



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (ICBS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIEGO DE SIQUEIRA FIGUEREDO

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS CANDIDATOS A MODULAÇÃO DE RITMOS
CIRCADIANOS:

ANÁLISE IN SILICO E DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LEUCÓCITOS
HUMANOS ISOLADOS AO LONGO DO PERÍODO CIRCADIANO.

MACEIÓ
2013



DIEGO DE SIQUEIRA FIGUEREDO

IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS CANDIDATOS A MODULAÇÃO DE RITMOS
CIRCADIANOS:

ANÁLISE IN SILICO E DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LEUCÓCITOS
HUMANOS ISOLADOS AO LONGO DO PERÍODO CIRCADIANO.

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em ciências da saúde, do instituto de ciências biológicas e da saúde (ICBS) da universidade federal de Alagoas (UFAL), para a obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

Orientador: Dr. Tiago Gomes de Andrade.

MACEIÓ
2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

F475i Figueredo, Diego de Siqueira.
Identificação de microRNAs candidatos a modulação de ritmos circadianos :
análise in silico e de expressão gênica diferencial em leucócitos humanos
isolados ao longo do período circadiano / Diego de Siqueira Figueredo. – 2013.
104 f. : il.

Orientador: Tiago Gomes de Andrade.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 75-99.

1. Leucócitos humanos. 2. MicroRNAs. 3. RNAs não codificados. 4. Genes
endógenos. 5. Bioinformática. 6. Mamíferos. I. Título.

CDU: 573:004



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppqcs@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado do mestrando Diego de Siqueira Figueredo, intitulada: "Identificação de microRNAs candidatos a modulação de ritmos circadianos: Análise in silico e de expressão gênica diferencial em leucócitos humanos isolados ao longo do período circadiano", orientado pelo Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 27 de março de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram o candidato

Aprouado

Banca Examinadora:

Agostino Petica

Prof.ª Dr.ª Patricia Verónica Agostino – (Universidad Nacional de Quilmes - Argentina)

[Signature]

Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitai - (ICBS/UFAL)

[Signature]

Prof.ª Dr.ª Salete Smarlotto – (ICBS/UFAL)

“Dedico todos os achados e crescimento pessoal a meus pais, irmãos, companheira (Graziela) e a todos que acreditam na ciência.”

Agradecimentos

- Ao Dr. Tiago Gomes de Andrade por sua orientação, confiança e experiência transmitida;
- Ao Dr. Daniel Leite Góes Gitaí pelo zelo em sua co-orientação, confiança depositada e experiência transmitida;
- Aos professores Dr. Renato Santos Rodarte, Dr. Luiz Antonio Ferreira da Silva, Dr. Emiliano de Oliveira Barreto e Dr. Daniel Leite Góes Gitaí por terem possibilitado acesso aos laboratórios de pesquisa;
- A todos os colaboradores que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho com a doação de sangue e questionários respondidos;
- Aos Amigos dos laboratórios LABMEG (Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica), biologia celular e molecular/ICBS e de biologia celular/Severinão por todo acolhimento;
- A mestranda Bruna P. Santos pelo auxílio dado para coleta de material biológico;
- Ao amigo Francisco Bruno de Lima Vale por todo suporte;
- Aos meus pais pelo carinho e dedicação;
- A Maria Graziela Gomes da Silva por acreditar nos meus sonhos como se fossem seus;
- Aos meus irmãos Thalita Nayane de Siqueira Figueredo e Wagner de Siqueira Figueredo.

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”
(Albert Einstein).

“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro.”
(René Descartes).

"Nada em biologia faz sentido a não ser sob a luz da evolução."
(Theodosius Dobzhansky)

RESUMO

Existem poucas evidências sobre o envolvimento de microRNAs (miRs) na regulação de ritmos circadianos, embora estas moléculas possam participar de maneira importante dos controles pós-transcricional e traducional do sistema de temporização circadiano. O presente trabalho teve como objetivo principal identificar miRs candidatos a regulação de ritmos biológicos através de ferramentas de bioinformática e análise do perfil de expressão diário de miRs em leucócitos humanos isolados ao longo de um período circadiano. Além disto, investigamos a estabilidade de expressão de 6 RNAs não codificantes (RNU6-2, RNUA1A-1, RNU5A-1, SNORA-73A, SNORD-25 e SCARNA-17) para serem utilizados como potenciais normalizadores das reações de RT-qPCR. Dos 69 miRs identificados pelas ferramentas de bioinformática, 23 foram relacionados com ritmos circadianos em estudos prévios. Além disso, alguns miRs são preditos como regulados por fatores de transcrição circadianos, como CLOCK/BMAL, e possuem, segundo informações da literatura, alvos validados associados a ritmos biológicos. miR-9, miR-24, miR-25, miR-26, miR-27, miR-29, miR-93, miR-211, miR-302 e miR-346 são exemplos destes miRs identificados. Com base nestes resultados, miR-27b, que apresenta alvos validados relacionados ao sistema imune e a ritmos circadianos, foi selecionado para validação experimental utilizando leucócitos como modelo de estudo. Também selecionamos miR-16 e miR-181, devido à sua relevância conhecida para o sistema hematopoético, além de *Per3* que possui expressão diária conhecida neste tecido. Os dados foram normalizados com SNORA-73A, que apresentou maior estabilidade entre os genes endógenos estudados. miR-27b, miR-16, miR-181a, RNU1A-1, RNU6-2, RNU5A-1, SCARNA-17 e SNORD-25 apresentaram variações diárias em suas expressões. Estes resultados representam, ao nosso conhecimento, as primeiras descrições de RNAs não codificantes com variação diária na expressão em tecido humano. Estudos funcionais posteriores podem esclarecer o papel destes candidatos identificados na regulação de ritmos circadianos.

Palavras-chaves: Variações diárias. Regulação pós-transcricional. MiRs. RNAs não-codificantes. Mamíferos. Leucócitos. Genes endógenos. Bioinformática.

ABSTRACT

There are few evidences on the involvement of microRNAs (miRs) in the regulation of circadian rhythms, although these molecules are able to participate in an important manner of post-transcriptional and translational controls of circadian system. The present study aimed to identify candidates miRs for regulation of biological rhythms using bioinformatics tools and expression profile analysis of miRs in human leukocytes isolated over a circadian period. In addition, we investigated the stability of expression of six non-coding RNAs (RNU6-2, RNUA1A-1, RNU5A-1, SNORA-73A, and SCARNA SNORD-25-17) as potential housekeeping genes for RT-qPCR . Of the 69 identified miRs by bioinformatics tools, 23 were related to circadian rhythms in previous studies. Furthermore, some miRs are predicted as regulated by circadian transcription factors such as CLOCK/BMAL1 and have, according to the literature, validated targets associated with biological rhythms. miR-9, miR-24, miR25, miR-26, miR-27, miR-29, miR-93, miR-211, miR-302 e miR-346 are examples of identified miRs. miR-27b, which has validated targets related to the immune system and circadian rhythms, was selected for experimental validation using leukocytes as an experimental model. We also selected miR-16 and miR-181 because of its relevance to the hematopoietic system and *Per3* that has daily variations in this tissue. The data were normalized with SNORA-73A, the most stable housekeeping gene. miR-27b, miR-16, miR-181a, RNU1A-1, RNU6-2, RNU5A-1, and SNORD SCARNA-17-25 showed daily variations in their expressions. These results represent, to our knowledge, the first description of non-coding RNAs with daily variation in humans. Further functional studies may elucidate the role of these identified miRs in the regulation of circadian rhythms.

Keywords: Daily variations. Post-transcriptional regulation. Mirs. Non-coding RNAs. Mammalian. Leukocytes. Housekeeping gene. Bioinformatics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Leucograma dos sujeitos incluídos na pesquisa.	30
Tabela 2 - Quantificação das amostras de RNA de leucócito total obtidas com <i>kit miRNeasy</i>	34
Tabela 3 - miRs preditos para camundongos e humanos usando a combinação dos três programas	40
Tabela 4 - miRs candidatos para regulação circadiana selecionados com base nos estudos de bioinformática e busca na literatura de alvos validados.	42
Tabela 5 - miRs candidatos que apresentam sítios para fatores de transcrição do relógio em seus promotores	49
Tabela 6 - Análise descritiva dos dados de expressão gênica dos sujeitos com <i>cosinor</i> significativo.	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do oscilador central e alguns osciladores periféricos humanos	16
Figura 2 - Representação do relógio molecular de mamíferos	19
Figura 3 - Amostras de RNAs extraídos de leucócito através do <i>Kit miRNeasy</i>	33
Figura 4 - Alças propostas para os genes hematopoiéticos miR-16 e miR-181a	51
Figura 5 - Alças de retroalimentação predita para para o relógio circadiano de mamíferos	52
Figura 6 - Análise da estabilidade com todos os genes de referência	54
Figura 7 - Análise da estabilidade dos genes de referência após a exclusão dos genes RNU1A-1, RN5A-1, RNU6A-2 e <i>Per3</i> , mais instáveis para <i>geNorm</i> e <i>Normfinder</i> .	55
Figura 8 – Variações inter-individual da expressão gênica	56
Figura 9 – Variações inter-grupo da expressão gênica	57
Figura 10 – Variações intra-grupo da expressão gênica	58
Figura 11 – Perfil de expressão de <i>Per3</i> após a normalização com SNORA-73A ou RNU1A-1	59
Figura 12 - Variações diárias dos miRs e genes endógenos em leucócito	61
Figura 13 - Representação gráfica do <i>fold change</i> dos picos de expressão em relação ao <i>nadir</i> (Amostra calibrador).	62
Figura 14 - Análise individual do perfil de expressão diária dos genes em leucócito total	63
Figura 15 - Dados das curvas coseno ajustadas obtidos através do programa <i>Acrophase</i> .	64

LISTA DE ABREVIATURAS

miR	microRNA.
μL	Micro litro.
3'UTR	3' Untranslated region.
g	Aceleração da gravidade.
mL	Mililitro.
NSQ	Núcleo supraquiasmático - Par de núcleos da porção anterior do hipotálamo que tem sido identificado como um dos relógios biológicos circadianos no sistema nervoso central de vertebrados.
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cell.
PMNs	Polymorphonuclear cells.
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.
RNA_m	RNA mensageiro.
RPM	Rotações por minuto.
snRNAs	Small nuclear ribonucleic acid.
V	Volts.
hsa	<i>Homo sapiens</i> .
Dme	<i>Drosophila melanogaster</i> .
Gga	<i>Galus galus</i> .

SUMÁRIO	
INTRODUÇÃO	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Controle Endógeno de Ritmos Circadianos	14
1.2 Genes do Relógio	17
1.3 Envolvimento de genes circadianos em processos fisiológicos e comportamentais	20
1.4 Participação de miRs como reguladores pós-transcricionais da ritmicidade biológica	20
1.5 Ritmos Circadianos em Sangue	23
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Análises de bioinformática	28
3.1.1 Identificação de miRs com sítio alvo em genes circadianos	28
3.1.2 Identificação de sítios para fatores de transcrição no promotor de miRs candidatos	28
3.2 Seleção dos Sujeitos da Pesquisa e coleta de sangue	29
3.3 Extração de RNAm de Sangue Periférico com Kit <i>miRNeasy</i> (Qiagen, USA)	31
3.4 Quantificação e análise da integridade do RNA	32
3.5 Síntese de cDNA <i>miScript Reverse Transcription Kit</i> (Qiagen, USA)	35
3.6 Ensaio de expressão gênica	35
3.6.1 Identificação de genes de referência	35
3.6.2 Reações de RT-qPCR	37
3.6.3 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Análises de Bioinformática	39
4.2 Ensaio de expressão gênica	53
4.2.1 Identificação de genes de referência	53
4.2.2 Expressão relativa em leucócito total	59
5 DISCUSSÃO	65
5.1 Identificação de miRs candidatos ao controle circadiano	65
5.2 Análise da estabilidade dos genes de referência	69
5.3 Variações diárias na expressão gênica	71
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
GLOSSÁRIO	100
ANEXOS	102
Anexo 1 Eficiência de amplificação das reações de RT-qPCR	97
Anexo 2 Curvas de <i>Melt</i>	98
Anexo 3 Artigo publicado em abril de 2013 na revista <i>Journal Biological Rhythms</i>	99

INTRODUÇÃO

Os ritmos circadianos, ou seja, aqueles que apresentam uma frequência de ocorrência de aproximadamente 24 horas, são em última instância o reflexo de alças de retroalimentação moleculares cujos componentes são genes expressos ciclicamente nas células. Muitas das proteínas do relógio atuam como fatores de transcrição, associando-se a regiões específicas do promotor de diversos genes. Com isto, estima-se que uma parte significativa do transcriptoma e do proteoma de organismos dotados de um relógio biológico endógeno (ou sistema de temporização) seja expressa ciclicamente e que suas funções sejam as mais diversas. Além disto, a expressão dos genes do relógio é ubíqua e vários tecidos apresentam oscilações circadianas na expressão gênica.

Em adição ao seu papel central na geração de ritmos circadianos, trabalhos recentes têm demonstrado que estes genes podem afetar uma ampla variedade de processos fisiológicos e comportamentais. A maioria das vias reguladas pelo relógio corresponde a processos metabólicos fundamentais, como síntese e tráfego intracelular de proteínas, metabolismo energético, sinalização celular, glicólise, metabolismo de ácidos graxos, biosíntese de colesterol, síntese e adição de aminoácidos, etc. Alterações nos genes do relógio foram associadas a diversos distúrbios metabólicos, psiquiátricos e cânceres. Estes dados, acoplados à autonomia celular apresentada pelos osciladores circadianos, sugerem que seus mecanismos genéticos são fundamentais na manutenção das funções celulares. Desta forma seu conhecimento pode ajudar a elucidar vias moleculares associadas a muitas patologias.

MicroRNAs (miRNAs ou miRs) compreendem uma classe numerosa e filogeneticamente extensa de pequenas moléculas de RNA não-codificantes, fita simples, que anelam em seqüência das regiões não traduzidas 3'UTR (3' *Untranslated region*) de RNAm alvo, modulando a expressão gênica em nível pós-transcricional e traducional. É possível que os eventos transcricionais das alças de retroalimentação envolvidos na geração dos ritmos circadianos induzam a expressão de um grupo de miRs, que por sua vez regulariam a expressão de proteínas relacionadas com aspectos centrais destes fenômenos cíclicos. O conhecimento sobre o envolvimento de miRs na regulação dos ritmos circadianos ainda é muito restrito e a literatura limita-se a trabalhos com alguns modelos animais e poucos miRs. Não existem estudos publicados em humanos sobre miRs com expressão circadiana ou

variações diárias *in vivo*. Não se conhece, conseqüentemente, nenhum miR que tenha este padrão de expressão em qualquer tecido humano.

O presente trabalho apresenta um conjunto de RNAs não codificantes candidatos a moduladores de ritmos circadianos, identificados através das seguintes abordagens: a) Estudos de bioinformática para a busca de sítios alvos de miRs em regiões 3'UTR de genes do relógio, ou genes que apresentam variações circadianas apenas em níveis protéicos e de *motifs* para fatores de transcrição do relógio nas sequências promotoras dos miRs identificados após a primeira abordagem; b) Análise, através de experimentos de RT-qPCR, do perfil de expressão de miRs e de outros RNAs não codificantes ao longo de um período circadiano.

Os resultados apresentam um conjunto de miRs preditos como moduladores de genes do sistema temporizador circadiano de mamíferos, bem como miRs que podem ser modulados circadianamente via fatores de transcrição do próprio relógio. A análise da estabilidade da expressão dos genes de referência revela que SNORA-73A é, dentre os genes estudados, o mais estável. Os dados obtidos nos experimentos de expressão relativa demonstram que miR-27b, miR-16, miR-181a, RNU1A-1, RNU6-2, RNU5A-1, SCARNA-17 e SNORD-25 apresentaram variações diárias em suas expressões. Ao nosso conhecimento, estes são os primeiros dados de variações diárias de miRs e de outros RNAs não-codificantes descritos em tecidos humanos.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Controle Endógeno de Ritmos Circadianos

Ritmos Circadianos (do grego *circa* – aproximado; e *dian* – dia), são ritmos compreendidos entre 24 horas, como níveis de expressão gênica, de cortisol, de melatonina, temperatura corporal, comportamento alimentar, reprodutivo, ciclo celular, pressão sanguínea, performance cognitiva, ciclo vigília e sono em humanos, atividade e repouso em animais, dentre outros (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003; LI *et al.*, 2011; LV *et al.*, 2012). Desta forma, os ritmos circadianos regulam uma gama de processos biológicos em diversos seres vivos (LOWREY e TAKAHASHI, 2004; BELL-PEDERSEN *et al.*, 2005; LV *et al.*, 2012) que podem ser eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais importantes para sobrevivência (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003; PEREIRA, TUFIK e PEDRAZZOLI, 2009; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012).

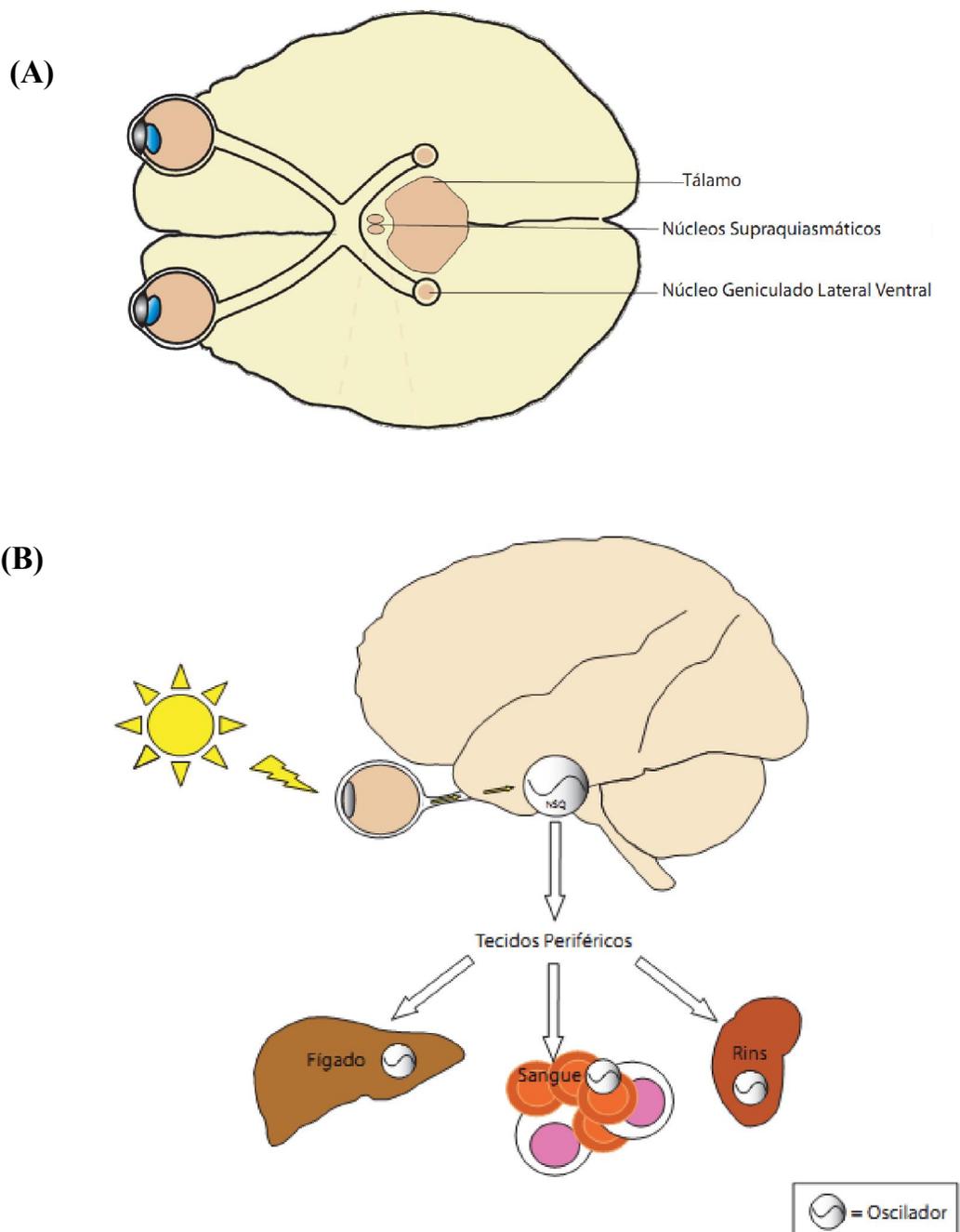
Por razões adaptativas, tal como a exposição dos primeiros organismos a radiação ultravioleta, que é capaz de desnaturar moléculas de DNA e proteínas, a vida teve que prever as mudanças ambientais por meio de um relógio biológico que possibilitou um funcionamento paralelo ao ambiente e que forneceu previsão de alterações ambientais cíclicas que possibilitam perdas energéticas mínimas (PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012). Embora sejam sincronizados por fatores externos (*Zeitgebers* ou doadores de tempo), como oscilações na intensidade de luz, de temperatura, sons, odores e alimentação, estes ritmos persistem sem pistas ambientais, como em condição de escuro constante durante vários dias (Livre curso ou *Freerunning*), o que os caracterizam como ritmos endógenos (LI *et al.*, 2011; LV *et al.*, 2012; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012).

Em mamíferos, o relógio biológico, marca-passo (*Pacemaker*) ou oscilador central, situa-se bilateralmente na base do hipotálamo, abaixo do terceiro ventrículo e acima do quiasma óptico, constituído por dois núcleos compostos por aproximadamente 10.000 neurônios cada, os núcleos supraquiasmáticos (NSQ ou *SNC* – *Suprachiasmatic Nucleus*) (Figura 1-A) (ANTLE e SILVER, 2005; HERZOG, 2007; MARKUS *et al.*, 2007; BARRY e TOWNSEND, 2010; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012). Cada neurônio do NSQ atua como um oscilador independente, gerando um ritmo circadiano em sua atividade elétrica, que quando acopladas geram um sinal para o resto do organismo (Figura 1-B) (HERZOG, 2007; MARKUS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2011; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012).

O comprometimento da atividade dos NSQ por lesão física ou mutações em genes importantes para a atividade rítmica dos neurônios que compõem estas estruturas, abole a maioria dos ritmos do organismo, podendo até alterar ou comprometer aqueles presentes em tecidos periféricos (CAZAROLLI *et al.*, 2012; RIEKES *et al.*, 2012). Além disto, o transplante destes núcleos para outro animal confere um padrão rítmico semelhante ao do doador (CAZAROLLI *et al.*, 2012; IYOMASA *et al.*, 2012; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012; PEREIRA e BERNARDIN, 2012). Em cultura *slices* os neurônios do NSQ apresentam oscilações com período e fase similar (BARRY e TOWNSEND, 2010). Quando isoladas, essas células são capazes de manter uma oscilação independente que persiste por até duas semanas (BARRY e TOWNSEND, 2010).

Portanto, os ritmos circadianos fazem parte de um sistema composto por uma entrada (*input*), representado por fatores ambientais (Luz, temperatura, etc) que sincronizam o oscilador central (NSQ) com os ritmos do ambiente. O NSQ, por sua vez, modula (*output*) o padrão rítmico dos diversos processos fisiológicos ou comportamentais do organismo. Em resumo, as conexões que os neurônios dos NSQ apresentam com as demais células do sistema nervoso central estabelecem vias de saída que regula a ritmicidade do organismo (Figura 1/B).

Figura 1 – Representação do oscilador central e alguns osciladores periféricos humanos



(A) Corte transversal demonstrando a localização do oscilador central (NSQ) no cérebro humano. (B) Representação simplificada de vias de sincronização dos NSQ através de variações na intensidade de luz. Além disso, ressalta-se o papel dos NSQ na modulação dos osciladores periféricos. Fonte: Autor, 2013.

1.2 Genes do Relógio

No nível celular, os ritmos apresentam-se, por exemplo, em alterações cíclicas das membranas, na fosforização de peptídeos, níveis de RNA, atividade da enzima RNA polimerase II e nos níveis de compactação de cromatina (WEI *et al.*, 2011; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012; PEREIRA, L. J. *et al.*, 2012; THIERS *et al.*, 2012). Estudos realizados demonstram que 3-10% do transcriptoma está sob regulação circadiana que seria coordenada por genes centrais do relógio (PANDA *et al.*, 2002; ANTLE e SILVER, 2005; DARDENTE e CERMAKIAN, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

A primeira evidência genética no controle da ritmicidade circadiana surgiu em 1971 com moscas drosófilas mutantes que apresentaram três linhagens para ritmicidade locomotora anormal, uma arritmica, uma com período endógeno curto e outra com período longo (WEI *et al.*, 2011; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012; PEREIRA, L. J. *et al.*, 2012; THIERS *et al.*, 2012). Em seguida, foi sugerida a regulação genética em mamíferos, com o primeiro estudo realizado com proles de um hamster anormal para a regulação circadiana, com fenótipos diferentes para o período endógeno do ciclo de atividade e repouso (WEI *et al.*, 2011; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012; PEREIRA, L. J. *et al.*, 2012; THIERS *et al.*, 2012). Contudo, somente em 1994, após a indução de mutações em camundongos, foi identificado o primeiro gene envolvido na regulação da ritmicidade circadiana de mamíferos, sendo denominado *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) (WEI *et al.*, 2011; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012; PEREIRA, L. J. *et al.*, 2012; THIERS *et al.*, 2012).

Estudos posteriores possibilitaram a identificação de outros genes caracterizados como constituintes do relógio molecular circadiano, tais como *Bmal1* (LABRIQUE *et al.*, 2012), os genes homólogos *Per1*, *Per2*, e *Per3* (DOLFINI *et al.*, 2009; AUGUSTO *et al.*, 2012; SIOPA *et al.*, 2012), os genes *Cry 1e* e *Cry 2*, (CAVALCANTI *et al.*, 2012; GLADINE *et al.*, 2012), *Rev-Erb* (PREITNER *et al.*, 2002; PREITNER *et al.*, 2003), *Ror* (Sato *et al.*, 2004), os genes *Dec 1* e *Dec 2* (HONMA *et al.*, 2002), *Tim* (FERREIRA *et al.*, 2012; PEREIRA, R. J. *et al.*, 2012). Além destes, as quinases CKI ϵ e CK δ também participam do controle molecular da ritmicidade atuando em vias de degradação rítmica de proteínas (LOWREY e TAKAHASHI, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

As proteínas CLOCK e BMAL1 formam um heterodímero (CLOCK:BMAL1) que atua como fator de transcrição graças a presença do domínio *basic-helix-loop-Helix*, que

possibilita a sua associação com elementos regulatórios (E-box) no promotor dos demais genes do relógio *Per 1*, *Per 2*, e *Per 3*, *Cry 1*, *Cry 2*, *Dec 1*, *Dec 2*, *Rev-Erb α* , *Rev-Erb β* , *Rora/b/c* e dos CCGs (*Clock Control Genes* ou Genes Regulados pelo Relógio) (WEI *et al.*, 2011; PEREIRA, C. M. *et al.*, 2012; PEREIRA, L. J. *et al.*, 2012; THIERS *et al.*, 2012). Estes últimos tem funções variadas, estando associados com a modulação temporal de diversos processos biológicos (Figura 2) (Lowrey and Takahashi, 2004; Shearman *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2008).

Tendo seus níveis elevados, as proteínas PERs e CRYs também formam heterodímeros (PER:CRY) , que atuam na inibição da atividade de CLOCK:BMAL1, ou seja, seu próprio ativador transcricional (Figura 2). A inativação de CLOCK:BMAL1 ocasiona a diminuição da transcrição de todos os genes do relógio. Com o decaimento dos níveis de PER e CRY devido à ausência de transcrição e degradação protéica decorrente da atividade da quinases CKI ϵ e CK δ , CLOCK:BMAL1 retoma a sua atividade na ativação da transcrição gênica, ou seja o ciclo é reiniciado (TAKAHASHI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011). Além disto, os genes *Rev-Erbs* e *Rors* atuam na regulação transcricional do seu próprio regulador, o gene *Bmall*. As proteínas REV-ERBs e RORs competem pelo mesmo sítio RORE (*response elements*) no promotor de *Bmall*. REV-ERB inibe a expressão de *Bmall* e RORa ativa (Figura 2) (TAKAHASHI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011).

Desta forma, o mecanismo é composto por duas importantes alças de retroalimentação, uma positiva, caracterizada pela ativação da transcrição gênica via CLOCK:BMAL1 e uma negativa caracterizada pela inibição da expressão através da atividade de PER:CRY (Figura 2) (Albrecht, 2012; Takahashi *et al* 2008; Pereira *et al* 2009; Sehgal 2004).

1.3 Envolvimento de genes circadianos em processos fisiológicos e comportamentais

Estudos recentes têm revelado que os genes centrais do relógio apresentam expressão em diversos tecidos, controlando uma grande variedade de processos biológicos, tanto no sistema nervoso central como em outros órgãos como fígado, rim, pele, sangue periférico, coração, dentre outros (PANDA *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2008; AVILA-MORENO, URREA e ORTIZ-QUINTERO, 2011; CARONI *et al.*, 2012; NICHIATA *et al.*, 2012; PORTELLO *et al.*, 2012; QUELUZ *et al.*, 2012).

Estes genes têm sido associados, por exemplo, à preferência pelo período de atividades (cronotipo) e diversas patologias em humanos. Estudos demonstram uma associação entre cronotipos vespertinos e o gene *Clock* (PAL *et al.*, 2012; PALMA, C. *et al.*, 2012) e *Per1-2* com preferência diurna (LOURENCO *et al.*, 2012; PEREIRA, C. *et al.*, 2012). Os genes do relógio têm sido associados a síndrome do avanço da fase do sono (*familial advanced sleep phase syndrome, FASPS*) (SATO *et al.*, 2003; TENA *et al.*, 2011) e com a síndrome do atraso da fase do sono (*delayed sleep phase syndrome, DSPS*), além de preferência diurna extrema (EBISAWA *et al.*, 2001; ARCHER *et al.*, 2003; JOHANSSON *et al.*, 2003; TAKANO *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2005).

Outros estudos tem investigado a relação entre alterações em ritmos biológicos com obesidade, hipertensão, diabetes tipo 2, esquizofrenia, epilepsia, distúrbio bipolar, depressão, desordem afetiva sazonal (SAD), Síndrome de Down, doença de Parkinson, Alzheimer, narcolepsia, asma, hipertensão, gastrite, déficit de atenção, câncer, abuso de crack e álcool (MCCLUNG *et al.*, 2005; SPANAGEL *et al.*, 2005; TUREK *et al.*, 2005; MANSOUR *et al.*, 2006; ARTIOLI *et al.*, 2007; MCCLUNG, 2007; PARTONEN *et al.*, 2007; WOON *et al.*, 2007; BARNARD e NOLAN, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2008; DALLMANN e WEAVER, 2010)

1.4 Participação de miRs como reguladores pós-transcricionais da ritmicidade biológica.

A depender do gene do relógio e do tecido, podem ser observadas variações diárias ou expressão circadiana nos níveis de RNAm e proteínas, que são fundamentais para a manutenção da ritmicidade endógena (Takahashi *et al.*, 2008). Curiosamente, estima-se que o número de proteínas com expressão circadiana é bem maior que o de RNAm, e que boa parte destas proteínas apresenta transcritos com níveis constitutivos (REDDY *et al.*, 2006). Estes dados reforçam a hipótese da participação de vias de regulação pós-transcricionais,

traducionais e pós-traducionais para a manutenção o perfil cíclico de proteínas em diversos tecidos, incluindo o NSQ. De fato, alterações pós-traducionais já descritas, como a fosforilação rítmica das proteínas PER, BMAL1 e CRY, alteram sua estabilidade e seus níveis celulares ao longo do dia, sendo indispensáveis ao relógio circadiano (KO e TAKAHASHI, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2008)

Os miRs são pequenos transcritos (20 à 22 nucleotídeos), não codificantes, que hibridizam em regiões 3' não traduzidas (3' *untranslated regions* ou 3'UTRs) de um RNAm alvo (HE e HANNON, 2004; FILIPOWICZ, BHATTACHARYYA e SONENBERG, 2008). Quando o pareamento entre RNAm e miR é incompleto, o processo de tradução no ribossomo é reprimido. Por outro lado, quando ocorre um pareamento de bases completo, o transcrito alvo é degradado através da ação do complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Filipowicz *et al.*, 2008; He and Hannon, 2004). Estima-se que até 30% de genes que codificam proteínas sejam regulados por miRs (LEWIS, BURGE e BARTEL, 2005) e que estes estariam envolvidos em vários processos biológicos como controle do desenvolvimento, apoptose, proliferação celular e tumorgênes (WIENHOLDS e PLASTERK, 2005) (Wienholds and Plasterk, 2005). Estes elementos poderiam, portanto, contribuir com a regulação pós-transcricional e traducional da expressão circadiana protéica.

Estudos recentes têm demonstrado miRs candidatos a modulação da expressão circadiana de proteínas do relógio em diversos organismos, como *Arabidopsis* (JUNG *et al.*, 2007; SIRE *et al.*, 2009; KIM e SOMERS, 2010), *Drosophila* (YANG *et al.*, 2008; KADENER *et al.*, 2009; LUO e SEHGAL, 2012)), aves (SHI, KO e KO, 2009), camundongos (CHENG *et al.*, 2007; ALVAREZ-SAAVEDRA *et al.*, 2011) e em humanos (NEGRAO-CORREA *et al.*, 2012).

Em aves, gga-miR-26a apresenta expressão rítmica regulada pelos genes *Clock* e *Creb*, e participa do controle circadiano dos níveis do fotorreceptor L-VGCC α 1C (SHI, KO e KO, 2009). Em *Drosophila*, dme-miR-263a e dme-miR-263b apresentam expressão circadiana (Yang *et al.*, 2008) e dme-miR-279 foi associado com o controle do ritmo de atividade e repouso do animal (Luo and Sehgal, 2012).

Ensaio realizados em cultura de células NIH3T3 demonstram que o cluster miR-192/194 regula os genes do relógio *Per1*, *Per2* e *Per3* (NAGEL, CLIJSTERS e AGAMI, 2009), e que miR-17-5p e miR-519e regulam NPAS2 (WANG, F. R. *et al.*, 2011). Em mamíferos, foi demonstrado que miR-152 e miR-494 apresentam uma oscilação circadiana

em soro de camundongos, com picos bimodais, ou seja, em fases distintas do ciclo, e que tanto miR-494, quanto miR-142-3p regulam a expressão de BMAL1 (HEIKENS *et al.*, 2011; SHENDE *et al.*, 2011).

Em fígado de camundongos, miR-122 é regulado pelo gene do relógio *Rerv-Erba*, e modula a expressão circadiana dos genes PPAR α , PPAR β , PPAR γ e Noturnin (*Noturnin*). Este último codifica uma importante desadenilase que atua na regulação pós-transcricional de genes circadianos (GATFIELD *et al.*, 2009; KOJIMA *et al.*, 2010). Ainda em fígado de camundongos, foi demonstrado que *Clock* e *Bmal1* apresentam expressão circadiana oposta a miR-181d e miR-191, preditos como seus possíveis reguladores, respectivamente (NA *et al.*, 2009). Em contraste, *Per1* e *Cry1* exibiram padrão de expressão similar a miR-328 e miR-383 (Na *et al.*, 2009).

miR-16, miR-141 e miR-20a apresentaram variações diárias em seus níveis no intestino de ratos (BALAKRISHNAN *et al.*, 2010). Além disso, miR-16 participa da regulação do ciclo celular, bem como da expressão circadiana dos genes *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccnd3*, *Ccne1* e *Cdk6* (Balakrishnan *et al.*, 2010). Através de ensaios de *microarray* em retina, foram demonstradas variações diárias nos níveis de 12 miRs (XU *et al.*, 2007). Destes, miR-96 e miR-182 tiveram suas expressões validadas em experimentos de PCR em tempo real e estão envolvidos com o controle circadiano de ADCY6, que apresenta expressão circadiana (Xu *et al.*, 2007).

Até o momento, apenas dois estudos relataram miRs com expressão circadiana em NSQ de camundongos que potencialmente teriam relação com o controle central da ritmicidade. Cheng *et al.* 2007 avaliaram a participação de miR-219 e miR-132 na modulação do ritmo circadiano em NSQ de camundongos. O miR-219 é alvo do complexo CLOCK:BMAL1 e exibe um padrão de expressão circadiano robusto. Além disto, o *knockdown in vivo* deste miR apresenta um alongamento do período circadiano do comportamento de atividade e repouso dos animais (CHENG *et al.*, 2007).

miR-132 tem expressão circadiana em NSQ e induzida por estímulos luminosos através da via MAPK/CREB (CHENG *et al.*, 2007; ALVAREZ-SAAVEDRA *et al.*, 2011). Além disso, miR-132 atenua o efeito sincronizador da luz e modula os níveis de expressão da transcrição de *Per1*, da tradução da proteína PER2 e de genes envolvidos com o remodelamento de cromatina e com o controle traducional (Alvarez-Saavedra *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2007). Em resumo, os autores demonstram que miR-219 pode atuar no controle

de vias moleculares relacionadas a regulação do período circadiano e miR-132 com mecanismos de sincronização através de variações de luminosidade (Alvarez-Saavedra et al., 2011; Cheng et al., 2007).

Até o momento não existem relatos de miRs com expressão circadiana ou variações diárias em humanos, e é possível que os eventos transcricionais das alças de retroalimentação envolvidos na geração dos ritmos circadianos induzam a expressão de um grupo de miRs, que por sua vez regulariam a expressão de proteínas relacionadas com aspectos centrais dos fenômenos cíclicos (Figura 2) (Cheng and Obrietan, 2007; Pegoraro and Tauber, 2008). Um estudo recente demonstra a existência de um controle circadiano global na transcrição gênica ao identificar ritmos circadianos na ligação de fatores de transcrição do relógio, no recrutamento da enzima RNA polimerase II e em modificações rítmicas na estrutura de cromatina de regiões promotoras de diversos genes, além da expressão circadiana de mais de três mil transcritos, onde uma pequena parcela de RNAs maduros também apresenta expressão circadiana em suas formas precursoras (WEI *et al.*, 2011), o que fortalece a hipótese da atuação de mecanismos pós-transcricionais de regulação circadiana. Sob esta perspectiva, como mencionado acima, também o miRnoma de um organismo poderia apresentar uma parcela de seus genes sob regulação circadiana e atuar no controle rítmico de RNAs e proteínas (Figura 2).

1.5 Ritmos Circadianos em Sangue

Embora o NSQ apresente um papel central na modulação circadiana ajustando a ordem temporal interna com a do ambiente (Figura 1/B), órgãos periféricos apresentam oscilação própria que pode ser entendida como o reflexo da atividade dos genes do relógio que atuam em um nível basal do controle circadiano (Figura 2/B) (TAKAHASHI *et al.*, 2008). É o caso, por exemplo, de fígado, rins e sangue (BERNARD e HERZEL, 2006; PONTES *et al.*, 2007; YOO *et al.*, 2007; STOW e GUMZ, 2011). Em modelos de hamsters arrítmicos foram observadas mudanças no perfil circadiano do tráfego de leucócitos e respostas inflamatórias na pele (JIANG *et al.*, 2012). Este estudo demonstra que assim como outros órgãos, o sistema imune pode apresentar fenômenos circadianos sincronizados pelos NSQ (JIANG *et al.*, 2012). Por exemplo, granulócitos, macrófagos, células NK e T CD8⁺ apresentam variações diárias com níveis elevados durante o dia, em contrapartida, células B e células T CD4⁺ possuem um aumento de sua frequência durante a noite (SUGATANI, VACHER e HRUSKA, 2011).

Kirsch et al. também demonstram variações circadianas em células T CD4, T CD8, NK e linfócitos B, bem como na atividade de células T (LE TRIONNAIRE *et al.*, 2011). DIMITROV et al. relatam que em condições normais de sono/vigília, leucócitos apresentam ritmos robustos com picos durante a noite ou durante o dia, a depender do tipo celular (JANSSENS *et al.*, 2004).

Os parâmetros hematológicos apresentam variações diárias no número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, nas concentrações de ferro, transferrina, folato e saturação de transferrina, com picos durante o dia e nadir durante a noite (HARA *et al.*, 2011). Em oposição, leucócitos, eosinófilos, monócitos e linfócitos, têm elevação ao longo do dia com picos durante o meio da noite (HARA *et al.*, 2011). Curiosamente, em um estudo recente publicado na revista *Nature* foi demonstrado que peroxirredoxinas (*peroxiredoxins*) apresentam ritmos circadianos em hemácias que persistem durante vários dias em condições constantes (RAGER e FRY, 2012). Os autores sugerem a existência de ritmos biológicos independentes de regulação transcricional em hemácias (RAGER e FRY, 2012).

Bollinger *et al* demonstram que células T CD4⁺ de humanos e camundongos apresentam variações circadianas robustas na resposta imune através da expressão dos genes IL-2, IL-4, IFN γ , na expressão de genes do relógio e também na atividade do gene reporter PER2:LUCIFERASE, que contém o gene *Per2* fusionado a enzima luciferase de vaga-lumes. O estudo foi realizado com células ex vivo e ensaios *in vitro*, com células isoladas dos indivíduos e mantidas em cultura sob condições constantes, sem pistas temporais externas (MCGRANAGHAN e PIGGINS, 2001). Além disso, utilizando a técnica de *microarray* a partir de amostras de células T CD4⁺ estimuladas com *PMA/ionomycin* os autores sugerem que vias envolvidas com a regulação de NF-kB poderiam atuar na modulação de respostas circadianas do sistema imune (MCGRANAGHAN e PIGGINS, 2001). Esta foi a primeira demonstração de um mecanismo intrínseco de regulação circadiana em células T CD4⁺ capaz de controlar respostas imunes rítmicas (MCGRANAGHAN e PIGGINS, 2001).

Assim como existem variações circadianas nos níveis de diferentes tipos celulares, algumas moléculas presentes no plasma também apresentam concentrações que variam ao longo do dia. Muitos trabalhos demonstram que melatonina, um importante hormônio circadiano, atua na modulação da atividade de células T, NK, na celularidade do timo, quantidade de leucócitos e linfócitos, e na produção das interleucinas IL-2, IL-6, IL-12 e IFN γ (PFAFFL *et al.*, 2004). Melatonina também inibe a morte celular programada de células do sistema imune pela regulação dos níveis da proteína BAX (PFAFFL *et al.*, 2004). Além disso, a inibição da síntese deste hormônio durante o anoitecer pela adição de propanolol

(*propranolol*) induz imunossupressão de linfócitos. Entretanto, quando feita a indução de melatonina o status é revertido com aumento da atividade de linfócitos (PFAFFL *et al.*, 2004).

Um estudo recente defende o uso de metabólitos sanguíneos, que apresentam uma variação circadiana robusta, como ferramenta para a estimativa do padrão temporal individual em humanos, auxiliando em tratamentos como a administração de fármacos em horários específicos (KIM *et al.*, 2012). Além disso, SENNELS *et al.* demonstraram que níveis de parâmetros bioquímicos séricos freqüentemente usados em análises clínicas, como potássio, creatina e sódio, apresentam oscilações diárias (PFAFFL *et al.*, 2004).

Em humanos, os genes do relógio *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2* e *CK1e* apresentaram expressão circadiana em leucócito total (ARCHER *et al.*, 2008; GRAF *et al.*, 2010; ALBRECHT, 2012). Os autores sugerem *Per3* como biomarcador de ritmicidade endógena (ARCHER *et al.*, 2008; GRAF *et al.*, 2010). Em PBMCs (*Peripheral mononuclear cells*) *Per1*, *Per2*, *Per3*, *BMAL1*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1*, *Dec2* e *Tim* apresentaram expressão circadiana ou variações diárias (TEI *et al.*, 1997; KAEFFER e PARDINI, 2005; VON SCHANTZ, 2008; LESAUTER *et al.*, 2011; CHAUDHURI *et al.*, 2012; DOMIGAN e IRUELA-ARISPE, 2012; WANG *et al.*, 2012). Yang *et al.* encontraram um perfil de expressão diário similar entre PBMCs e PMNs para *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Tim* e *CK1e* (ALBRECHT, 2012). Kusanagi *et al.* também demonstraram que *Per1* apresenta um perfil de expressão semelhante em PBMCs e PMNs (FUKUHARA *et al.*, 2005).

Também são observadas alterações na expressão destes genes em leucócitos de indivíduos com leucemia (TAMOI *et al.*, 2005; ALBRECHT, 2012), câncer do esôfago e gástrico (TURNER e HODSON, 2012), com histórico de depressão (YAMANAKA, HONMA e HONMA, 2008), privação do sono (VON SCHANTZ, 2008), diabetes tipo 2 (REDDY e MAYWOOD, 2007) e inflamação sistêmica aguda (SCHIBLER e BROWN, 2005).

Como demonstrado por Keller *et al.* macrófagos isolados de camundongos, mantidos em escuro constante durante dias, apresentam expressão circadiana nos RNAm de *Per2*, *Rev-Erba*, *TNF- α* e *IL-6* (TAKUMI *et al.*, 1999). Para investigar se essas oscilações decorrem de um controle endógeno autônomo, foram usados camundongos *knockin* para a proteína de LUCIFERASE fusionada a PER2. (PER2::LUC), sem o comprometimento do sistema circadiano. Com este modelo a ritmicidade pôde ser analisada pelo monitoramento da bioluminescência de LUCIFERASE em condições constantes de cultura de células (TAKUMI *et al.*, 1999). PER2::LUC apresentou uma expressão circadiana robusta que permanece por

mais de uma semana (TAKUMI *et al.*, 1999). Além disso, resultados de *microarray* para o período de dois dias revelam que de 17,308 genes analisados, 1,403 (8.1% transcriptoma de macrófagos) apresentam expressão circadiana, incluindo os genes do relógio *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Rev-Erba* e *Rev-Erb β* . As oscilações destes 8 genes foi validada através de RT-qPCR (TAKUMI *et al.*, 1999). Segundo Keller et al o relógio molecular de células do sistema imune opera de maneira independente e controlaria respostas inflamatórias do sistema imune (TAKUMI *et al.*, 1999).

Embora o sistema de temporização em leucócitos não tenha sido totalmente elucidado, trabalhos prévios têm demonstrado que estas células são um modelo viável para o estudo molecular de ritmos circadianos em humanos graças a sua facilidade de acesso e a possibilidade de amostragem temporal em um mesmo indivíduo. Com base nestas informações, neste estudo utilizamos leucócitos isolados de sangue periférico humano como modelo experimental para análise de variações diárias de genes candidatos a modulação do sistema circadiano.

miR-16 e miR-181a são importantes para o sistema imune dado envolvimento com o processo hematopoiético e associação com patologias, tais como leucemias (LINDSAY, 2008; VASILATOU *et al.*, 2010). miR-181a é relacionado ao controle da diferenciação de células B e T. miR-16 apresenta uma diminuição em sua expressão, bem como uma alta taxa de deleção em pacientes com leucemia. Com isso é sugerida para este miR uma atividade supressora de tumor. miR-16 e miR-181a também apresentaram expressão circadiana em intestino de rato e fígado de camundongo, respectivamente (NA *et al.*, 2009; BALAKRISHNAN *et al.*, 2010). Acreditamos que miR-16 e miR-181a podem está relacionados com a modulação de ritmos circadianos de leucócitos, bem como com patologias associadas. Desta forma, como um estudo preliminar selecionamos miR-16 e miR-181a para a análise da expressão gênica em leucócitos humanos isolados em fases distintas do período circadiano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar miRs candidatos a modulação de ritmos circadianos.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar, através dos programas *Pictar*, *microRNA.org* e *TargetScan*, miRs candidatos ao controle pós-transcricional e traducional de genes do relógio de mamíferos e de genes que apresentam expressão circadiana apenas em níveis protéicos;

Realizar uma análise preditiva de fatores de transcrição nas seqüências promotoras dos miRs igualmente identificados pelos três programas (*Pictar*, *microRNA.org* e *TargetScan*);

Selecionar, com base nas análises de bioinformática e informações da literatura, um miR candidato para validação em experimentos de RT-qPCR , a partir de amostras de leucócitos coletadas em fases distintas do ciclo circadiano;

Identificar genes de referência para estudos circadianos de miRs em leucócitos humanos;

Avaliar a expressão diferencial de miR-181 e miR-16, selecionados com base em informações da literatura, utilizando RT-qPCR , a partir de amostras de leucócitos coletadas em fases distintas do ciclo circadiano.

3 METODOLOGIA

3.1 Análises de bioinformática

3.1.1 Identificação de miRs com sítio alvo em genes circadianos

Para identificação e seleção de miRs candidatos ao controle circadiano dos genes do relógio de mamíferos, realizamos uma revisão bibliográfica extensa, além de uma análise preditiva utilizando as ferramentas de bioinformática: *Pictar* (<http://pictar.bio.nyu.edu>), *microRNA.org* (<http://www.microRNA.org>) e *TargetScan* (<http://www.targetscan.org>) (LEWIS *et al.*, 2003; YOON e DE MICHELI, 2006; XIA, CAO e SHAO, 2009).

TargetScan e *microRNA.org*, *PicTar* realizam a predição de alvos para miRs baseados na complementaridade entre suas seqüências e seus respectivos sítios alvos, com ênfase no perfeito pareamento de base entre a região 5' do miR (2-8 posições, também conhecida como 5' end ou *seed region*) e seqüências conservadas (YOON e DE MICHELI, 2006).

Os genes circadianos, e suas isoformas, *Clock*, *Bmal* (*Arntl*), *Per1-3*, *Cry1-2*, *Rerv-erba* (*NR1D1*), *Rerv-erbβ* (*NR1D1*), *Timeless*, *Dec1* (*Bhlhe40*), *Dec2* (*Bhlhe41*), *Ror* (*A, B and C*), *Csnk1E* (*casein kinase 1, epsilon*), *Csnk1D* (*casein kinase 1, delta*) e *Nocturnin* (*Ccrn4L*) foram selecionados para a análise.

Além destes, os genes, e suas isoformas, *cyclin E* (*Ccne1*), *cyclin D1* (*Ccnd1*), *Scp2*, *Rgn*, *Khk*, *Hspd1*, *Hao1*, *Grp58* (*Pdia3*), *Gnpat*, *Eno1*, *Cat*, *Calr*, *Atp5b*, *Atp5a1*, *Apoa4*, *Aldo2* (*AldoB*), *Aldh1a1* e *Acaa2*, que apresentam expressão circadiana de suas proteínas e expressão constitutiva de seus RNAm's (REDDY *et al.*, 2006; BALAKRISHNAN *et al.*, 2010) e *adenylyl cyclase VI* (*ADCY6*) cuja expressão é regulada pelos miRs circadianos miR-96/miR-182 em retina de camundongo (XU *et al.*, 2007), também foram selecionados para as análises preditivas. Como critérios, foram estudados apenas miRs conservados em mamíferos.

3.1.2 Identificação de sítios para fatores de transcrição no promotor de miRs candidatos

Os miRs obtidos com base nos resultados das análises das regiões 3'UTRs, que apresentaram alvos igualmente preditos por *Pictar*, *microRNA.org* e *TargetScan*, bem como miR-181a e miR-16, foram usados em um estudo de regiões promotoras cujo intuito foi identificar sítios para fatores de transcrição circadianos comuns a humano e camundongo. Para isso, as seqüências promotoras dos miRs foram obtidas no formato FASTA de *Eukaryotic Promoter Database – EPD* (epd.vital-it.ch), uma base de dados que contém seqüências promotoras de várias espécies (CAVIN PERIER, JUNIER e BUCHER, 1998; PERIER *et al.*, 1999; PERIER *et al.*, 2000; SCHMID *et al.*, 2004; SCHMID *et al.*, 2006). As

análises preditivas foram realizadas através do programa *MatInspector* (QUANDT *et al.*, 1995; CARTHARIUS *et al.*, 2005) com seqüências com intervalo de - 499 à 100 bp em relação ao sítio de início da transcrição. As coordenadas para obtenção das seqüências, bem como as matrizes (*motifs*) usadas pelo programa *MatInspector* são mostradas no anexo 3.

3.2 Seleção dos Sujeitos da Pesquisa e coleta de sangue

Para a realização dos experimentos foram selecionados oito homens, saudáveis, idade 23.6 ± 4.7 , estudantes e de mesma etnia. Os voluntários não apresentaram mudanças de turno de trabalho, experiência de *jet lag*, não eram fumantes e não faziam uso regular de medicação ou suplemento alimentar. Como critério de inclusão foram selecionados apenas sujeitos com cronotipo indefinido obtido após a análise do questionário de Horne-Ostberg (KARATSOREOS *et al.*, 2004). Este questionário apresenta como resultado um valor numérico que corresponde a soma dos escores de 19 questões referentes a horários de preferência de atividades. A depender do valor resultante os indivíduos são classificados em: matutinos (Escore final entre 86-59), indefinidos (58 e 42) e vespertinos (41 e 16). O grupo de cronotipo indefinido parece ser mais tolerante, ou adaptável a Zeitgebers sociais, como horário de turnos de estudo. Por esta razão foram selecionados apenas indivíduos com este fenótipo.

Durante a semana que antecedeu o estudo, os voluntários foram orientados a evitar o consumo de café ou produtos dotados de cafeína e substâncias energéticas. Além disso, foi sugerida uma rotina de alimentação e sono regulares. Após este período, os sujeitos foram recebidos no laboratório, com jantar fornecido às 19h00min e as luzes apagadas às 22h00min. No dia seguinte, o sangue foi coletado às 00h00min, 04h00min, 08h00min, 12h00min, 16h00min e 20h00min. Nos horários noturnos (Fase escuro) a amostragem foi realizada em baixa luminosidade. O sangue foi armazenado em 4°C até o início da extração de RNA. Os sujeitos foram alimentados entre os horários de 07h00min-08h00min (Café da Manhã), 09h30min-10h30min (Lanche), 12h00min-13h00min (Almoço), 15h30min-16h30min (Lanche), e 19h00min-20h30min (Jantar), havendo disponibilidade de água em qualquer horário.

Uma alíquota do sangue de cada sujeito coletada antes dos experimentos foi encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas (Laboratório Lima do Vale. Rua S. Francisco, 896, Centro, Arapiraca - AL) para realização de hemogramas. O leucograma de cada sujeito é apresentado na Tabela 1. Dos oito indivíduos selecionados dois foram excluídos do grupo experimental por não apresentar parâmetros hematológicos dentro da normalidade,

sendo o estudo realizado com 6 sujeitos com média de idade $26.5. \pm 6.4$. Todos os sujeitos foram orientados a ler e assinar o TCLE (Projeto aprovado no CEP –23065.007138/2011-41).

Tabela 1. Leucograma dos sujeitos incluídos na pesquisa.

	<i>Leucócitos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Monócitos</i>	<i>Eosinófilos</i>
S1	4600	1702	2530	230	138
S2	7200	3240	3240	432	216
S3	5100	2550	2244	204	102
S4	8600	3354	4730	344	86
S5	7100	1704	4473	710	213
S6	9300	3813	4650	837	93
V.R.	5.000– 10.000	1.000 – 5.000	1.800 – 7.000	80 – 1.200	0 – 600

Unidade: Células/ mm³.

V.R.: Valor de referência.

3.3 Extração de RNAm de Sangue Periférico com Kit *miRNeasy* (Qiagen, USA).

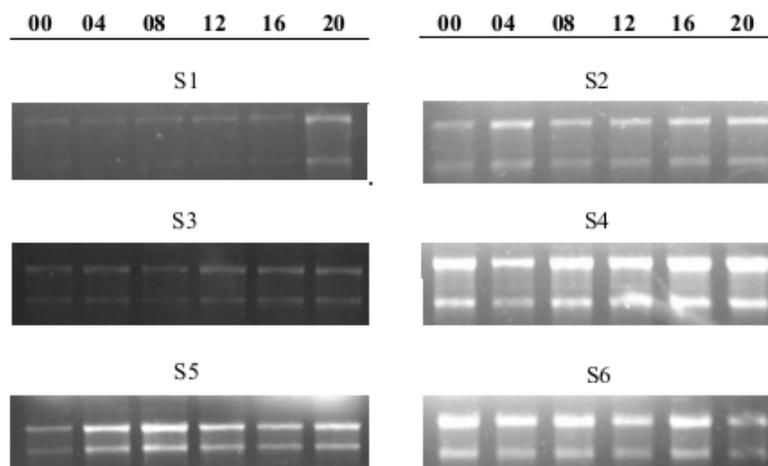
Para cada horário foram coletadas três alíquotas de 5 mL de sangue em tubos com EDTA, mantidas em gelo e em seguida transferidas para tubo falcon específico para o rotor da centrífuga refrigerada (Neofurige 18R, Heal Force). Para a lise de eritrócitos foram adicionado aproximadamente 5X (referente ao volume de sangue inicial) de solução de lise (*Buffer EL*, Qiagen, USA). A solução foi incubada por 15 minutos no gelo sob homogeneização periódica. As amostras, com eritrócitos lisados, foram centrifugadas a 400 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido com cuidado e o processo de lise repetido com 3 mL de *Buffer EL* e centrifugação a 400 x g em 4°C por 10 minutos. Todo o sobrenadante foi removido com cuidado. Após esta etapa, para a lise do *Pellet* de células nucleadas foram adicionados 700 µL de Qiazol (Qiagen, USA) e as amostras incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, 140 µL de clorofórmio foram adicionados, com a solução homogeneizada durante aproximadamente 15 segundos. As amostras foram incubadas por 3 minutos sob temperatura ambiente e em seguida centrifugadas por 12,000 x g à 4 °C. Após o processo três fases foram observadas: Uma vermelha inferior (Trizol/Clorofórmio e proteínas), interfase (restos moleculares degradados) e superior (RNA). A fase inferior foi armazenada em freezer – 80°C para extração de proteínas em ensaios futuros. A superior, com o RNA, foi transferida para um tubo novo, em um volume de aproximadamente 350 µL, adicionando-se 525 µL de etanol absoluto. 700 µL das amostras foram transferidos para o *RNeasy Mini spin column* (Qiagen, USA) e centrifugadas a 8,000 x g (10,000 rpm) por 1 minuto em temperatura ambiente. O precipitado resultante após o processo de centrifugação foi descartado. Esta etapa foi repetida com o restante da amostras. Da mesma forma, o precipitado resultante após o processo de centrifugação também foi descartado. Para a lavagem da coluna, 700 µL do Buffer RWT (Qiagen, USA) foram adicionados na *RNeasy Mini spin column* (Qiagen, USA), e centrifugadas a 8,000 x g (10,000 rpm) por 1 minuto em temperatura ambiente. . O precipitado resultante após o processo de centrifugação foi descartado. Ainda como etapas de purificação da coluna de sílica foram adicionados 500 µL do Buffer RPE (Qiagen, USA), centrifugadas a 8,000 x g (10,000 rpm) por 1 minuto. O precipitado resultante após o processo foi descartado. Esta etapa foi repetida, sendo o tempo de centrifugação elevado para 3 minutos para assegurar a ausência de resíduos de etanol e contaminantes nas colunas. Em seguida as colunas (*RNeasy Mini spin column*) foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL, sendo adicionados 30 µL de água livre de RNase, As amostras foram centrifugadas a 8,000xg (10,000 rpm) por 1 minuto para a eluição do RNA. Esta etapa foi repetida,

totalizando um volume final de 60 μL e as amostras devidamente armazenadas em -80°C . Todas as soluções foram preparadas com água tratada com DEPC (*Dietilpirocarbonato*) (Qiagen, USA).

3.4 Quantificação e análise da integridade do RNA

As amostras de RNA foram analisadas em um gel de agarose desnaturante em concentração de 1.2 % (Figura 3). A cuba de eletroforese e as vidrarias utilizadas foram tratadas com peróxido de hidrogênio 3%. Após esta etapa, a cuba foi montada e o gel preparado com o auxílio de aparelho de microondas. Inicialmente, 1,5 g de agarose foram pesados com o auxílio de uma balança de precisão e em seguida esta foi dissolvida em 72 μL de água tratada com DEPC sob o aquecimento em forno microondas, sendo em seguida acrescentados 18 mL de formaldeído e 10 mL de MOPS 10X após o resfriamento. Para a cuba, foram preparados 250 mL do tampão MOPS 1x (25 mL de MOPS 10x e 225 mL de água tratada com DEPC). O tampão de desnaturação foi preparado com 2 μL de MOPS 10x, 4 μL de Formaldeído, 7 μL de Formamida e 1 μL de Brometo de etídio, sendo acrescentado 5 μL de RNA total de cada amostra por solução individual, desconhecendo quantificação em espectrofotômetro. Após a devida homogeneização a solução foi incubada a 65°C por 10 Minutos, e em seguida posta no gelo. Antes da aplicação das amostras no gel, este foi corrido por 5 minutos a 50 V. Por fim, as amostras foram aplicadas com a adição de 2 μL do tampão de carregamento (Glicerol 50%, azul 0,25%, EDTA 10mM, e água DEPC) por solução individual, sob uma corrente de 50 V (5V/cm, em cuba com 10 cm) por aproximadamente 4 horas.

Figura 3 - RNAs extraídos de leucócito através do *Kit miRNeasy*



Nota: São demonstrados géis de agarose desbaturante dos seis sujeitos selecionados ao longo do dia. As duas bandas correspondem aos rRNA 28S e 18S. Inicialmente usamos 1,5 mL de sangue para a extração de RNA total (S1-S3). Na tentativa de elevar o rendimento das amostras o volume foi elevado para 5 mLm o que justifica as bandas mais fortes (S4-S6). A intensidade das bandas não correspondem a quantificação em espectrometria, em todos os géis foram usados 5 μ L de RNA total como volume padrão.

Objetivando-se a padronização das quantidades de RNA total usados na síntese de cDNA, ou seja, para assegurar uma mesma quantidade inicial, as amostras foram quantificadas para se conhecer suas respectivas concentrações. Para este fim foi utilizado um aparelho de espectrofotômetro (*BioPhotometer plus/Eppendorf*) que possibilita a quantificação de ácidos nucléicos. Foram usados 5 μ L de RNA diluídos em 45 μ L de água livre de RNase (AMRESCO), sendo considerados, para o valor de absorvância igual a 1, em comprimento de onda de 260 nm, 38 μ g de RNA/mL. A razão das absorvâncias em 260nm e 280nm foi calculada para a averiguação do grau de pureza das amostras de RNA (Razão \leq 2.0) (Tabela 2). Além disso, ressalta-se que a absorvância da água usada para a diluição foi desconsiderada antes de cada procedimento de espectrometria.

Os resultados obtidos após os experimentos de eletroforese demonstram as bandas dos rRNA 28S e 18S em proporção (2:1), um padrão esperado em para extrações de RNA bem sucedidas. Nos dados de espectrometria observa-se que 5 amostras apresentam o valor da razão 260nm/280nm entre 2.1-2.5. Embora acima do valor de referência, acreditamos que estes sejam valores aceitáveis para a consideração da integridade das amostras obtidas após a extração de RNA total com o *miRNeasy* (Qiagen, USA).

Tabela 2 - Quantificação das amostras de RNA de leucócito total obtidas com *kit miRNeasy*. São demonstradas as concentrações, em ng/μL obtidas a partir de seis sujeitos e o grau de pureza das amostras em 260nm/280nm.

Leucócito Total									
Sujeito 1					Sujeito 4				
Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final		Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final	
00	1,5	0,188	71,44	ng/μL	00	1,8	0,501	190,38	ng/μL
04	1,5	0,243	92,34	ng/μL	04	1,8	0,361	137,18	ng/μL
08	1,6	0,193	73,34	ng/μL	08	1,7	0,299	113,62	ng/μL
12	1,7	0,088	33,44	ng/μL	12	1,7	0,416	158,08	ng/μL
16	2,0	0,192	72,96	ng/μL	16	1,7	0,422	160,36	ng/μL
20	1,6	0,209	79,42	ng/μL	20	1,7	0,443	168,34	ng/μL
Sujeito 2					Sujeito 5				
Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final		Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final	
00	1,8	0,181	68,78	ng/μL	00	2,1	0,272	103	ng/μL
04	1,8	0,206	78,28	ng/μL	04	1,7	0,892	339	ng/μL
08	1,7	0,157	59,66	ng/μL	08	1,7	0,976	371	ng/μL
12	2,5	0,211	80,18	ng/μL	12	1,6	0,998	379	ng/μL
16	1,7	0,299	113,62	ng/μL	16	1,6	0,779	296	ng/μL
20	1,6	0,171	64,98	ng/μL	20	1,7	1,116	424	ng/μL
Sujeito 3					Sujeito 6				
Amostra	260nm/280 nm	OD (260nm)	Concentração final		Amostra	260nm/280 nm	OD (260nm)	Concentração final	
00	1,7	0,467	177,46	ng/μL	00	2,1	0,489	186	ng/μL
04	2,0	0,444	168,72	ng/μL	04	1,6	0,591	224	ng/μL
08	1,8	0,391	148,58	ng/μL	08	2,2	0,356	135	ng/μL
12	1,4	0,83	315,4	ng/μL	12	1,6	0,531	202	ng/μL
16	1,9	0,549	208,62	ng/μL	16	2,1	0,480	182	ng/μL
20	1,9	0,629	239,02	ng/μL	20	1,4	0,719	273	ng/μL

3.5 Síntese de cDNA *miScript Reverse Transcription Kit* (Qiagen, USA)

Para a síntese de cDNA através do sistema *miScript Reverse Transcription Kit* (Qiagen, USA) foram utilizados 1 µg de RNA total das amostras. Segundo as instruções do fabricante, foram adicionados na reação 4 µl *miScript RT Buffer 5x* (Mg²⁺, dNTPs, e primers), 1 µL *miScript Reverse Transcriptase Mix*. Em cada amostra foram adicionados os volumes específicos em µL de RNA total e *RNase-free water* para a concentração final de 1 µg de RNA em 20 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 60 min e inativadas à 95 °C por 5 min.

3.6 Ensaios de expressão gênica

3.6.1 Identificação de genes de referência

Dada à ausência de estudos que demonstrem genes de referência estáveis para a normalização da expressão circadiana de miRs em leucócitos humanos, os genes *RUN6-2*, (*RNA, U6 small nuclear 2*), *RNU1A-1* (*RNA, U1 small nuclear 1*), *RNU5A-1* (*RNA, U5A small nuclear 1*), *SNORD-25* (*small nucleolar RNA, C/D box 25*), *SNORA73-A* (*small nucleolar RNA, H/ACA box 73A*) e *SCARNA-17* (*small Cajal body-specific RNA 17*) foram selecionados para avaliação da estabilidade de suas expressões ao longo de um período circadiano. Estes genes compõem o sistema *miScript Primer control* (Qiagen, USA) usado na normalização de estudos de expressão gênica de miRs.

Os programas *BestKeeper*, *Normfinder* e *geNorm* foram empregados para a análise da estabilidade e identificação do gene de referência mais estável (HIROTA *et al.*, 2010; HEUSTON, LEMON e ARCECI, 2011; PALMA, C. A. *et al.*, 2012). O programa *BestKeeper* utiliza o dado de Cts (*Cycle Threshold*) como *input* para suas análises (PALMA, C. A. *et al.*, 2012), enquanto *Normfinder* e *geNorm* recomendam a conversão dos Cts em $2^{(Ct/Amostra - Ct/Mínimo)}$ (HIROTA *et al.*, 2010; HEUSTON, LEMON e ARCECI, 2011). Aqui, os Cts das amostras correspondem aos dados obtidos para cada amostra (Horários) e Ct mínimo ao menor Ct dentre os seis horários. Os três programas utilizam um fator de normalização calculado com base na média geométrica dos genes (HIROTA *et al.*, 2010; HEUSTON, LEMON e ARCECI, 2011; PALMA, C. A. *et al.*, 2012).

Para as análises no programa *Normfinder* são necessários no mínimo 3 genes e 2 amostras por grupo experimental. *Normfinder* calcula as variações intra e intergrupo para o cálculo do valor de estabilidade dos genes de referência (HEUSTON, LEMON e ARCECI, 2011). O programa *BestKeeper* também calcula a média geométrica dos Cts e com ela o índice *BestKeeper (BestKeeper Index)* (PALMA, C. A. *et al.*, 2012). É sugerida uma análise inicial com o desvio padrão e o coeficiente de variação da expressão dos genes, onde de acordo com as variações observadas os genes podem ser ordenados em mais e menos estáveis. Além disso, genes com desvio padrão elevado ($DP > 1$) devem ser excluídos das análises, ressaltando que é necessário um número mínimo de 3 genes para o estudo (PALMA, C. A. *et al.*, 2012). Para estimar inter-relações entre os genes o programa emprega o teste de correlação aos pares, onde os genes são correlacionados um com o outro e com o índice *bestkeeper*. Genes que apresentam Cts altos (30-35 ciclos), ou seja pouco expressos, são uma limitação para análise de correlação, pois não poderão ser correlacionados parametricamente com genes com Cts baixos (15 ciclos ou menos) (PALMA, C. A. *et al.*, 2012).

geNorm parte o princípio de que a razão das expressões de dois genes endógenos ideais são as mesmas em qualquer tecido e condição experimental, ou seja, a presença de variação na razão da expressão de dois genes endógenos em condições experimentais distintas reflete no fato de um, ou ambos os genes não serem constitutivamente expressos (HIROTA *et al.*, 2010). A partir deste princípio, para um conjunto de genes são feitas correlações ao pares com o desvio padrão das razões da expressão, que é a base para o cálculo do índice de estabilidade M, ou seja, da média das variações aos pares de um determinado gene com todos os demais, onde o gene com menor valor M apresenta maior estabilidade (HIROTA *et al.*, 2010). Além disso, assumindo que os genes não apresentam uma co-regulação, é indicada a exclusão gradual dos genes com maior valor de M até a obtenção dos dois genes mais estáveis (HIROTA *et al.*, 2010). O programa realiza o cálculo automático de M e possui uma ferramenta para eliminação gradual do gene mais instável para obtenção de novos valores de estabilidade para os demais genes (HIROTA *et al.*, 2010).

3.6.2 Reações de RT-qPCR

Todas as reações de RT-QPCR (Equipamento: *StepOne Plus Applied Biosystems*) utilizaram o sistema *miScript SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen, USA) e *miScript Primer Assays* (Qiagen, USA). Em cada reação foram adicionados 10 µl de *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, para uma concentração final de 2.5 mM de MgCl₂, 2 µl *10x miScript Universal Primer*, 2 µl de *10x miScript Primer Assay*, 4 µl de *RNase-free water* (Qiagen) e 2 µl de cDNA. O kit contém uma enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, portanto, a reação foi inicialmente aquecida por 15 minutos à 95°C, para a ativação da mesma. Em seguida, são usados três pontos por ciclo de amplificação, sendo 15 segundos à 94°C (desnaturação), 30 segundos à 55°C (anelamento) e 30 segundos à 70°C (extensão). Os experimentos foram realizados em duplicatas (Desvio Padrão ≤ 0,5) com controles negativos (sem cDNA). Em adição, a expressão do gene do relógio *Per3* foi usada como um controle positivo para variações diurnas. As reações também foram realizadas com *miScript SYBR Green PCR Kit* reagents (*Qiagen, Germany*) com primers específicos (Forward: 5'-GCAGAGGAAATTGGCGGACA3'/ Reverse:5'AGAGTGTGGCTTATTGCGTC-3'). As seqüências dos primers para os miRs selecionados e os genes endógenos não foram disponibilizadas pela empresa *Qiagen*. Para a análise foi utilizado o método de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Antes dos experimentos de expressão relativa foram feitas análises das eficiências dos primers e as curvas de desnaturação (Anexos 1 e 2). Para isso, o cDNA total foi diluído cinco vezes (diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) para a construção da curva padrão de para cada primer. Os dados de eficiência foram analisados no *StepOnePlus software v2.1* (Applied Biosystems, USA).

3.6.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram examinados quanto aos pressupostos paramétricos de normalidade (Teste de Lilliefors) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (Teste de Levene), com até 5% de probabilidade de erro experimental. Para todos os casos foi considerado o valor de 5% para a significância estatística.

Assim como em estudos prévios (VON SCHANTZ, 2008; ALBRECHT, 2012), para as análises de variações diárias na expressão dos genes foi aplicado o teste ANOVA de uma via com medidas repetidas (Refinetti, et al 2007) com o pós-teste de Bonferroni's.

Considerando diferenças inter-individuais, os sujeitos foram agrupados segundo os picos de expressão (Baseado no *fold change*). Os valores para cada amostra (Série temporal) são apresentados em média \pm desvio padrão. Além disso, foi empregado o teste Cosinor com período ajustado para 24 horas (GUAY *et al.*, 2011; LUO e SEHGAL, 2012) para a análise estatística das variações diárias individuais, bem como para o cálculo da acrofase, amplitude e curva ajustada, e o Teste *Manm-Whitney* para a análise comparativa da expressão de *Per3* após normalização com gene mais estável e com o mais instável. As análises foram desenvolvidas utilizando os programas *GraphPad Prism 5* (San Diego, CA, USA) e *Acrophase* (<http://www.circadian.org/softwar.html>).

4 Resultados

4.1 Análises de Bioinformática

As análises preditivas realizadas com *microRNA.org* revelaram 273 miRs preditos em humanos e 227 em camundongos, 202 em humanos e 159 em camundongos para *TargetScan*, e 114 em humanos e 114 em camundongos para *PicTar*. Sessenta e nove miRs foram igualmente preditos pelos três programas para humanos e camundongo (Tabela 3). Em seguida foi realizada uma busca de genes alvos validados para estes miRs que foram previamente associados com ritmos circadianos (Tabela 4).

Tabela 3 – miRs preditos para camundongos e humanos usando a combinação dos três programas.

miR	Camundongo	Humano
let-7a	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>
let-7b	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>
let-7c	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>
let-7d	<i>mCry2</i>	<i>hCry2</i>
let-7e	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>
let-7f*	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>
let-7g	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>
let-7i*	<i>mCry2; mRorc</i>	-----
miR-1	<i>mHspd1</i>	<i>hClock; hHspd1</i>
miR-101	-----	<i>hAdcy6</i>
miR-103*	-----	<i>hClock</i>
miR-106a	<i>mClock; mCry2; mCnd1</i>	<i>hCry2</i>
miR-106b*	<i>mClock; mCry2; mCnd1</i>	<i>hCry2</i>
miR-107*	-----	<i>hClock; hCcn1</i>
miR-132*	<i>mHao1</i>	<i>hHao1,</i>
miR-133a	-----	<i>hAdcy6</i>
miR-133b*	-----	<i>hAdcy6</i>
miR-140*	<i>mAdcy6</i>	-----
miR-142-3p*	<i>mArntl</i>	<i>hArntl,</i>
miR-148a	<i>mGrp58</i>	<i>hGrp58</i>
miR-148b	<i>mGrp58</i>	<i>hGrp58</i>
miR-152*	<i>mClock; mGrp58</i>	<i>hClock; hGrp58</i>
miR-15a	<i>mCcn1</i>	<i>hCnd1; hCcn1</i>
miR-15b	<i>mCcn1</i>	-----
miR-16*	<i>mCcn1</i>	<i>hClock</i>
miR-182*	<i>mClock; mAdcy6</i>	<i>hClock; hAdcy6</i>
miR-190	<i>mClock</i>	<i>hClock,</i>
miR-194*	<i>mCsnk1D</i>	-----
miR-195	<i>mCcn1</i>	<i>hClock; hCnd1; hCcn1</i>
miR-19a	<i>mNocturnin; mCnd1;</i>	-----
miR-19b	<i>mNocturnin</i>	-----
miR-203	<i>mArntl</i>	<i>hArntl</i>
miR-204	<i>mAdcy6</i>	<i>hAdcy6</i>
miR-206	<i>mHspd1</i>	<i>hClock; hHspd1</i>
miR-211*	<i>mAdcy6</i>	<i>hAdcy6</i>
miR-212*	<i>mHao1</i>	<i>hHao1</i>
miR-214	<i>mHspd1</i>	<i>hCry2</i>
miR-219*	<i>mRorb</i>	-----
miR-23a	<i>mCnd1</i>	<i>hCnd1</i>
miR-23b	<i>mCnd1</i>	<i>hCnd1</i>
miR-24	<i>mPer2</i>	<i>hPer1; hPer2</i>
miR-25	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>

miR-26a	<i>mHao1</i>	<i>hHao1</i>
miR-26b*	<i>mHao1</i>	<i>hHao1</i>
miR-27a	<i>mAdcy6</i>	<i>hAdcy6</i>
miR-27b	<i>mAdcy6</i>	<i>hAdcy6</i>
miR-29b	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>
miR-29c	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>
miR-302a*	<i>mRorb; mCcmd1</i>	<i>hRorb; hCcmd1,</i>
miR-302b*	<i>mRorb; mCcmd1</i>	<i>hRorb; hCcmd1,</i>
miR-302c	-----	<i>hRorb; hCcmd1,</i>
miR-302d	<i>mRorb; mCcmd1</i>	<i>hRorb; hCcmd1,</i>
miR-30b*	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>
miR-30c	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>
miR-30d	<i>mClock; mPer2</i>	<i>hClock; hPer2</i>
miR-30e	<i>mClock; mPer2</i>	<i>hClock; hPer2</i>
miR-31	<i>mPer2</i>	-----
miR-32	-----	<i>hPer2</i>
miR-33	<i>mCsnk1D</i>	-----
miR-346	<i>mCsnk1D</i>	<i>hCsnk1D</i>
miR-34a	-----	<i>hCcmd1</i>
miR-367	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>
miR-373	-----	<i>hCcmd1</i>
miR-384	-----	<i>hHao1</i>
miR-7*	-----	<i>hCry2</i>
miR-9	<i>mClock</i>	<i>hClock</i>
miR-93*	<i>mClock; mCry2; mCcnD1</i>	<i>hClock; hCry2; hCcmd1</i>
miR-96*	<i>mAdcy6</i>	<i>hClock; hAdcy6,</i>
miR-98	<i>mCry2; Rorc</i>	<i>hCry2</i>

*miRs previamente descritos com expressão circadiana, variações diárias ou que apresentam genes do relógio como alvos validados.

Tabela 4 – miRs candidatos para regulação circadiana selecionados com base nos estudos de bioinformática e busca na literatura de alvos validados.

miR	Alvos preditos Camundongo	Alvos preditos Humanos	Alvos ou vias validadas associados com ritmos circadianos	Referências
Let-7a	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>	<i>Fxyd5, Brca1, Ccnd2, Ezh2, Myc, p53, Nf-kb</i>	(MELLOR <i>et al.</i> , 1991; KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1996; PURRELLO <i>et al.</i> , 1998; HASSON <i>et al.</i> , 2001; TARLING, SALTER e BENNETT, 2004; ETCHEGARAY <i>et al.</i> , 2006; PALMIERI <i>et al.</i> , 2008; VOCK <i>et al.</i> , 2008; AL-ABDULHADI e AL-RABIA, 2009; DESJARDINS <i>et al.</i> , 2009; BALAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2010; CECON <i>et al.</i> , 2010; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010; ZIV-AV (MELLOR <i>et al.</i> , 1991; ZIV-AV <i>et al.</i> , 2011)
Let-7b	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>	<i>p53</i>	(BANERJEE e NANDAGOPAL, 2007; SCHMELZER <i>et al.</i> , 2007; AL-ABDULHADI e AL-RABIA, 2009; CAI <i>et al.</i> , 2010; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010; GUAN <i>et al.</i> , 2011)
Let-7c	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>	<i>Myc, Interleukin-10, Bcl-xl</i>	(KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1996; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010)
Let-7d	<i>mCry2</i>	<i>hCry2</i>	<i>Myc</i>	(KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1996; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010)
Let-7f*	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>	<i>Myc</i>	(KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1996; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010)
Let-7g	<i>mCry2; mRorc</i>	<i>hCry2</i>	<i>Myc, p16</i>	(IBRAHEEM, BOTHA e BRADLEY, 2010; LI, KUNG e HUANG, 2010;

miR-9	<i>mClock</i>	<i>hClock</i>	<i>Myc, Sirt1</i>	(VITATERNA <i>et al.</i> , 1994; ZYLKA <i>et al.</i> , 1998; ROTHENFLUH <i>et al.</i> , 2000; ASHER <i>et al.</i> , 2008; BELDEN e DUNLAP, 2008; NAKAHATA <i>et al.</i> , 2008; KHEW-GOODALL e GOODALL, 2010; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010; REPOUSKOU <i>et al.</i> , 2010)
miR-16* miR-24	<i>mCcne1</i> <i>mPer2</i>	<i>hClock</i> <i>hPer1; hPer2</i>	<i>Ccnd1, Ccnd2, Ccnd3, Ccne1, Cdk6</i> <i>Myc</i>	(BALAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2010) (LAL <i>et al.</i> , 2009; KUTTY <i>et al.</i> , 2010; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010)
miR-25	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	<i>Pten, p53, Ezh2</i>	(ETCHEGARAY <i>et al.</i> , 2006; GACHON, 2007; OGAWA <i>et al.</i> , 2007; POLISENO <i>et al.</i> , 2010; JABBAR <i>et al.</i> , 2011; ZIV-AV <i>et al.</i> , 2011)
miR-26a*	<i>mHao1</i>	<i>hHao1</i>	<i>Myc, Ezh2, Interleukin-2, Ccne2</i>	(LISSONI <i>et al.</i> , 1998; ETCHEGARAY <i>et al.</i> , 2006; SANDER <i>et al.</i> , 2008; SHI, KO e KO, 2009; ALAJEZ <i>et al.</i> , 2010; OKAZAKI <i>et al.</i> , 2010; XU <i>et al.</i> , 2010; SALVATORI <i>et al.</i> , 2011)
miR-27a	<i>mAdcy6</i>	<i>hAdcy6</i>	<i>Rxr-alpha, Ppar-gamma</i>	(TSUNODA e TAKAGI, 1999; PRAZ <i>et al.</i> , 2002; HOOGENDOORN <i>et al.</i> , 2003; SCHMID <i>et al.</i> , 2004; JI <i>et al.</i> , 2009; GRIMALDI <i>et al.</i> , 2010; KAWAI e ROSEN, 2010; KIM <i>et al.</i> , 2010; YANG, GUO e WAN, 2010)

miR-27b	<i>mAdcy6</i>	<i>hAdcy6</i>	<i>Rxr-alpha, Nf-kb, Ppar-alpha, Ppar-gamma</i>	(TSUNODA e TAKAGI, 1999; BUNGER <i>et al.</i> , 2000; PRAZ <i>et al.</i> , 2002; SCHMID <i>et al.</i> , 2004; JI <i>et al.</i> , 2009; CECON <i>et al.</i> , 2010; GRIMALDI <i>et al.</i> , 2010; JENNEWEIN <i>et al.</i> , 2010; KAWAI e ROSEN, 2010; YANG, GUO e WAN, 2010; KIDA <i>et al.</i> , 2011; THULASINGAM (STEARNS <i>et al.</i> , 2008; PULLEN <i>et al.</i> , 2011)
miR-29a	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>	<i>Mct1</i>	(STEARNS <i>et al.</i> , 2008; PULLEN <i>et al.</i> , 2011)
miR-29b	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>	<i>Mct1</i>	(STEARNS <i>et al.</i> , 2008; PULLEN <i>et al.</i> , 2011)
miR-29c	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>	<i>Ccne1</i>	(BALAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2010; DING <i>et al.</i> , 2011)
miR-30c	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	<i>Pail</i>	(NASCIMENTO, WINTERS e PINKUS, 2007; ZHANG <i>et al.</i> , 2008; DE LA HERRAN-ARITA <i>et al.</i> , 2011; MARHEFKA, 2011; SCHEER <i>et al.</i> , 2011)
miR-30d	<i>mClock; mPer2</i>	<i>hClock; hPer2</i>	<i>p53, Ezh2</i>	(KONOPKA, KYRIACOU e HALL, 1996; ETCHEGARAY <i>et al.</i> , 2006; GACHON, 2007; JABBAR <i>et al.</i> , 2011; ZIV-AV <i>et al.</i>

miR-93*	<i>mClock; mCry2; mCnd1</i>	<i>hClock; hCry2; hCnd1</i>	<i>Pten, Vegf, Sp1, Sirt1</i>	(KONOPKA e BENZER, 1971; HAMBLEN <i>et al.</i> , 1986; RALPH e MENAKER, 1988; KONOPKA, SMITH e ORR, 1991; RALPH e HURD, 1996; ZYLKA <i>et al.</i> , 1998; ROTHENFLUH <i>et al.</i> , 2000; HONG <i>et al.</i> , 2006; KOH, ZHENG e SEHGAL, 2006; OGAWA <i>et al.</i> , 2007; ASHER <i>et al.</i> , 2008; BELDEN e DUNLAP, 2008; NAKAHATA <i>et al.</i> , 2000)
miR-96*	<i>mAdcy6</i>	<i>hClock; hAdcy6</i>	<i>Clock, Adcy6</i>	(XU <i>et al.</i> , 2007)
miR-98	<i>mCry2; Rorc</i>	<i>hCry2</i>	<i>Ezh2</i>	(HORIKAWA <i>et al.</i> , 2000; ETCHEGARAY <i>et al.</i> , 2006; ALAJEZ <i>et al.</i> , 2010)
miR-101	-----	<i>hAdcy6</i>	<i>Ezh2</i>	(ETCHEGARAY <i>et al.</i> , 2006; ALAJEZ <i>et al.</i> , 2010)
miR-106a	<i>mClock; mCry2; mCnd1</i>	<i>hCry2</i>	<i>p21, Tnf-alpha, Fas, App, Interleukin-10</i>	
miR-132*	<i>mHao1</i>	<i>hHao1</i>	<i>Per1, Per2</i>	(CHENG <i>et al.</i> , 2007; ALVAREZ-SAAVEDRA <i>et al.</i> , 2011)
miR-142-3p*	<i>mBmall</i>	<i>hBmall</i>	<i>Bmall</i>	(SHENDE <i>et al.</i> , 2011; TAN <i>et al.</i> , 2012)
miR-152*	<i>mClock; mGrp58</i>	<i>hClock; hGrp58</i>	<i>Bmall</i>	(SHENDE <i>et al.</i> , 2011)
miR-182*	<i>mClock; mAdcy6</i>	<i>hClock; hAdcy6</i>	<i>Clock, Adcy6</i>	(XU <i>et al.</i> , 2007)
miR-190	<i>mClock</i>	<i>hClock,</i>	<i>Phlpp1, NeuroD1, mu-opioid receptor</i>	(QUANDT, GROTE e WERNER, 1996; CHANG <i>et al.</i> , 2009; XU <i>et al.</i> , 2009; BEEZHOLD <i>et al.</i> , 2011; SROUBEK <i>et al.</i> , 2012)

miR-195	<i>mCcne1</i>	<i>hClock;</i> <i>hCcnd1;hCcne1</i>	<i>Ccne1, Bdnf, Sirt1</i>	(LIANG, WALLINE e EARNEST, 1998; ZYLKA <i>et al.</i> , 1998; LIANG, ALLEN e EARNEST, 2000; ROTHENFLUH <i>et al.</i> , 2000; ASHER <i>et al.</i> , 2008; BEGLIUOMINI <i>et al.</i> , 2008; BELDEN e DUNLAP, 2008; MELLIOS <i>et al.</i> , 2008; NAKAHATA <i>et al.</i> , 2008; BALAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2010; SEKIYA <i>et al.</i> , 2010; CHOI, BHANG e (MOFFATT e LAMONT, 2011; SAINI <i>et al.</i> , 2011)
miR-203	<i>mBmall</i>	<i>hBmall</i>	<i>Scr, Akt, Socs-3</i>	(MOFFATT e LAMONT, 2011; SAINI <i>et al.</i> , 2011)
miR-204	<i>mAcdy6</i>	<i>hAdcy6</i>	<i>Runx2, Interleukin-10, Sirt1</i>	(VITATERNA <i>et al.</i> , 1994; ZYLKA <i>et al.</i> , 1998; ROTHENFLUH <i>et al.</i> , 2000; PENG <i>et al.</i> , 2003; TOURNIER <i>et al.</i> , 2003; ASHER <i>et al.</i> , 2008; BELDEN e DUNLAP, 2008; NAKAHATA <i>et al.</i> , 2008; ANSARI <i>et al.</i> , 2009; GRANADOS-FUENTES <i>et al.</i> , 2011)
miR-211*	<i>mAcdy6</i>	<i>hAdcy6</i>	<i>Angiopoietin-1</i>	(NA <i>et al.</i> , 2009; CHEN, J. <i>et al.</i> , 2010; KROL <i>et al.</i> , 2010; KITAZAWA <i>et al.</i> , 2011)
miR-212*	<i>mHao1</i>	<i>hHao1</i>	<i>Creb</i>	(CERMAKIAN e SASSONE-CORSI, 2002; IITAKA <i>et al.</i> , 2005; NA <i>et al.</i> , 2009; REMENYI <i>et al.</i> , 2010; WILLIAMS III e KRIEGSFELD, 2012)
miR-219*	<i>mRor-beta</i>	-----	<i>Clock/Bmall,</i>	(CHENG <i>et al.</i> , 2007)

miR-302a*	<i>mRor-beta;</i> <i>mCcmd1</i>	<i>hRor-beta; hCcmd1</i>	<i>Oct4, Sox2, Ccmd1</i>	(CARD <i>et al.</i> , 2008; NA <i>et al.</i> , 2009; BALAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2010; YAGITA <i>et al.</i> , 2010)
miR-302b*	<i>mRor-beta;</i> <i>mCcmd1</i>	<i>hRor-beta; hCcmd1</i>	<i>Fmr1</i>	(GATTO e BROADIE, 2009; NA <i>et al.</i> , 2009; YI <i>et al.</i> , 2010)
miR-346	<i>mCsnk1D</i>	<i>hCsnk1D</i>	<i>Rip-140</i>	(TSAI, LIN e WEI, 2009; POLIANDRI <i>et al.</i> , 2011)
miR-367	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	<i>Ryr3</i>	(DING <i>et al.</i> , 1998; SAKAMOTO <i>et al.</i> , 1998; GAMBLE e CIARLEGLIO, 2009)

*miRs previamente descritos com expressão circadiana, variações diárias ou que apresentam genes do relógio como alvos validados.

Nota: As referências apresentadas nesta tabela estão disponíveis no material suplementar do artigo (Anexo 3).

Os resultados do programa *MatInspector*, usado com o intuito de analisar se os 69 miRs (igualmente preditos) possuem sítios conservados para fatores de transcrição do relógio, tais como CLOCK-BMAL1, revelam 33 miRs com sítios para fatores de transcrição circadianos em humanos e/ou camundongos (Tabela 5). Com base nos resultados de predição e dados da literatura para alvos validados associados previamente com ritmos biológicos, foram formuladas alças de retroalimentação hipotéticas para o sistema molecular do relógio (Figuras 4 e 5).

miR-27b é predito como alvo de fatores de transcrição do relógio e apresenta os genes *Rxr-alpha*, *Nf-kb*, *Ppar-alpha*, *Ppar-gamma* como alvos validados envolvidos com sistema imune e ritmos circadianos (Tabelas 3 e 4). Acredita-se que miR-27b possa atuar em vias de modulação de processador circadianos importantes para as células do sistema imune. Por esta razão, o miR foi selecionado para o estudo de expressão através de RT-qPCR .

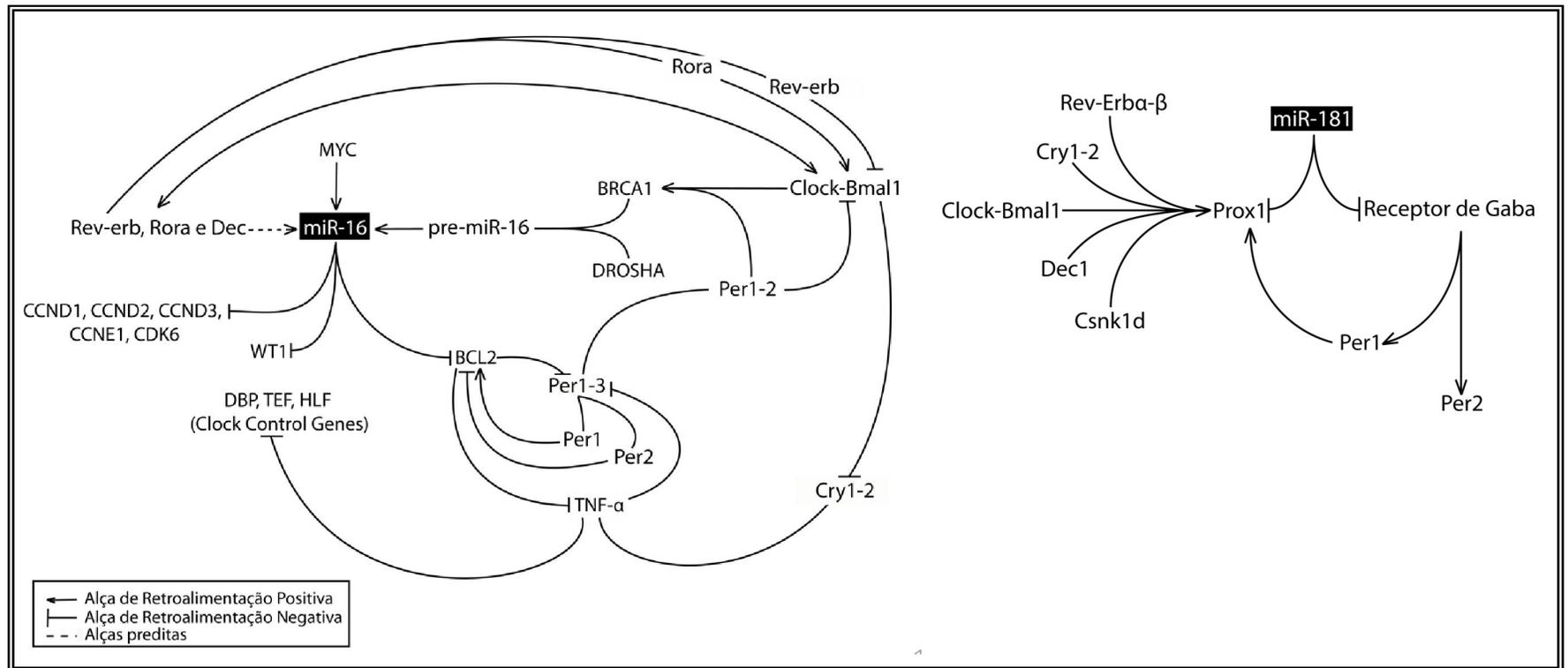
Tabela 5 – miRs candidatos que apresentam sítios para fatores de transcrição do relógio em seus promotores.

Alvos preditos (<i>TargetScan, microRNA.org</i> and <i>PicTar</i>)			Fatores de transcrição preditos (<i>MatInspector</i>)	
miR	Camundongo	Humanos	Camundongo	Humanos
let-7a	<i>mCry2; mRor-</i>	<i>hCry2</i>	-----	CREB; DEC1; ROR-alpha
let-7b	<i>mCry2; mRor-</i>	<i>hCry2</i>	-----	DEC1; ROR-alpha
let-7c	<i>mCry2; mRor-</i>	<i>hCry2</i>	-----	CREB; ROR- alpha
let-7d	<i>mCry2</i>	<i>hCry2</i>	-----	CREB; REV-
let-7f*	<i>mCry2; mRor-</i>	<i>hCry2</i>	-----	ERBalpHa; ROR- alpha DEC1; REV-
let-7g	<i>gamma</i>			ERBalpHa; ROR- alpha
miR-106a	<i>mCry2; mRor-</i>	<i>hCry2</i>	-----	DEC2; ROR-gamma
	<i>mClock; mCry2;</i>	<i>hCry2</i>	CREB	-----
	<i>mCnd1</i>			
miR-106b*	<i>mClock; mCry2;</i>	<i>hCry2</i>	CREB, DEC2; REV-	-----
	<i>mBmal1</i>			
miR-142-	<i>mBmal1</i>	<i>hBmal1</i>	REV-ERB-alpha	-----
miR-152*	<i>mClock; mGrp58</i>	<i>hClock; hGrp58</i>	CREB; REV-ERB-alpha	CREB
miR-182*	<i>mClock; mAcly6</i>	<i>hClock; hAcly6</i>	ROR-alpha; CREB	CREB
miR-190	<i>mClock</i>	<i>hClock</i>	CLOCK/BMAL1; DEC2	CREB; DEC2
miR-203	<i>mBmal1</i>	<i>hBmal1</i>	REV-ERB-alpha	-----
miR-204	<i>mAcly6</i>	<i>hAcly6</i>	DEC2; REV-ERB-alpha	-----
miR-211*	<i>mAcly6</i>	<i>hAcly6</i>	DEC2; REV-ERB-alpha	CREB
miR-24	<i>mPer2</i>	<i>hPer1; hPer2</i>	-----	CLOCK/BMAL1; REV-
				ERBalpHa; CREB
miR-25	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	REV-ERB-alpha; DEC2;	ROR-alpha
			ROR-alpha	
miR-27b	<i>mAcly6</i>	<i>hAcly6</i>	DEC2; ROR-ALPHA	DEC2; ROR-alpha; CREB
miR-29b	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>	ROR-gamma; ROR-alpha;	ROR-ALPHA; CREB
			REV-ERBalpHa	

miR-29c	<i>mPer3</i>	<i>hPer3</i>	REV-ERBalpha; CREB	DEC2; REV-ERBalpha
miR-302a*	<i>mRor-beta;</i>	<i>hRor-beta;</i>	REV-ERBalpha	ROR-alpha
miR-302b*	<i>mCcn11</i> <i>mRor-beta;</i>	<i>hCcn11</i> <i>hRor-beta;</i>	REV-ERBalpha; ROR- alpha	ROR-alpha
miR-302d	<i>mCcn11</i> <i>mRor-beta;</i>	<i>hCcn11</i> <i>hRor-beta;</i>	REV-ERBalpha	-----
miR-30b*	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	CREB; ROR-alpha	CREB
miR-30c	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	DEC2; REV-ERBalpha;	REV-ERBalpha
miR-30d	<i>mClock; mPer2</i>	<i>hClock; hPer2</i>	REV-ERBalpha; ROR-	CREB
miR-30e	<i>mClock; mPer2</i>	<i>hClock; hPer2</i>	DEC2; ROR-alpha	-----
miR-346	<i>mCsnk1D</i>	<i>hCsnk1D</i>	CREB; ROR-alpha	-----
miR-367	<i>mPer2</i>	<i>hPer2</i>	-----	REV-ERBalpha
miR-9	<i>mClock</i>	<i>hClock</i>	ROR-alpha	DEC2; REV-ERBalpha;
miR-93*	<i>mClock; mCry2;</i>	<i>hClock; hCry2;</i>	DEC2; REV-ERBalpha;	ROR-alpha; CREB
	<i>mCcn11</i>	<i>hCcn11</i>	ROR-alpha; CREB	ROR-alpha
miR-96*	<i>mAdcy6</i>	<i>hClock; hAdcy6</i>	-----	ROR-alpha
miR-98	<i>mCry2; Ror-</i>	<i>hCry2</i>	-----	DEC2

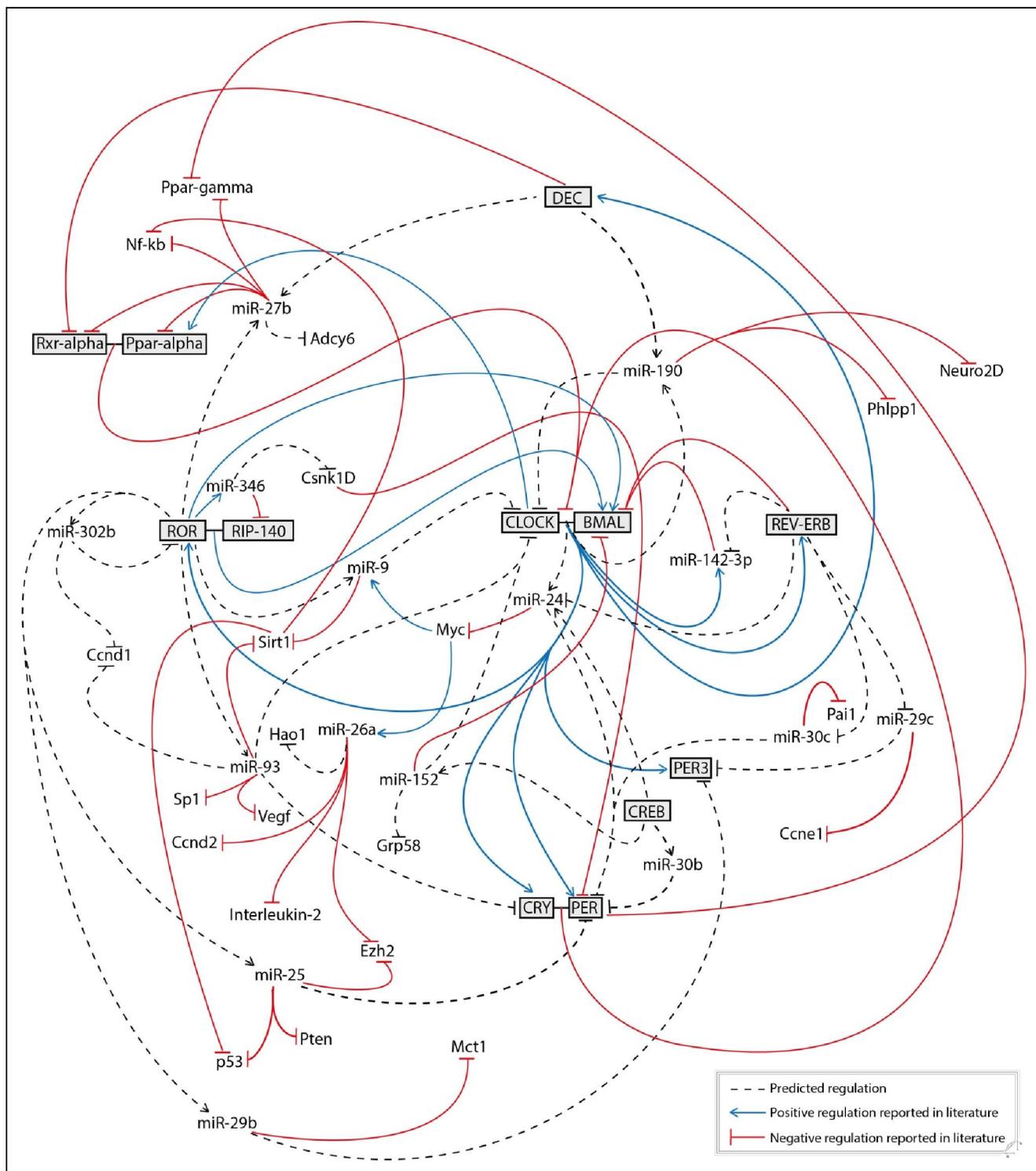
*miRs previamente descritos com expressão circadiana, variações diárias ou que apresentam genes do relógio como alvos validados.

Figura 4 - Alças propostas para os genes hematopoiéticos miR-16 e miR-181a.



Nota: Na imagem são demonstrados alvos validados em estudos prévios, e vias que incluem genes centrais do relógio, como *Per1*, *Per2*, *Cry 1-2*, *Clock* e *Bmal*. A linha pontilhada indica os fatores de transcrição circadianos preditos para miR-16. miR-181 não apresentou sítios preditos para fatores de transcrição do relógio. miR-16 e miR-181 não possuem alvos igualmente preditos pelos programas *Pictar*, *TargetScan* e *microRNA.org* em humanos e camundongo. Fonte: Autor, 2013.

Figura 5 - Alças de retroalimentação predita para o relógio circadiano de mamíferos.



NOTA: A figura mostra miRs preditos e alvos correspondentes igualmente identificados pelos três programas. Possíveis interações entre fatores de transcrição do relógio e o promotor de miRNAs candidatos são apresentadas. Também são demonstrados alvos validados que possuem relação com a biologia circadiana. Os genes do relógio são ressaltados nos retângulos. Fonte: Autor, 2013.

4.2 Ensaios de expressão gênica

4.2.1 Identificação de genes de referência

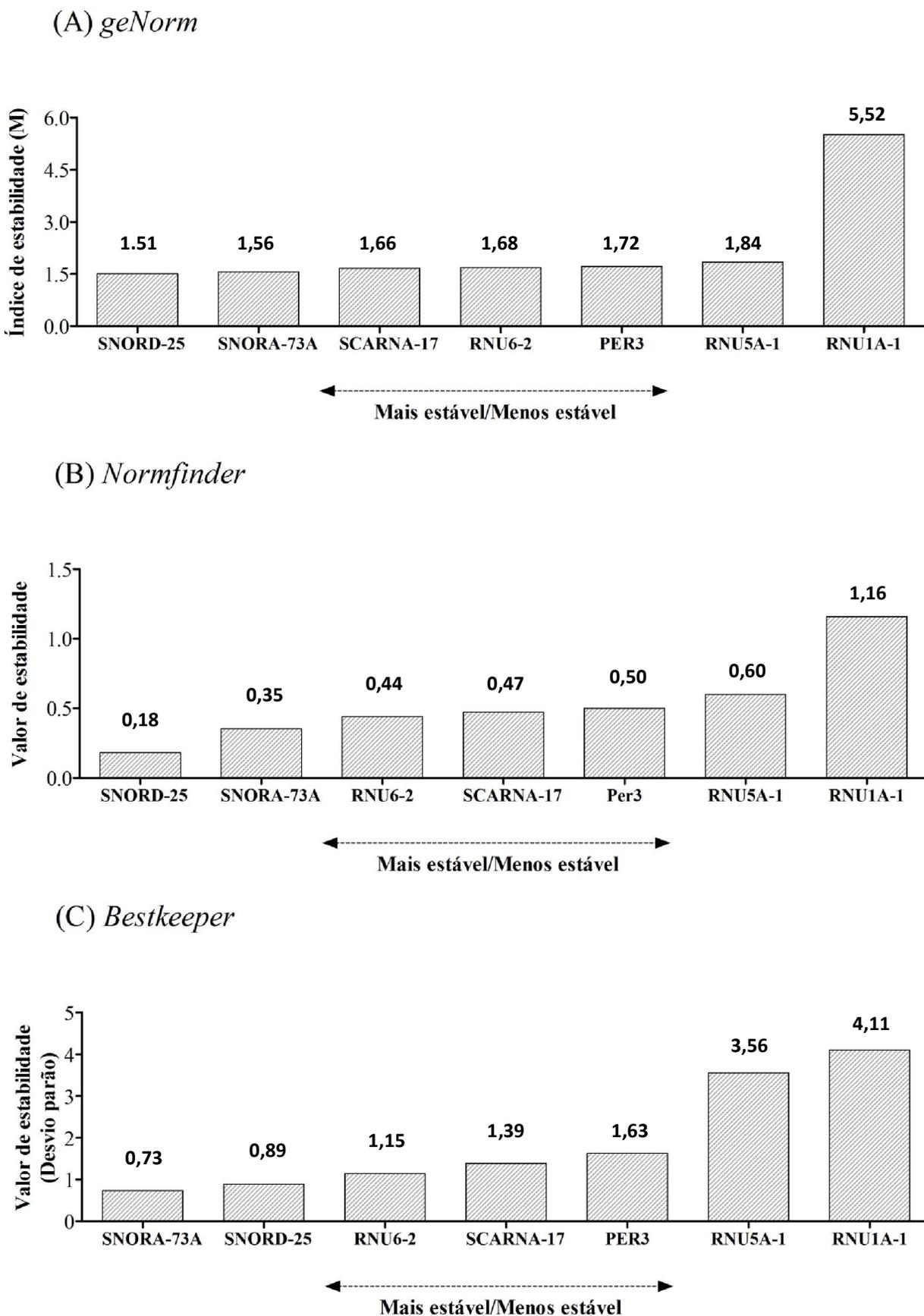
Todos os primers, tanto para miRs quanto para os genes de referência apresentam eficiências para suas reações de RT-QPCR dentro dos padrões sugeridos na literatura, ou seja, entre 90-110% (Anexo 1). Além disso, foram obtidas as respectivas curvas de dissociação (curvas de *Melt*) (Anexo 2).

A média dos Cts (*Cycle Threshold*) das duplicatas das reações de PCR em tempo real, obtidas para RUN6-2, RNU1A-1, RNU5A-1, SNORD-25, SCARNA-17 e SNORA73-A em leucócito total foram utilizadas para a análise da estabilidade dos genes nos programas *BestKeeper*, *geNorm* e *Normfinder*. Na análise inicial com todos os seis genes, para *geNorm* e *Normfinder* SNORD-25 é o gene mais estável e SNORA-73A o segundo (Figura 6). Em *BestKeeper* o resultado é invertido com SNORA-73A com maior estabilidade seguido por SNORD-25 (Figura 6). Em contrapartida RNU1A, RNU5A e *Per3* são os mais instáveis para os três programas (Figura 6).

Ao realizar novas análises utilizando apenas os três genes mais estáveis, observa-se em *geNorm* e *Normfinder* uma mudança nos ranqueamentos onde SNORA-73A passa ser o gene mais estável, seguido por SCARNA-17 e SNORD-25 (Figura 7). Também o programa *BestKeeper* apresenta resultados distintos para o *índice bestkeeper*, quando realizadas análises com os 6 genes (DP = 1,64 e CV (%) = 9,64) ou com os três mais estáveis (DP = 0,71 e CV (%) = 4,23).

Nas figuras 8, 9 e 10 são apresentadas as variações iter-individual, intra-grupo e inter-grupo de todos os genes. Como demonstrado existem muitas diferenças inter-individuais no perfil de expressão dos transcritos (Figura 8).

Figura 6 - Análise da estabilidade com todos os genes de referência.



Nota: Resultados para *geNorm* (A), *Normfinder* (B) e *BestKeeper* (C). Nota: Para *geNorm* M deve ser $\leq 1,5$, para *Bestkeeper* o desvio padrão ≤ 1 .