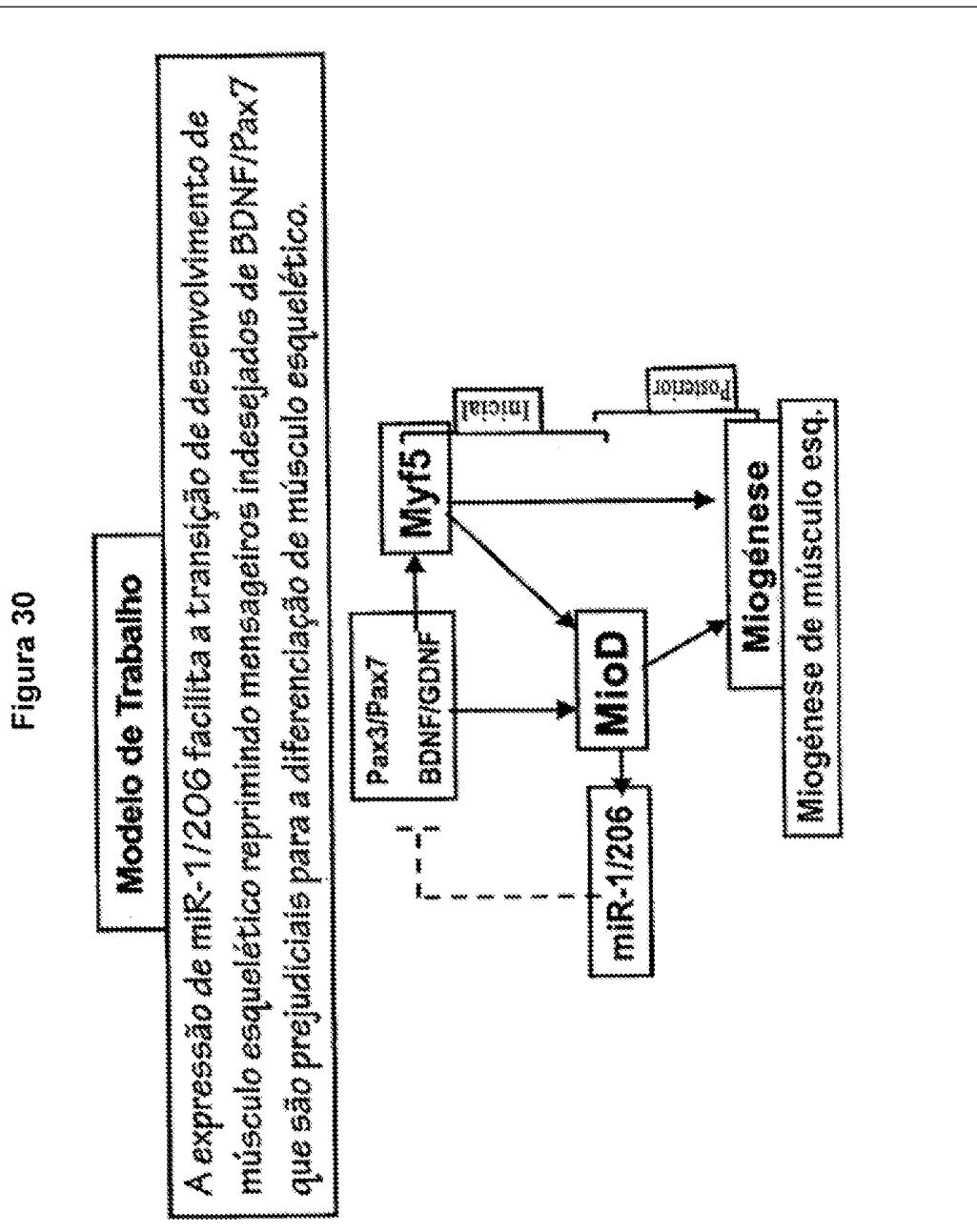


FIGURA 30