

**Universidade de Brasília UnB**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Celular**

**Perfil de expressão de miRNAs endócrinos em ilhotas pancreáticas:  
Modulação da sua expressão por citocinas próinflamatórias associadas com a  
etiología da Diabetes tipo 1.**

**Tese de doutorado apresentada ao  
Dept. de Biologia Celular como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Biologia Molecular**

**Orientada: Valia Bravo-Egaña**  
**Orientador: Prof. Dr. Ricardo L. Pastori**  
**Co-Orientador: Profa. Dra. Maria Sueli Felipe**

**BRASÍLIA-DF 2008**

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Fabio Pitella Silva – UnB

Prof. Dr. Jaime Martins De Santana – UnB

Prof. Dr. Marcelo De Macedo Brigido – UnB

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira – Universidade Estadual de Campinas

Profa. Dra. Lidia Maria Pepe De Moraes – UnB

**Índice**

<b>Resumo</b>	<b>4</b>
<b>Summary</b>	<b>5</b>
<b>Introdução</b>	<b>6</b>
Os microRNAs	6
A biogênese dos miRNAs	7
As metodologias usadas para estudar os miRNAs	9
Os padrões de expressão de miRNAs em tecidos e linhagens celulares	10
Os padrões de expressão de miRNAs em doenças	12
<i>Os miRNAs relacionados com o processo inflamatório</i>	<i>13</i>
<i>Os miRNAs relacionados com hipóxia</i>	<i>15</i>
Os miRNAs associados com pâncreas	19
O diabetes	21
As citocinas relacionadas com o T1D	22
As vias de sinalização das citocinas: o papel crítico do NF- $\kappa$ B	23
<b>Hipótese e objetivos</b>	<b>26</b>
<b>Materiais e métodos</b>	<b>29</b>
Os animais	29
A obtenção dos tecidos	29
A cultura de células	32
O tratamento com as citocinas	32
A obtenção dos miRNAs	33
Os microarranjos de miRNAs	33

A análise estatística dos dados dos microarranjos de miRNAs e a seleção do perfil específico de miRNAs	35
A quantificação usando PCR em tempo real	36
A microdissecação por laser	37
A hibridação <i>in situ</i>	37
O modelo do transplante de ilhotas	38
O tratamento com a streptozotocina	39
A imuno-coloração	39
<b>Resultados</b>	<b>40</b>
A otimização de preparações de RNA	40
O perfil de expressão de miRNAs das ilhotas pancreáticas	50
<i>A expressão do miR-7 e do miR-375 no desenvolvimento de pâncreas de camundongo</i>	<i>57</i>
<i>A expressão do miR-7 no desenvolvimento do pâncreas humano</i>	<i>59</i>
O perfil de miRNAs relacionado com o processo de inflamação	61
<i>O perfil de miRNAs relacionado com o processo de inflamação em modelos in vitro</i>	<i>61</i>
<i>O efeito do TNF-<math>\alpha</math> na expressão dos miRNAs na linhagem celular de insulinoma</i>	
<i>NIT-1</i>	<i>61</i>
<i>O efeito do TNF-<math>\alpha</math>, a IL-1<math>\beta</math> e o INF-<math>\gamma</math> no perfil de expressão dos miRNAs em ilhotas de rato</i>	<i>64</i>
<i>O efeito do NF-<math>\kappa</math>B no perfil de expressão de miRNAs em ilhotas de rato</i>	<i>68</i>
<i>O perfil de miRNAs relacionado com o processo de inflamação em modelos in vivo</i>	<i>71</i>
<i>O modelo das ilhotas expostas a um ambiente pró-inflamatório in vivo (o modelo do transplante)</i>	<i>71</i>

<i>O modelo das ilhotas expostas a um ambiente pró-inflamatório in vivo</i>	
<i>(o modelo de indução de diabetes com a estreptozotocina em rato)</i>	74
<i>Determinação do perfil de miRNAs relacionado com o processo inflamatório comparando os dados obtidos em modelos in vitro e in vivo</i>	75
<i>A liberação de moléculas inibitórias da expressão de miRNAs em ilhotas in vivo</i>	77
<b>Discussões</b>	<b>80</b>
Discussões do objetivo 1	80
Discussões do objetivo 2	81
Discussões do objetivo 3	85
<i>A análise computacional para a predição de genes alvo de miRNAs</i>	92
<b>Conclusões</b>	<b>94</b>
<b>Perspectivas do estudo</b>	<b>96</b>
<b>Referencias</b>	<b>97</b>
<b>Appendices</b>	<b>115</b>

## **Resumo**

MicroRNAs (miRNAs) são os produtos gênicos não-codantes (~19-22 nucleotídeos) com um papel chave no regulamento pós-transcricional inibindo a expressão gênica através da união seletiva a seqüências complementares de RNA mensageiro. Nossos resultados indicam que os miRNAs isolados com métodos atualmente usados para preparação de RNA são instáveis assim como também seus cDNAs correspondentes. Estas observações têm grande importância em estudos de análise de expressão de miRNAs. Além, nosso laboratório é pioneiro em determinar perfis específicos de miRNA em ilhotas pancreáticas humanas e de roedores normais assim como em ilhotas expostas à ação de citocinas diabetogênicas pró-inflamatórias. O miR-7 resultou ser o miRNA mais abundante da porção endócrina das ilhotas e o miR-375 o mais abundante no pâncreas. Ambos os miRNAs aumentaram sua expressão durante o desenvolvimento pancreático, assim como também, em ilhotas tratadas com citocinas pró-inflamatórias por 6 horas. Estas observações sugerem que o miR-7 e o miR-375 desempenham um papel importante não apenas durante o processo de desenvolvimento e de manutenção do fenótipo das ilhotas mas também nos sinais de sobrevivência nos primeiros estágios da resposta inflamatória. A pesquisa dos miRNAs e de seus mRNAs alvos pode tornar-se uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e tratamento de doenças tais como o diabetes.

## Summary

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding gene products (~19–22 nucleotides) that play a key role in post-transcriptional regulation by inhibiting gene expression through selective binding to complementary messenger RNA sequences. Our early results indicated that miRNAs isolated with currently used methods for RNA preparation are unstable and so are their corresponding cDNAs. These observations should be of great interest to all researches that outsource RNA samples for miRNA gene array analysis. We are first to determine specific miRNA signatures in normal pancreatic islets as well as in islets exposed to pro-inflammatory (diabetogenic) cytokines. MiR-7 emerged as the most abundant endocrine islet miRNA and miR-375 as the most abundant intra-islet miRNA. Both miRNAs increased their expression during pancreatic development as well as in islets treated with pro-inflammatory cytokines for 6 hours. This suggests that miR-7 and miR-375 play an important role not only in development and islet phenotype maintenance but also in the survival signaling at the early inflammatory response. The research of miRNAs and their target mRNAs could be a valuable tool in diagnostics by indicating the early onset of diseases such as diabetes and by finding new therapeutic targets to treat them.

## **Introdução**

### **Os microRNAs**

Os microRNAs (miRNAs) têm sido descritos tanto em células de plantas quanto de animais, eles são moléculas pequenas de RNA não codificadores de 19-22 nucleotídeos (1-4). Os miRNAs têm um papel fundamental na regulação da expressão gênica em eventos biológicos chaves tais como a proliferação celular, a diferenciação, a transformação maligna e a morte. Eles reconhecem e ligam-se às seqüências parcialmente complementares do RNA mensageiro (mRNA) alvo, afetando a expressão gênica e regulando a tradução do mRNA. Seiscentos e noventa e cinco miRNAs têm sido identificados em humanos até hoje. Eles estão alistados na base de dados de miRNAs disponível na rede através do Instituto Sanger (<http://microrna.sanger.ac.uk/index.shtml>) (5-7). È esperado que nos próximos anos o número de miRNAs aumente possivelmente até 1000 (4). Dos 695 genes codificadores para miRNAs humanos conhecidos, 131 têm sido experimentalmente (8)validados.

De acordo com dois estudos bio-computacionais (9,10), entre 20% e 25% dos genes de mamíferos poderiam ser regulados por miRNAs (9). A maioria dessas moléculas encontradas em humanos age como inibidores da expressão gênica (11). As combinações particulares de miRNAs expressos em vários tipos celulares podem regular genes alvos específicos. Os miRNAs podem ligar-se a diversos mRNAs, individualmente ou em combinação com outros, e controlar de essa forma redes regulatórias altamente complexas (12). Recentemente, tem sido mostrado que alguns miRNAs têm dupla função; sendo reguladores chaves do desenvolvimento pancreático embrionário, assim como da função endócrina em adultos (13,14).

### **A biogênese dos miRNAs**

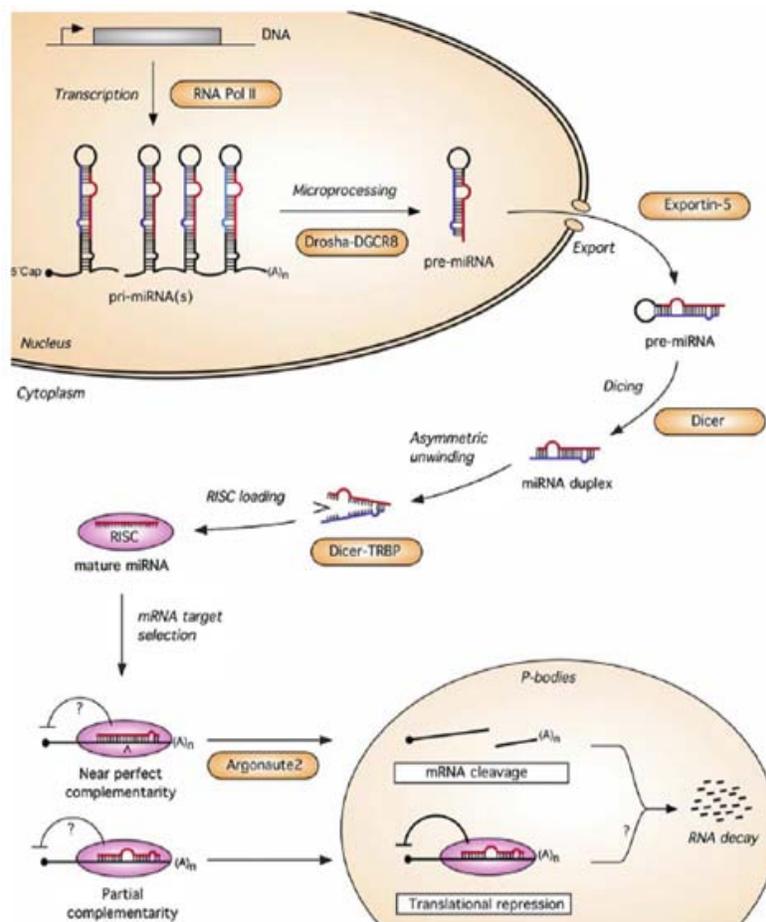
Os genes codificadores para miRNAs são transcritos pela RNA polymerase II (Pol-II). A geração de miRNAs começa com a clivagem de seus precursores no núcleo pela endonuclease Drosha que é uma RNase tipo III (4,15). A Drosha age como um grande complexo. Neste complexo, ela interage com a proteína da região cromossomal da síndrome de Di George (DGCR8). A DGCR8 tem um módulo de união ao RNA que serve como um componente essencial do complexo de processamento dos pri-miRNAs, junto com a Drosha. O processo de clivagem libera uma alça de ~60-70 nucleotídeos, que se denomina pré-miRNA. Este é transportado ativamente ao citoplasma pelo receptor exportador exportin-5 (16,17). O pré-miRNA é processado no citoplasma pela enzima Dicer (15), um outro membro da família das proteínas ribonucleases III que também desempenha um papel no RNA de interferência, segundo tem sido recentemente mostrado (18). O produto da clivagem do RNA de dupla fita de ~21 nucleotídeos é desnaturado subsequentemente pela ação de helicases no miRNA ativo de fita simples. Este junto com a proteína de resposta trans-ativadora (TAR) e a proteína de união ao RNA (TRBP) formam o complexo de ribonucleoproteínas conhecido como RISC pelas siglas em inglês (complexo de indução de silenciamento do RNA) (18-20). O RISC guia ao miRNA específico a seu RNA mensageiro alvo. Perante a união com o mRNA alvo, o miRNA unido ao RISC clivará o mRNA ou suprimirá sua tradução, dependendo do grau de homologia existente entre as seqüências do miRNA e o mRNA alvo. Se as seqüências têm 100% de homologia o mRNA será clivado; se há algumas discrepâncias, ocorrerá a inibição da tradução.

O componente crítico do complexo RISC é a proteína Argonauta 2 (Ago2), um membro da família das proteínas Argonautas (21). Estas proteínas são os componentes catalíticos do RISC. Ago2 é a única Argonauta humana com atividade endonuclease intrínseca, codificada por seu

domínio PIWI, que se assemelha estruturalmente ao domínio do RNase H (22). Este domínio é o único componente exigido para a atividade do RISC (23-26).

A união do miRNA ao mRNA alvo ocorre geralmente na região 3'UTR do mRNA, e envolve os nucleotídeos do 2 ao 8 do extremo 5' do miRNA, esta sequência é conhecida como sequência “semente” (27).

Estudos recentes têm mostrado que os transcritos de mRNA unidos ao RISC podem ser suprimidos ao nível de tradução da proteína, desestabilizados por deadenilação ou degradados pela Ago2 (23,24,28-30). Estes processos ocorrem nos corpos de processamento (corpos-P). A biogênese do miRNA é descrita na figura 1.



**Figura 1.** A biogênese dos miRNAs. Obtido de Plasterk, R. (31).

### **As metodologias usadas para estudar os miRNAs**

Os métodos que têm sido usados para estudar os miRNAs enfrentam várias dificuldades relacionadas com as características específicas destas moléculas, tais como seu tamanho pequeno e o fato de não ter uma âncora comum, ao contrário dos mRNA, que têm uma cauda de poliA. Estas características fazem da detecção e quantificação dos miRNAs um procedimento desafiante. Assim, os diferentes métodos precisam da extensão da extremidade 3'.

O envolvimento destas moléculas em uma vasta quantidade de processos biológicos, normais e anormais, indica a importância de desenvolver tecnologias confiáveis para os estudos de expressão dos mesmos. Entre os diversos métodos usados para estudar perfis de expressão de miRNAs estão o *northern blotting* com marcas radioativas e sondas contendo ácidos nucleicos “fechados” (LNA) (32,33), a clonagem (34), o PCR quantitativo de precursores ou de miRNAs maduros (35,36), as técnicas baseadas na análise seriada da expressão gênica (SAGE) (37), os métodos baseados no uso de esferas (38,39) e os microarranjos de oligonucleotídeos (40-42). O uso de microarranjos tem sido a aproximação mais popular. Esta técnica possibilita a análise dos níveis de expressão de centenas de genes de miRNAs num mesmo ensaio.

Os arranjos de miRNAs estão sendo desenvolvidos na atualidade para explorar sua biogênese, sua distribuição nos tecidos, sua expressão diferencial entre os estados normal e anormal, na caracterização de doenças, no desenvolvimento embrionário, e nos mecanismos de ação e da tumorigênese (43-45). Além disso, os cientistas estão também conduzindo estudos para determinar os perfis de expressão de miRNAs que possam levar ao uso dos mesmos para o diagnóstico molecular de doenças e para a avaliação da eficácia e a toxicidade de drogas. Porém, o estabelecimento de perfis de expressão de miRNAs é um campo relativamente novo. Os parâmetros acima mencionados, fazem a adaptação da tecnologia de microarranjos para a análise

da expressão de miRNAs muito desafiadora (41). Todas essas metodologias dependem do desenvolvimento de protocolos específicos para a preparação de RNA que preservem moléculas pequenas.

A estabilidade dos miRNAs em preparações de RNA é um fator importante a ser considerado durante o trabalho com miRNAs em geral e para estudos específicos de expressão. Em nossos experimentos iniciais observou-se uma falta de reprodutibilidade em relação ao tempo de estocagem após o isolamento do RNA. Outros laboratórios têm feito observações similares. Até o momento, a instabilidade dos miRNA não foi rigorosamente estudada. Este é um aspecto crucial para a análise de expressão gênica destas moléculas. Conseqüentemente nosso primeiro ponto de interesse neste trabalho é estudar este fenômeno.

### **Os padrões de expressão de miRNA em tecidos e linhagens celulares**

Em vários estudos feitos em células de mamíferos observou-se que os miRNAs são regulados durante o desenvolvimento embrionário e têm padrões específicos em células e tecidos. Por exemplo, miR-181 tem um papel crítico na modulação da diferenciação da linhagem hematopoiética. A expressão ectópica do miR-181 em células tronco progenitoras de células hematopoiéticas conduz a um aumento da proporção de células B, *in vitro* e *in vivo*, porque este miRNA é expresso preferencialmente em células B (46,47); O miR-1 e o miR-133 têm papéis críticos na proliferação e diferenciação do músculo esquelético (48). O miR-221 inibe o crescimento normal das células eritropoiéticas, enquanto o miR-143 regula a diferenciação dos adipócitos (49). O miR-122 tem sido descrito como um miRNA específico do fígado. A inibição deste miRNA em camundongos normais resultou na diminuição dos níveis do colesterol no plasma, no aumento da oxidação dos ácidos graxos do fígado e na diminuição das taxas de

síntese dos ácidos graxos e do colesterol do fígado. Estes resultados implicam que o miR-122 é um regulador chave do metabolismo do colesterol e dos ácidos graxos no fígado adulto de camundongos (50). O miR-208 é expresso especificamente no coração e em níveis muito baixos no pulmão. Sua expressão ou interação com seus mRNA-alvos poderiam aumentar potencialmente a função cardíaca mediante a supressão da expressão da cadeia pesada da  $\beta$ -miosina ( $\beta$ MHC) (51).

Além dos dados que existem a respeito da função dos miRNAs individuais, está sendo demonstrado que os diferentes tipos de células de mamíferos apresentam perfis de expressão de miRNA únicos. Por exemplo, no cérebro o perfil de miRNAs difere nos vários estágios do desenvolvimento (52). Foram encontrados perfis únicos de miRNAs em células tronco embrionárias humanas (53) e durante o megacariocitopoiese (54). Também tem sido mostrada a existência de padrões específicos de expressão de miRNAs no coração e no fígado (55). Monticelli e seus colaboradores (56) utilizaram microarranjos de oligonucleotídeos para analisar sistematicamente perfis de miRNAs em células hematopoiéticas de camundongos. Eles observaram padrões de expressão muito diferentes entre células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, com diferenças sutis entre as várias linhagens hematopoiéticas.

Um estudo recente desenvolvido por Landgraf e seu grupo, é muito relevante para este tópico. O grupo obteve a seqüência de mais de 250 “bibliotecas” pequenas de RNA provenientes de 26 órgãos e tipos celulares diferentes de humanos e roedores. Eles apresentaram perfis de expressão derivados dos dados da contagem de clones, e mostraram que um grupo relativamente pequeno de miRNAs foi ubiqüitariamente expresso, reforçando o conceito de que linhagens celulares e tecidos diferentes têm perfis específicos de miRNAs. Além disso, este vasto estudo fornece detalhes e informações muito valiosas sobre as seqüências maduras, os precursores, as

localizações no genoma, os processos de maturação, as unidades transcricionais e os padrões de conservação destas moléculas (57).

### **Os padrões de expressão de miRNAs em doenças**

Vários estudos recentes mostram a conexão entre miRNAs e doenças humanas. Um dos primeiros vínculos estabelecidos foi encontrado na síndrome da X frágil, uma doença genética causada pelo silenciamento transcricional da proteína de atraso mental X frágil (FMRP) (58). Num outro estudo (59), os autores examinaram os perfis de expressão de certos miRNAs hematopoiéticos tais como o miR-142, o miR-155, o miR-181 e o miR-223 em 17 linhagens celulares hematopoiéticas malignas e compararam eles com perfis de miRNAs de linhagens celulares humanas altamente purificadas de células B, T, monócitos e granulócitos. Eles encontraram padrões de expressão de miRNAs similares entre estas e as linhagens hematopoiéticas humanas normais. Contudo, os níveis de expressão entre eles foram diferentes, sugerindo que a expressão de miRNAs pode ser diferente entre os estados saudável e doente. Outros estudos mostram a correlação de vários cânceres com mutações de miRNAs assim como com perfis específicos de expressão de miRNAs (38,60-63), indicando que estas moléculas podem funcionar como supressores ou indutores de tumores (60). Por exemplo, quantidades mais baixas de miR-145 e de miR-143 são encontradas no câncer colorctal (64). O miRNA-372 e o miRNA-373 têm sido implicados como estimuladores de oncogenes em tumores de células germinais testiculares (65,66). O miR-15 e o miR-16 estão significativamente diminuídos ou mesmo ausentes em 68% dos pacientes com leucemia crônica dos linfócitos (CLL), sugerindo que estes dois miRNAs inibem o desenvolvimento do tumor promovendo apoptose através de seu alvo experimental confirmado o Bcl-2 (67). Assim, os perfis de miRNAs poderiam ter valor

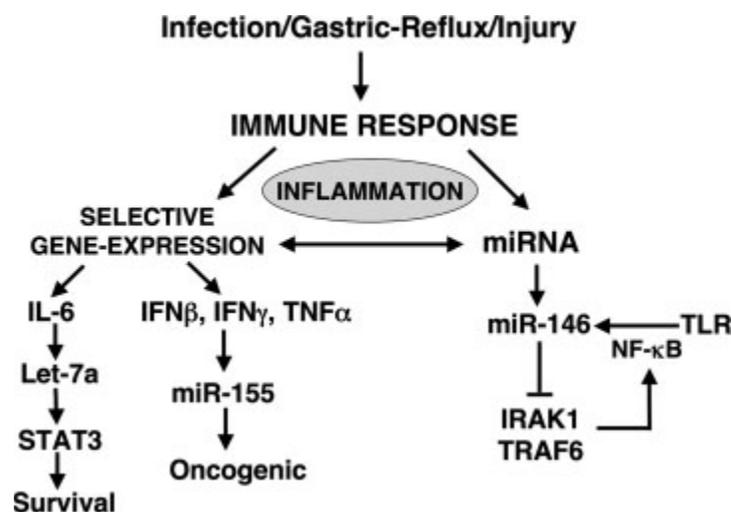
para o prognóstico e progressão da doença nos pacientes com CLL (68). O miR-17-5p, o miR-20a e o miR-106a inibem a diferenciação e a maturação dos monócitos ligando-se e inibindo a expressão da proteína mielóide da leucemia-1 aguda (AML1, igualmente conhecidas como RUNX1) e diminuindo subsequente a expressão do receptor de estimulação do fator da colônia do macrófago (M-CSFR) (69). O mesmo estudo mostrou que a AML1 se une a promotores dos agrupamentos de miRNAs: miR-17-5p-92 e miR-106a-92 e inibe transcricionalmente a expressão do miR-17-5p, do miR-20a e do miR-106a, indicando a existência de uma retroação negativa.

Determinados perfis de miRNAs são associados com certos tumores sólidos, incluindo os do peito, do pâncreas, do estômago, do reto, da próstata e do pulmão (61). Também têm sido encontrados perfis de miRNAs diferenciados para as células de pulmão normais e cancerígenas. A análise estatística confirmou estas diferenças significativas; mostrando-se que estes perfis têm um valor crucial como marcadores de prognóstico em câncer pulmonar (70) e em pacientes com hepatocarcinomas (71).

#### *Os miRNAs relacionados com o processo inflamatório*

Existem evidências substanciais que confirmam o papel dos miRNAs em processos inflamatórios. A complexidade do sistema imune requer o uso de diferentes mecanismos bem coordenados para controlar sua iniciação e término. Os miRNAs têm o potencial de mediar a regulação complexa da expressão gênica associada com a resposta imune. A associação da inflamação com estas pequenas moléculas sugere duas perguntas óbvias: a inflamação causa a expressão de miRNAs específicos? e/ou os miRNAs associados com a inflamação regulam a expressão dos genes que são expressos durante uma resposta inflamatória? As respostas a estas

perguntas podem identificar novas conexões entre a inflamação e o câncer. Os resultados de estudos que tentam responder estas perguntas começam emergir. Existem evidências de que os miRNAs são importantes reguladores da resposta imune inata (72). A associação dos miRNAs com inflamação e câncer está esquematizada na figura 2.



**Figura 2. Alguns exemplos das interações citocinas-miRNAs no processo inflamatório (73).**

A ativação inflamatória dos monócitos conduz à indução de miR-146 dependente de NF- $\kappa$ B, que, por sua vez, inibe o fator 6 associado ao receptor do TNF (TRAF6) e aos genes da quinase 1 associada ao receptor da IL-1 (IRAK1), duas moléculas chaves "downstream" aos mecanismos de sinalização do receptor similar a Toll das citocinas (74). O miR-155 é um outro miRNA cuja expressão é substancialmente diminuída nos macrófagos de camundongo ativados com o ácido poliriboinosínico, o ácido poliribocitidílico ou o IFN- $\beta$  (75). Muito interessante é o fato de que esta indução envolve as vias do TNF- $\alpha$  e da JNK, e pode ser considerada como um alvo comum e crítico dos mediadores inflamatórios. Ratos deficientes em miR-155 são imunodeficientes e têm uma resposta defeituosa do centro germinal (76,77). A IL-6 induz o miR-let-7a e contribui para seu efeito de sobrevivência aumentando os transdutores e ativadores de sinais para a

fosforilação do fator de transcrição-3 (STAT3) por um mecanismo que envolve o gene da neurofibromatose 2 (NF2) nos colangiócitos humanos (78). Além disso, outros dados sugerem que determinados miRNAs poderiam influenciar a apoptose. Por exemplo, a expressão do miR-146a foi aumentada por lipopolisacarídeos e/ou por o TNF- $\alpha$  na linhagem celular THP-1 da leucemia monocítica aguda humana (74). O miR-21 pode funcionar como antiapoptótico ou antiproliferativo dependendo do tipo de tecido onde é expresso (79). A inibição de sete miRNAs (o miR-1d, o miR-7, o miR-148, o miR-204, o miR-210, o miR-216 e o miR-296) conduz ao aumento da atividade da caspase-3. O miR-214 conduz à diminuição da atividade da caspase-3 (80). Estes estudos fornecem evidências da conexão entre os miRNAs, o processo inflamatório e o câncer.

#### *Os miRNAs relacionados com hipóxia*

Os mecanismos moleculares de resposta à hipóxia são extremamente complexos. O papel chave é desempenhado pelo regulador transcricional, do fator indutor da hipóxia, que controla a expressão de uma grande variedade de genes provavelmente críticos para a adaptação a condições de baixo oxigênio (81-86). Em estudos recentes sugere-se que os miRNAs poderiam ser parte deste processo. Assim, tem sido identificado um grupo de miRNAs regulados pela hipóxia (os HRMs, do inglês) (87), fornecendo uma ligação adicional entre o fator de estresse específico de tumor e o controle da expressão gênica. O grupo dos HRMs inclui: o miR-21, o miR-23a, o miR-23b, o miR-24, o miR-26a, o miR-26b, o miR-27a, o miR-30b, o miR-93, o miR-103, o miR-106a, o miR-107, o miR-125b, o miR-181a, o miR-181b, o miR-181c, o miR-192, o miR-195, o miR-210 e o miR-213, os quais foram induzidos consistentemente em células de câncer de peito e de reto sob circunstâncias hipóxicas (88). Três artigos adicionais mostram

que os miRNAs respondem às condições de baixo oxigênio com algumas notáveis similaridades, incluindo a indução do miR-210, o miR-30b, o miR-93 e o miR-181b (89-91). Um outro grupo de miRNAs foi identificado com expressão diminuída em células hipóxicas; entre eles estão: o miR-15b, o miR-16, o miR-19a, o miR-20a, o miR-20b, o miR-29b, o miR-30b, o miR-30e-5p, o miR-101, o miR-141, o miR-122a, o miR-186, o miR-320 e o miR-197 (89-91). Uma resposta muito interessante é a apresentada pelos membros da família do let-7, que parecem exibir padrões de ação contrastantes durante condições de hipóxia. Isto tem sido mostrado por diferentes grupos em vários tipos celulares. Assim, o let-7g, o let-7e e o let-7i foram identificados como induzidos pela hipóxia enquanto que os níveis do let-7a, o let-7c, o let-7d, o let-7e, o let-7f e o let-7g diminuíram durante a exposição a estas condições (89,90). Isto sugere que a família do let-7 contém miRNAs que respondem a hipóxia em uma maneira específica para diferentes tipos celulares. Um sumário de todos os miRNAs encontrados como responsivos a condições de hipóxia (seja por indução ou por repressão) é apresentado na tabela 1.

MicroRNAs upregulated by hypoxia		MicroRNAs downregulated by hypoxia	
Mir-7	3	Mir-15b	2
Mir-15a	3	Mir-16	2
mir-21	1	Mir-19a	3
mir-23a	1	Mir-20a	2
Mir-23b	1	Mir-20b	2
Mir-24	1	Mir-26b	2
Mir-26a	1	Mir-29b	3
Mir-26b	1	Mir-30b	2
Mir-27a	1	Mir-30e-5p	3
Mir-30b	1, 3	Mir-101	3
Mir-30d	2	Mir-122a	3
Mir-93	1, 4	Mir-141	3
Mir-98	3	Mir-186	3
Mir-103	1	Mir-195	3
Mir-106a	1	Mir-197	3
Mir-107	1	Mir-224	2
Mir-125b	1	Mir-320	3
Mir-148a	3	Mir-374	3
Mir-148b	3	Mir-422b	3
Mir-151	2	Mir-424	3, 4
Mir-155	2	Mir-565	3
Mir-181a	1	Let-7-a	2
Mir-181b	1, 2	Let-7-c	2
Mir-181c	1	Let-7-d	2
Mir-188	2	Let-7-e	2
Mir-191	3	Let-7-f	2
Mir-192	1	Let-7-g	2
Mir-195	1		
Mir-200a	3		
Mir-210	1, 2, 3		
Mir-213	1		
Mir-214	3		
Mir-373	3		
Mir-429	3		
Mir-498	3		
Mir-563	3		
Mir-572	3		
Mir-628	3		
Mir-637	3		
Let-7-e	3		
Let-7-g	3		
Let-7-i	3		

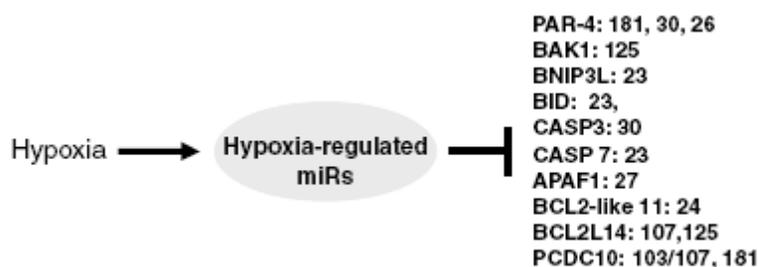
**Tabela 1. A compilação dos miRNAs associados com a resposta à hipóxia segundo as publicações recentes (87).**

Adicionalmente, aproximadamente 6% dos miRNAs humanos exibem seqüências complementares ao fator indutor da hipóxia (HIF, do inglês) que são significativamente conservadas através de 17 espécies, refletindo sua importância funcional (92). Recentemente foi mostrado que certos fatores de transcrição que respondem à hipóxia/anóxia sob determinadas

condições, tais como a p53 e o NF- $\kappa$ B, afetam a expressão de distintos miRNAs (93,94). Também foram identificados outros sítios-alvo candidatos à união de HRM em diferentes fatores da transcrição, alguns deles exibem um alto nível de conservação evolucionária, sugerindo um papel biológico importante. Por exemplo, o miR-210 mostra diversos sítios complementares aos genes alvos que poderiam potencialmente regular sua expressão como parte da resposta à hipóxia (87).

É muito provável que cada HRM regule mais de 10 genes, em alguns casos podendo chegar a 200. Entre os mais importantes genes-alvo estão os reguladores da morte celular, devido à importância deste processo em um ambiente de estresse, tal como a hipóxia (87).

Diversos genes alvos potenciais dos HRMs são importantes na resposta apoptótica, de acordo com os programas para predição disponíveis. Por exemplo, para o PAR-4 (o miR-26, o miR-30 e o miR-181), para o PCDC10 (o miR-103/107 e o miR-181), para o BID (o miR-23), para o BIM (o miR-24); para o CASP3 (o miR-30), para o CASP 7 (o miR-23), para o APAF1 (o miR-27), para o BAK1 (o miR-26) e para o Bnip3L (o miR-23) entre outros como é visto na figura 3.



**Figura 3. A seleção de genes alvos dos HRM associados com apoptose (são usados os símbolos oficiais dos genes) (87).**

Em geral, existem cada vez mais evidências de que os miRNAs regulam a expressão gênica nos estados de saúde e de doença. O conhecimento da expressão dos miRNA pode fornecer

importantes marcadores para o diagnóstico de doenças humanas. Outras pesquisas adicionais nesta área podem identificar os miRNAs ou os perfis de miRNAs que têm valor para diagnóstico.

### **Os miRNAs associados com o pâncreas**

É relevante para esta proposta o fato de que diferentes miRNAs têm sido associados com o desenvolvimento, a fisiologia e as doenças do pâncreas. Por exemplo, o Foxa2 (“forkhead box A2”) que é um fator da transcrição crucial para o desenvolvimento do pâncreas é regulado pelo miR-124a. O miR-124a regula igualmente os alvos do Foxa2, tais como o pdx-1 (“pancreatic and duodenal homeobox 1”), o kir6.2 (a subunidade maior do “ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel”) e o sur1 (“sulfonylurea receptor 1”), que são essenciais para o desenvolvimento normal do pâncreas e têm um papel importante no metabolismo da glicose e da secreção da insulina (95). Certos estudos recentes indicam que o miR-15a, o miR-15b, o miR-16 e o miR-195 têm papéis importantes na regulação da tradução da neurogenina3 (ngn3). A ngn3 é um regulador fundamental do desenvolvimento do pâncreas endócrino e é essencial para a expressão da insulina em células de fígado de rato, no tecido acinar, no epitélio do intestino e nas células tronco (96-101). Tem sido proposto que o miR-23b está envolvido no regulamento da proteína hes1 (“hairy and enhancer of split 1”), a qual controla o número de células produtoras da ngn3 durante o desenvolvimento pancreático (102).

Outras evidências recentes sugerem que os miRNAs podem ter um efeito no regulamento da secreção de insulina; especificamente, foi mostrado que o aumento na expressão do miR-375 suprime a secreção da insulina estimulada pela glicose e inversamente, a inibição do miR-375 endógeno favorece a secreção da insulina (103). O miR-375 controla negativamente a secreção de insulina nas células  $\beta$  mediante a interação com seu gene alvo, a miotrofina (Mtpn). Este gene

foi descrito originalmente atuando no transporte vesicular em neurônios. Outro miRNA com função biológica em células produtoras de insulina é o miR-9. Tem sido mostrado que ele reprime a expressão do fator da transcrição *onecut-2* (“one cut homeobox 2”), que afeta por sua vez a secreção de insulina através da granofilina/*slp4*, uma GTPase efetora de Rab associado com vesículas secretoras da insulina (104). Também o miR-124a e o miR-96 têm sido relacionados com a modulação da expressão das proteínas envolvidas na exocitose da insulina e que afetam a secreção das células  $\beta$  na linhagem celular MIN6B1. O aumento da expressão do miR-124a conduz à liberação exagerada de hormônios sob condições basais e à redução da secreção induzida pela glicose. O miR-96 aumenta os níveis de mRNA e de proteína da granofilina, que é um modulador negativo da exocitose da insulina, e diminui a expressão do *Noc2*. O *Noc2* é um parceiro potencial das pequenas GTPases Rab3 e Rab27 que estão associados com os grânulos secretores das células  $\beta$  pancreáticas e regulam a exocitose da insulina. A diminuição da expressão de *Noc2* resulta numa menor capacidade das células MIN6B1 para responder aos secretagogos (105).

Bloomston e colaboradores identificaram perfis específicos de miRNAs conectados com patologias pancreáticas, tais como a pancreatite crônica e o câncer pancreático. Eles compararam os miRNAs diferencialmente expressos no câncer pancreático e no tecido pancreático benigno adjacente, assim como no câncer pancreático e na pancreatite crônica, e no tecido pancreático normal e na pancreatite crônica (106).

A despeito dos estudos acima mencionados, os perfis de expressão dos miRNAs do pâncreas endócrino e do exócrino ainda não foi identificado.

## **O diabetes**

O diabetes é uma doença crônica caracterizada pelo aumento da glicose no sangue como resultado dos defeitos na produção ou na ação da insulina. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 180 milhões de pessoas no mundo inteiro têm diabetes. Estima-se que este número aumentará mais do que o dobro em 2030. Em 2005, 1.1 milhão de pessoas morreram como consequência de complicações derivadas do diabetes. Quase 80% das mortes relacionadas com diabetes ocorrem em países com rendas baixas ou médias. Quase a metade das mortes por diabetes ocorre em pessoas com menos de 70 anos de idade.

Os dois tipos principais da doença são o diabetes tipo 1 (T1D) e o diabetes tipo 2 (T2D) (107). Ambos os tipos são caracterizados pela falência progressiva das células  $\beta$  pancreáticas. No T1D, isto é causado tipicamente por uma desordem auto-imune em que as células  $\beta$  produtoras de insulina são destruídas seletivamente. A patogênese do (T2D) é mais variável, compreendendo graus diferentes de falência das células  $\beta$  relativos aos diferentes graus de resistência à insulina. A forma clínica mais agressiva e severa da doença é o T1D. A predominância de T1D nos Estados Unidos é estimada em aproximadamente 120.000 indivíduos de idade menor ou igual a 19 anos de idade e em aproximadamente 500.000 indivíduos no total. A incidência desta doença é de aproximadamente 30.000 novos casos todos os anos (108), com a incidência maior do começo da doença na juventude. O T1D é uma doença multifatorial em que os fatores genéticos, ambientais, e imunológicos conduzem à resposta auto-imune e finalmente à destruição das células  $\beta$  pancreáticas (107). As ilhotas pancreáticas são infiltradas pelos linfócitos, em um processo denominado de insulite, que representa a indicação distintiva da doença.

A insulite é caracterizada pela infiltração pelos macrófagos citotóxicos e pelas células T que produzem citocinas tais como a interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), o fator de necrose de tumores- $\alpha$  (TNF-

$\alpha$ ) e o interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) assim como dos radicais livres que danificam direta e indiretamente as células  $\beta$  (107).

### **As citocinas relacionadas com o T1D**

Existem vários tipos de linfócitos T. Entre eles encontram-se os linfócitos T CD4 cuja função é regular e amplificar os diferentes componentes do sistema imune. Os linfócitos CD4+ se subdividem a sua vez em subpopulações Th1 y Th2. As citocinas da subpopulação CD4 Th1; a IL-1 $\beta$ , o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , são os efetores mais importantes da morte implicados na etiologia do T1D. O vínculo entre estas citocinas e o T1D foi primeiramente estabelecido pela prova de que seus mRNAs estão elevados em ilhotas inflamadas. Foi mostrado que estas citocinas são deletérias para as ilhotas pancreáticas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (109,110) e acredita-se que desempenham um papel importante durante o desenvolvimento da forma espontânea da doença (111).

A exposição das células  $\beta$  à IL-1 $\beta$ , ao IFN- $\gamma$  e ao TNF- $\alpha$  *in vitro*, causa mudanças funcionais similares àquelas observadas nos pacientes antes que desenvolvam a doença. Essas mudanças são: os níveis da pró-insulina/insulina elevados e a perda preferencial da primeira fase da secreção da insulina em resposta à glicose (112). Após a exposição prolongada à combinação das citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas não a nenhuma delas sozinhas. Essa deficiência funcional leva ao dano e à morte das células  $\beta$  (113).

A indução com o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e o IFN- $\gamma$  causa aumento da síntese de óxido nítrico e a subsequente formação do radical NO assim como de outros radicais livres que contribuem ao dano das células  $\beta$  (114-116).

Em conclusão, tem sido observada uma correlação entre a insulite destrutiva das células  $\beta$  e a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Embora, esta observação não prove diretamente o papel patogênico destas citocinas, observou-se que a combinação de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , induz dano funcional e morfológico nas células  $\beta$  de ilhotas humanas e de roedores em uma forma dependente do tempo e da dose (118).

### **As vias de sinalização das citocinas. O papel crítico do NF- $\kappa$ B**

A IL-1 $\beta$  une-se ao seu receptor o IL1R1 conhecido também como o CD121a (aglomerado de diferenciação 121a) seguido pela ativação do fator de transcrição, o fator- $\kappa$ B nuclear (NF- $\kappa$ B) nas células das ilhotas humanas e de roedores (113) como é apresentado na figura 4. O NF- $\kappa$ B regula a expressão da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) em células  $\beta$  (119), e aproximadamente 50% dos genes modificados nas células  $\beta$  após 12 horas de exposição às citocinas são secundários na formação do NO mediada pela iNOS. O NF- $\kappa$ B regula positiva e provavelmente indiretamente a expressão de outros fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação da função das células  $\beta$  via produção de óxido nítrico (NO); exemplo desses genes são: o pdx-1 e o Isl-1 (120).

Em resumo, a ativação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1 $\beta$  desempenha um papel crucial controlando diferentes redes reguladores de genes, afetando o estado diferenciado das células  $\beta$  e a homeostase de Ca<sup>2+</sup> no retículo endoplasmático, atraindo e ativando as células imunes, e contribuindo diretamente para a apoptose da célula  $\beta$ .

Durante a resposta imune fisiológica, o TNF- $\alpha$  une-se ao seu receptor TNFR1, induzindo sua associação com a proteína adaptadora TRADD (proteína adaptadora R do TNF com um domínio de morte) seguido pela união a uma outra proteína adaptadora chamada TRAF2 (fator 2

associado ao receptor do TNF), esta união conduz à ativação do NF- $\kappa$ B que leva à via apoptótica através da ativação das procaspase-8 e procaspase-10. O sinal apoptótico resulta na permeabilidade da membrana das mitocôndrias (121,122) e à liberação do citocromo c das mitocôndrias no citosol (121,123,124). O citocromo c citosólico medeia a ativação das caspases que acarreta a proteólise de substratos e a fragmentação do DNA.

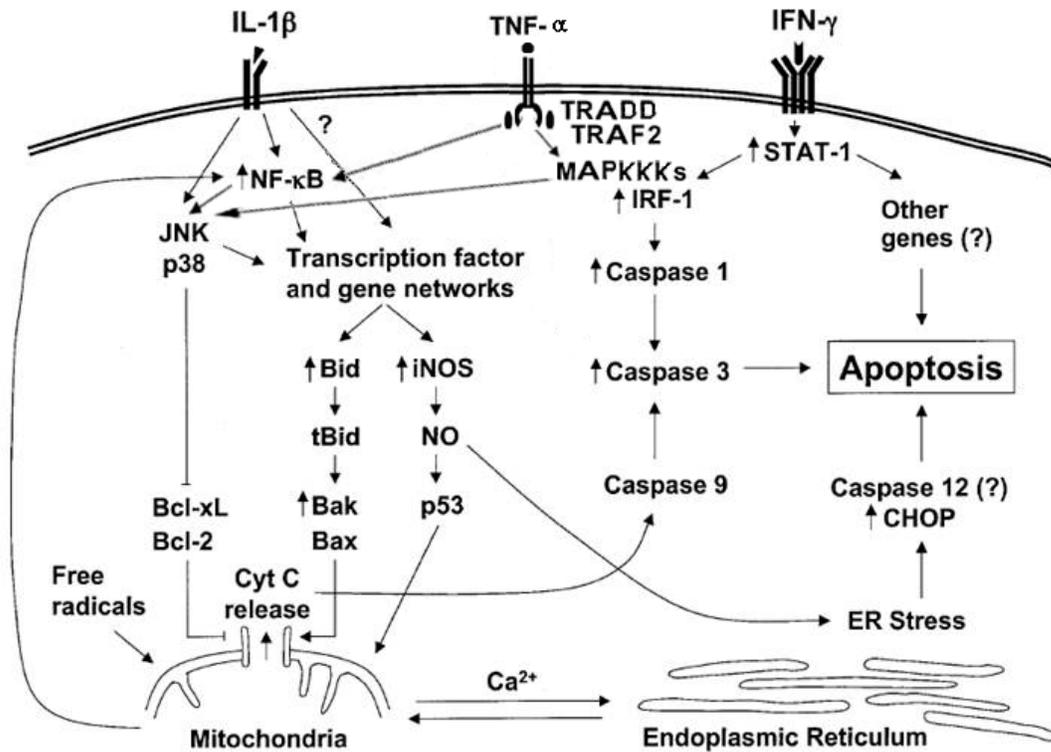
Quando o TNF- $\alpha$  é usado *in vitro* sem nenhuma outra citocina, a ativação do TNFR1 pelo TNF- $\alpha$  pode levar tanto à morte celular programada quanto à sobrevivência através do NF- $\kappa$ B (125-127). A ativação do NF- $\kappa$ B provoca uma resposta antiapoptótica através da indução de proteínas tais como a A20 e a GADD45 $\beta$  (a qual para o crescimento e danifica o DNA) que suprimem a quinase pró-apoptótica do estresse o JNK (quinase N-terminal JUN). Aliás, quando o TNF- $\alpha$  é usado em combinação com a IL-1 $\beta$  e o IFN- $\gamma$  o efeito de sobrevivência é eliminado (118).

O IFN- $\gamma$  liga-se aos receptores da superfície celular e ativa as tirosina-quinases JAK1 e JAK2. Estas quinases fosforilam o fator de transcrição STAT-1, que se dimeriza e se transloca ao núcleo para ligar-se aos sítios  $\gamma$ -ativados de diversos genes (113) como é mostrado na figura 4. A atividade transcricional do STAT é regulada por múltiplos mecanismos retroativos negativos. Estes incluem a desfosforilação da JAK e dos receptores de citocinas pelas tirosina-fosfatases (SHP) e a inibição das atividades enzimáticas da JAK pela família dos supressores dos sinais das citocinas.

Não obstante, alguns estudos indicam que as citocinas pró-inflamatórias causam citotoxicidade primária nas células  $\beta$  através de um mecanismo não apoptótico ligado à diminuição dos níveis de ATP (128).

Um número de vias envolvidas na destruição das células  $\beta$  pancreáticas já foi descrito em detalhe. Os dados disponíveis sugerem que o NF- $\kappa$ B desempenha um papel chave na morte ou na

sobrevivência das células  $\beta$ . Apesar disto, muitos detalhes das vias através das quais a morte das células  $\beta$  é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias permanecem sem ser elucidados. Com base nesta observação, os estudos para determinar a dependência do NF- $\kappa$ B na expressão dos miRNAs serão essenciais para compreender a relação entre a expressão destas moléculas e a resposta inflamatória induzida por citocinas nas células  $\beta$ .



**Figura 4.** Os fatores de transcrição e as redes de genes possivelmente envolvidas na via que leva à morte das células  $\beta$  promovida pelas citocinas. Os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT-1 são os reguladores principais das vias desencadeadas pela IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A figura foi modificada das referências (120,129-133).

## Hipótese e objetivos

Diversos estudos destacam o papel dos miRNAs no regulamento da expressão gênica numa variedade de sistemas celulares, vias e condições patológicas. Os estudos de expressão dos miRNAs são baseados nos protocolos específicos para o isolamento do RNA que preservam as espécies pequenas tais como os miRNAs. Estas tecnologias foram adaptadas dos procedimentos utilizados previamente para estudar o mRNA. Do ponto de vista molecular, os miRNAs possuem características únicas e nós encontramos que os métodos que são comumente aplicados para seu estudo não eram completamente adequados. A falta da reprodutibilidade nos resultados da análise da expressão dos miRNAs que nós e outros investigadores observamos, sugere que estas moléculas não têm a mesma estabilidade das outras espécies de RNA. A estabilidade deles nas preparações de RNA não tem sido estudada previamente. Estes estudos são essenciais para obter resultados significativos e fiáveis.

Os perfis de miRNAs específicos nos diferentes tipos de células são associados com a aquisição e a manutenção de um fenótipo dado. Baseado neste fato a primeira hipótese deste trabalho é que existe um grupo de miRNAs diferencialmente expressados nas ilhotas pancreáticas em condições fisiológicas. Tem sido descrito que na insulite que ocorre na T1D, as células do sistema imune que infiltram às ilhotas segregam certas citocinas tais como o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  e a IL-1 $\beta$ , que induzem a morte das células das ilhotas através da ativação das redes de expressão conduzidas pelo fator da transcrição NF-kB (133). As nossas observações preliminares indicam que a expressão dos miRNAs pode ser modulada por citocinas nas linhagens celulares de insulinoma. Assim, nós sugerimos que a expressão destas moléculas nas ilhotas é afetada pelas citocinas pró-inflamatórias presentes em condições *in vitro* e *in vivo* (111).

Conseqüentemente, nós postulamos como a **hipótese geral** deste trabalho que: **as ilhotas pancreáticas expressam um grupo específico de miRNAs e que a expressão deles pôde ser regulada pelas citocinas pró-inflamatórias presentes na resposta imune na diabetes tipo 1.**

Para validar as nossas hipóteses nós propomos os seguintes objetivos:

**Objetivo 1.** *Investigar a estabilidade dos miRNAs, otimizando as condições para a isolamento e a análise deles.*

**Objetivo 2.** *Determinar o perfil de expressão dos miRNAs nas ilhotas, testando a hipótese de que o tecido exócrino pancreático expressa um grupo de miRNAs diferente daquele expressado pelas células das ilhotas endócrinas.*

- a. Estudar a expressão diferencial dos miRNAs nestas células usando a tecnologia do microarranjo
- b. Fazer a análise estatística dos dados dos microarranjos para estabelecer o perfil específico de miRNAs nas ilhotas.
- c. Validar os resultados usando a quantificação por RT-PCR.

**Objetivo 3.** *Determinar o perfil de miRNAs envolvido no processo inflamatório utilizando modelos de inflamação in vitro e in vivo nas células das ilhotas.*

**Objetivo 3.1.** *Determinar o perfil de miRNAs envolvido no processo inflamatório utilizando o modelo de inflamação in vitro.*

- a. Fazer microarranjos de miRNAs nas ilhotas tratadas com as citocinas pró-inflamatórias (o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$ , a IL-1 $\beta$ ).

- b. Estudar a cinética da expressão dos miRNAs nas ilhotas tratadas com as citocinas pró-inflamatórias (o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$ , a IL-1 $\beta$ ).
- c. Fazer a análise estatística dos dados dos microarranjos para estabelecer o perfil específico dos miRNAs nas ilhotas tratadas com as citocinas pró-inflamatórias.
- d. Validar os resultados usando a quantificação por RT-PCR.
- e. Investigar se a expressão dos miRNAs mediada pela citocinas é dependente da ativação da via do NF- $\kappa$ B.

**Objective 3.2.** *Determinar o perfil de miRNAs envolvido no processo inflamatório utilizando o modelo de inflamação in vivo.*

- a. Fazer microarranjos de miRNAs de ilhotas transplantadas singenicamente na cápsula renal de camundongos.
- b. Fazer a análise estatística dos dados dos microarranjos para estabelecer o perfil específico dos miRNAs nas ilhotas transplantadas na cápsula renal de camundongos.
- c. Validar os resultados usando a quantificação por RT-PCR das ilhotas de camundongos que foram induzidos para ser diabéticos com o uso da streptozotocina.

## **Materiais e métodos**

### **Os animais**

Foram usados ratos Lewis e camundongos C57BL/6. Os animais foram obtidos da companhia Tacomis Farms. Todos os animais foram mantidos nos laboratórios destinados a esse propósito na Universidade de Miami e usados em conformidade com os regulamentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e do Instituto Nacional de Saúde. Os animais foram colocados em quartos livres de vírus em caixas microisoladas com acesso livre ao alimento e à água esterilizada. As comprovações periódicas indicaram que os animais estavam livres de micróbios patogênicos mais comuns apresentados por animais de laboratório. Todas as manipulações dos animais foram conduzidas e monitoradas sob os protocolos revisados e aprovados pelo Comitê para o Cuidado dos Animais da nossa instituição.

### **A obtenção dos tecidos**

#### ***O isolamento das ilhotas de rato***

As ilhotas de rato foram isoladas pelo Laboratório encarregado de fazer isolamento de ilhotas de roedores do Instituto para a Pesquisa de Diabetes. Este laboratório é dirigido pelo Dr. Pileggi. (134,135). Brevemente, uma solução de colagenase (type V; Sigma, St.Louis, MO) foi preparada numa concentração final de 0.8 mg/ml em solução salina balanceada de Hanks (HBSS; Mediatech, Herndon, VA) e injetada gradualmente através do conduto biliar principal até conseguir a distensão completa do pâncreas. A seguir o tecido pancreático foi removido por cirurgia e submergido numa solução de colagenase. A digestão foi executada por 14 minutos em 37°C, com uma agitação ligeira, depois da qual a atividade da enzima foi parada bruscamente pela adição de meio de cultura RPMI frio (Mediatech) suplementado com 10% de soro fetal

bovino inativado com calor (HI-FCS; Hyclone, Logan, UT), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina, e 25 mM do tampão HEPES (Mediatech). O rompimento mecânico do tecido pancreático digerido foi conseguido passando este através de uma agulha de calibre 14 repetidamente até que foram observadas as ilhotas livres sob o microscópio. A purificação das ilhotas foi obtida por centrifugação em 900g por 15 minutos em gradientes descontínuos de Euro-Ficoll (Mediatech), fornecendo rotineiramente preparações de ilhotas com uma pureza maior do que 90% (comprovada usando o marcador ditizona). As ilhotas foram contadas, levando-se em conta o tamanho; com o auxílio de um algoritmo foi realizado o cálculo da *ilhota equivalente* (IEQ ~150 µm de diâmetro). Antes do tratamento, as ilhotas foram cultivadas durante a noite em 37°C, numa atmosfera com 5% de dióxido de carbono, no meio de cultura CMRL-1066 (Gibco, Long Island, NY) suplementado com 10% do HI-FCS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina, e 25 mM do tampão HEPES.

#### ***A obtenção do fígado de camundongo***

A obtenção do fígado de camundongo foi feita usando técnicas de microcirurgia padronizadas. Brevemente, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamine (90mg/Kg de peso do animal) e de xilazina (10mg/Kg), a cavidade peritoneal foi aberta por uma incisão abdominal transversal e o fígado foi removido dos seus ligamentos com manipulação mínima.

#### ***A obtenção dos corpos embrionários pancreáticos de camundongos (microdissecação)***

Os corpos embrionários pancreáticos dos camundongos foram obtidos removendo o útero das fêmeas grávidas sob circunstâncias estéreis e colocados numa placa de Petri estéril contendo o meio de Leibovitz suplementado com L-glutamina (meio L-15). Os úteros foram cortados e abertos nos pontos entre cada uma das protuberâncias uterinas (cada protuberância representa um embrião individual). Os embriões foram extraídos dos úteros e transferidos a uma outra placa de

Petri contendo meio L-15 estéril. A microdissecação foi executada sob o microscópio de dissecação Zeiss. O pâncreas encontra-se aderido às superfícies posterior e inferior do estômago e observa-se como um corpo ligeiramente translúcido rodeado por um tecido mesenquimal mais opaco. O pâncreas foi removido com a menor quantidade do tecido mesenquimal possível (136). Depois deste procedimento foi feito o isolamento do RNA total contendo a fração dos miRNAs usando o produto comercial *mirVana miRNA isolation kit* como será descrito posteriormente nesta seção.

### ***O isolamento das ilhotas humanas e do tecido acinar humano***

Os isolamentos das ilhotas foram executados usando um método automatizado modificado. O pâncreas foi preservado com a solução da Universidade de Wisconsin (UW) sozinho ou com o perfluorocarbono pré-oxigenado no Laboratório de processamento de células humanas Do Instituto para a Pesquisa de Diabetes da Universidade de Miami. As ilhotas foram purificadas usando um processador semi-automático de células (Cobe 2991; COBE Laboratórios Inc., Lakewood, CO, EU) em um câmara refrigerada a 4<sup>0</sup>C. O procedimento de purificação consistiu na utilização de um gradiente contínuo desde 1.10 g/ml (osmolality 320-373 mOsm/kg/H<sub>2</sub>O) até 1.06 g/ml (285-327 mOsm/kg/H<sub>2</sub>O). Os gradientes de densidade baseados no uso de Ficoll utilizam um dispositivo para fazer gradientes, seguido da digestão pancreática na solução de UW. Após 5 minutos de centrifugação em 2400 rpm, foram coletadas aproximadamente 15 frações. As frações que contém as ilhotas foram combinadas baseado-se na pureza avaliada usando o corante ditizona. Em geral, as frações onde as ilhotas estavam mais puras foram coletadas das frações de baixa densidade (densidades entre 1.06 e 1.08 g/ml). Todas as frações com densidades maiores de 1.1 g/ml corresponderam ao tecido acinar com uma pureza na fração das ilhotas menor do que 1%.

### ***A obtenção dos pâncreas fetais humanos***

Os pâncreas fetais humanos de idade gestacional (wga) entre 8 e 22 semanas foram coletados imediatamente após a terminação eletiva da gravidez de um grupo de mulheres saudáveis que deram seu consentimento apropriado para usar tecidos fetais para a pesquisa. O estudo foi desenvolvido em conformidade com a legislação dos EU e as diretrizes da Universidade de Miami. A idade gestacional foi determinada baseada no último período menstrual, e nas medidas do diâmetro cefálico (CRL) e biparietal (BPD) obtidos por ecografia.

### **A cultura de células**

A linhagem celular NIT-1 (uma linhagem de insulinoma de células  $\beta$  pancreáticas de camundongos) foram cultivadas segundo os protocolos indicados pela Coleção de Cultura de células dos E.U usando o meio de cultura F-12K modificado pelo Kaighn (1X) e suplementado com soro fetal bovino dializado (10%). As células NIT-1 foram incubadas em 37°C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **O tratamento com as citocinas**

Para cada ensaio foram usadas duas garrafas de cultura, uma delas foi tratada com TNF- $\alpha$  (2000 U/ml) para cultura de linhagens celulares e com TNF- $\alpha$  (2000 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) e IFN- $\gamma$  (100 U/ml) para cultura de ilhotas de roedores. A outra garrafa permaneceu sem nenhum tratamento e foi usada como controle. Para os estudos cinéticos os períodos de incubação foram de 6 e 18 horas. As células foram coletadas e mantidas em 10 volumes de *RNA later* (Ambion, Foster City, CA) para preservar o RNA.

Para os ensaios da dependência do NF- $\kappa$ B foram usadas duas garrafas de cultura, uma delas foi pré-tratada com *Bay 11-7082*, um inibidor da via do NF- $\kappa$ B (5  $\mu$ mol/l) por 2 horas e depois foram adicionados o TNF- $\alpha$  (2000 U/ml), a IL-1 $\beta$  (50 U/ml) e o IFN- $\gamma$  (100 U/ml). A segunda garrafa permaneceu sem nenhum tratamento e foi usada como controle. Ambas as garrafas foram cultivadas por 6 horas. As ilhotas foram coletadas e acondicionadas em 10 volumes de *RNA later* para preservar o RNA.

### **A obtenção dos miRNAs**

A obtenção dos miRNAs foi feita usando o produto comercial “*mirVana miRNA isolation kit*” (Ambiom, Austin, TX), de acordo com o protocolo da companhia para a obtenção do RNA total. Este produto emprega uma extração orgânica seguida pela imobilização do RNA em filtros de fibra de vidro para a purificação do RNA total, ou da fração do RNA enriquecida com RNA pequenos. Após, a pureza e a concentração das amostras foram verificadas usando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

### **Os microarranjos de miRNAs**

Para fazer os microarranjos de miRNAs foram usados os arranjos microparaflo microfluídicos e o miRCURY LNA (ácidos nucleicos fechados). As amostras para estudar o perfil de miRNAs em ilhotas do rato foram processadas pela companhia LC Sciences (Houston, TX). Foram empregadas de 2 a 5  $\mu$ g de RNA total que foram fracionadas segundo o tamanho das espécies do RNA usando o YM-100 Microcon (Millipore, Billerica, MA) para obter a fração enriquecida com miRNAs. As moléculas do RNA foram estendidas com uma cauda de poli (A) de 30 nucleotídeos seguida de um oligonucleotídeo marcado que foi ligado a ela com o objetivo de

permitir a subsequente marcação fluorescente. Foram usadas marcações diferentes para cada uma das amostras do RNA, ilhotas e tecido acinar. A hibridação foi feita durante a noite em microarranjos microfluídicos usando uma bomba do microcirculação. O arranjo conteve sondas para 312 miRNAs maduros (Sanger v. 8.1) mais múltiplos controles que incluíam genes de RNAs pequenos com expressão basal na maioria dos tecidos e sondas de miRNAs com mutações em um único nucleotídeo (controles negativos dos acoplamentos incorretos). A hibridação foi realizada com 100  $\mu$ L do tampão 6X SSPE (0.90M de NaCl, 60 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e 6 mM de EDTA, pH 6.8) contendo 25% de formamida a 34<sup>0</sup>C. Após a hibridação, as marcações fluorescentes com Cy3 e Cy5 forneceram a detecção. Para cada par de amostras de ilhotas e tecido acinar foram analisados dois microarranjos: num deles as ilhotas foram marcadas com Cy5 e o tecido acinar com Cy3 e no outro as marcações foram invertidas. As imagens obtidas foram coletadas com o *scanner* a laser GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e digitalizadas usando o programa para a análise de imagens Array-Pro (Media Cynernetics, Silver Spring, MD). Os dados foram analisados primeiramente subtraindo o ruído e normalizando os sinais usando um filtro LOWESS (regressão local pesada) (137). Foram feitos três ensaios em total. Também foram feitas repetições da hibridação para as mesmas amostras de ilhotas e de tecido acinar usando o método de inversão das duas cores dos marcadores (Cy3/Cy5) (obtendo-se um total de seis hibridações). Nestes ensaios foram calculados a relação dos sinais detectados (transformados em log<sub>2</sub>) e os valores de *p* do teste *t*. Os sinais detectados diferencialmente foram aqueles com  $p < 0.01$ .

Os demais perfis de miRNAs foram determinados com o uso de arranjos com miRCURY LNA. Esta técnica foi revisada no laboratório do Dr. Pastori. Os arranjos com miRCURY LNA contêm sondas complementares aos miRNAs maduros registrados na versão 9.2 da base de dados para

miRNAs (miRBase) atualizada em Maio de 2007. Neste tipo de arranjo cada molécula de RNA é marcada com fluorescência usando as moléculas marcadoras Hy3 ou Hy5. Depois ocorre a hibridação dessas moléculas marcadas com as sondas que estão no microarranjo. O protocolo segue duas rápidas e simples etapas. Na primeira, um marcador fluorescente é unido mediante uma reação enzimática ao extremo 3' dos miRNAs na amostra de RNA total. Isto é seguido pela inativação da enzima depois do qual a amostra está pronta para a hibridação. A seguir, os microarranjos estão prontos para a aquisição e a quantificação das imagens. Com esta finalidade foi usado o *scanner* Axon modelo 4100A (Molecular Devices) e os dados foram analisados usando o programa de análise de imagens 6.0 de GenePix da mesma companhia. O equipamento e o software necessários estão disponíveis no nosso laboratório. Para cada par de amostras foram feitos dois ensaios invertendo as marcações fluorescentes. Este tipo de análise aumenta a veracidade e significância dos dados obtidos. Estes ensaios foram repetidos pelo menos 3 vezes com o objetivo de obter dados estatisticamente significativos (138).

### **A análise estatística dos dados dos microarranjos de miRNAs e a seleção do perfil específico de miRNAs**

A análise estatística dos dados dos microarranjos de miRNAs foi feita usando o programa para a análise da significância de microarranjos (SAM) criado pela Universidade de Stanford (<http://otl.stanford.edu>).

O SAM é uma técnica estatística para encontrar genes significativos em um conjunto de experimentos com microarranjos. Esta técnica foi proposta por Tusher, Tibshirani e Chu (139). O programa foi desenvolvido por B. Narasimhan e R. Tibshirani.

O SAM atribui um valor a cada gene  $i$  baseado na mudança na expressão gênica relativa a o desvio padrão de medições repetidas, este parâmetro é nomeado diferença relativa ( $d_i$ ). A significância é determinada tomando-se em conta o valor de um parâmetro de ajustamento chamado delta, que pode ser escolhido pelo usuário baseado nos valores dos falsos positivos. Para genes com valores  $i$  maiores do que os valores basais ajustáveis, o SAM usa permutações das medidas repetidas para estimar a porcentagem dos genes identificados através das alterações observadas nos mesmos. Esse parâmetro é chamado taxa de descoberta falsa (FDR). Os usuários também podem escolher um parâmetro chamado número de mudanças para fazer um estudo mais estrito.

### **A quantificação usando PCR em tempo real**

A quantificação dos miRNAs usando PCR em tempo real foi feita usando-se um método denominado “primer completo alça” particularmente apropriado para a detecção exata e sensível dos miRNAs assim como de outras moléculas de RNA não codificadores (35). Foi seguido o protocolo usando-se o instrumento modelo 7500 descrito pela companhia (Applied Biosystem, Foster City, CA).

A quantificação é feita em duas etapas: Primeiramente na etapa da transcrição reversa, o cDNA é reverso transcrito a partir das amostras do RNA total usando primers *TaqMan* específicos para os diferentes miRNAs e os reagentes do kit *cDNA High-Capacity*. Na segunda etapa, os produtos do PCR são sintetizados a partir das amostras de cDNA usando os primers da mistura de reagentes *TaqMan Universal PCR Master Mix*. A quantificação de genes usando PCR em tempo real foi feita seguindo o protocolo e os reagentes de acordo com o ensaio “*TaqMan gene expression assay*” (Applied Biosystem).

### **A microdissecação com laser**

O laboratório especializado em imagens do nosso instituto fornece o acesso a um microscópio Leica que permite fazer a microdissecação com laser. Ele é capaz de dissecar áreas de tecido selecionadas usando lasers ajustáveis para diferentes intensidades. Nós revisamos as condições desta técnica para dissecar ilhotas inteiras assim como células  $\alpha$  e células  $\beta$ . Para fazer estes experimentos foram utilizadas ilhotas de rato aproveitando-se a distribuição de suas células  $\alpha$  e  $\beta$  que permite uma maior eficiência na dissecação das células como é mostrado na figura 5.

O sucesso desta técnica exige a otimização dos protocolos de processamento do tecido, de coloração da secção do tecido, da microdissecação própria e, finalmente, da extração e a análise do RNA (140). Os aspectos mais críticos são: 1) a habilidade de dissecar eficientemente as células 2) a habilidade de preservar o RNA durante todo o procedimento de tingido e dissecação e 3) a habilidade de extrair o RNA com o máximo rendimento, sendo que se começa com uma amostra muito pequena. Nós otimizamos o kit *miRVana* (Ambion) usado para extrair o RNA total que contém a fração dos miRNAs das células dissecadas, trabalhando com seis vezes menos volume dos reagentes o que aumenta o rendimento de RNA. A lente usada foi 20X e os parâmetros para a calibração dos lasers foram: a abertura 14, a intensidade 32, a velocidade de corte 5 e a compensação 39. Este último parâmetro é usado para ajustar as lentes integradas movendo o foco do laser no plano da imagem.

### **A hibridação *in situ***

Para a hibridação *in situ* foi utilizada uma sonda anti-miR-7 humana marcada com fluoresceína que contém nucleotídeos LNA (Exiqon, Dinamarca). A técnica foi feita essencialmente como é

descrita (141). Um pmol da sonda LNA marcada com a fluoresceína foi diluído em 150 µl do tampão de hibridação, aplicado nas slides e deixou-se no processo de hibridação durante toda a noite a 60°C ou 70°C respectivamente. Após, as porta-objetivas foram lavadas por 1 hora numa solução de 0.2 x do SSC (Ambion-Applied Biosystem, CA) e incubadas com o anticorpo anti-fluoresceína conjugado com a fosfatase alcalina de ovelha (1/1500) (Roche) ou com o anticorpo anti-DIG conjugado com a fosfatase alcalina de ovelha (1/2500) (Roche) a 4°C durante toda a noite. A reação com a fosfatase alcalina foi feita em PVA com 200µl de MgCl<sub>2</sub> 1M e 140µl de NBT/BCIP (Roche) por 1 a 3 dias. Após as porta-objetivas foram analisadas através de microscopia confocal. O tecidos fetais humanos de baço e de intestino foram usados como controles negativos para o miR-7.

### **O modelo de transplante de ilhotas**

As ilhotas foram divididas em alíquotas de 1000 IEQ antes da transplante. Os animais foram anestesiados usando o metoxifluorano (Metofane, Schering Plough Animal Health, Atlanta, GA). A seguir foi realizada uma lombotomia esquerda e o rim esquerdo foi exposto. Depois foi feita uma abertura na cápsula do rim e através dela foi introduzido um cateter de polietileno avançando pelo espaço subcapsular até chegar ao pólo oposto do rim. Através do cateter foram injetadas lentamente mil IEQ permitindo o espalhamento delas no pólo. Finalmente o cateter foi removido, a abertura cauterizada e o rim foi reposicionado, seguido pela sutura do músculo e da pele (142).

### **O tratamento com a streptozotocina**

Os ratos Lewis receberam doses intraperitoneais baixas de 20mg/kg/day de streptozotocina (STZ) (Sigma, St Louis, MO) dissolvidos em tampão de citrato durante 5 dias (143). Os valores da glicemia no sangue periférico foram monitorados diariamente usando glucômetros portáteis (OneTouch Ultra, LifeScan).

### **A imuno-coloração**

As seções dos rins transplantados foram congeladas instantaneamente com OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA) e depois imuno-marcados com o anticorpo primário antiinsulina de cobaia (Biogenex, San Ramon, CA) e com o anticorpo secundário anti-cobaia Alexa Fluor 568 de coelho (Invitrogen, OU). Também foram feitas imuno-colorações com um anticorpo anti-fluoresceína de cabra, o Alexa Fluor 488 (Invitrogen, OR).

## Resultados

### 1) A otimização de preparações de RNA.

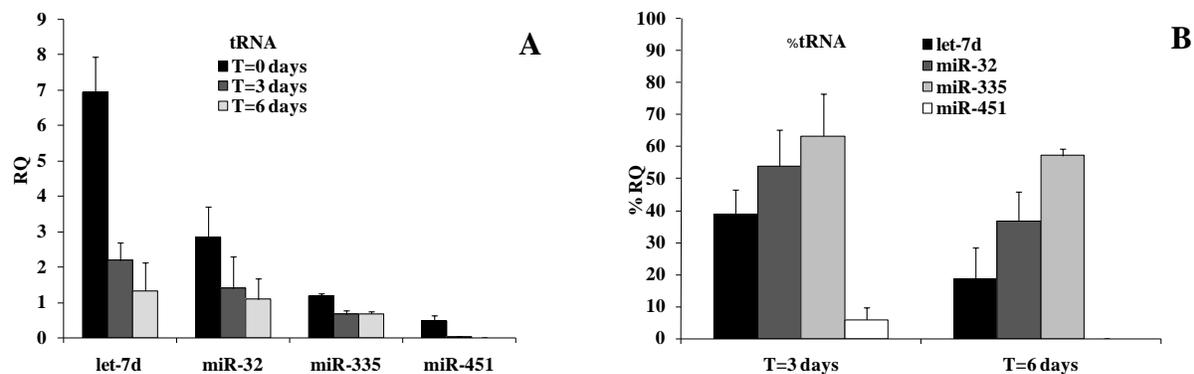
Durante o trabalho com preparações de miRNAs nós observamos que essas moléculas uma vez isoladas são altamente instáveis independentemente do método escolhido para preparar o RNA. Com base nesta observação nós começamos nosso trabalho estudando a estabilidade dos miRNAs a fim de otimizar as condições para os microarranjos.

Utilizando a quantificação por qRT-PCR nós investigamos a influência do tempo de estocagem do RNA na estabilidade dos miRNAs let-7d, miR-32, miR-335, e miR-451, quatro miRNAs que pertencem à famílias diferentes destas moléculas e usamos o miR-16 como controle endógeno. O miR-16 foi recomendado para esta função pela companhia (Applied Biosystem) porque geralmente exibe uma expressão elevada numa grande quantidade de tecidos. Com esta finalidade, nós preparamos o RNA total a partir de células murinas de insulinoma NIT-1, enriquecido com moléculas pequenas de RNA, incluindo os miRNAs. Este método de extração tem sido usado especificamente para a clonagem e para estabelecer os perfis de expressão de miRNAs (144,145). O RNA foi mantido em alíquotas em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nós determinamos a quantidade de cada miRNA usando um método denominado “primer completo alça”, que é particularmente usado para a detecção exata e sensível dos miRNAs assim como de outras moléculas de RNA não-codificadores (ncRNA) (35). Os resultados são expressos como a quantificação relativa (RQ) igual à quantidade de um miRNA específico em uma amostra de RNA preparada a partir de células NIT-1 estocadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  por períodos de tempo diferentes comparada com a quantidade desse miRNA em uma amostra de RNA de tecido acinar pancreático de camundongo, processada em fresco para cada período de tempo. O tecido acinar foi mantido em *RNAlater* (Ambion) e estocado em  $-80^{\circ}\text{C}$  até o isolamento do RNA. Nós determinamos previamente que o

tecido acinar tratado com *RNAlater* preserva os miRNAs pelo menos por cinco meses e é conseqüentemente um material de controle apropriado.

Nós encontramos que a quantidade dos miRNAs diminui rapidamente nas preparações do RNA estocadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  e que a taxa de degradação é particular para cada miRNA (Figura 5). No painel A são mostradas as RQs para os miRNAs selecionados no tempo  $T=0$  (fresco), no tempo  $T=3$  (3 dias de estocagem em  $-80^{\circ}\text{C}$ ) e no tempo  $T=6$  (6 dias de estocagem em  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Para o let-7d as RQs são: ( $T=0$ )  $6.95 \pm 1.00$ , ( $T=3$ )  $2.19 \pm 0.50$ , e ( $T=6$ )  $1.33 \pm 0.80$ , para o miR-32: ( $T=0$ )  $2.84 \pm 0.86$ , ( $T=3$ )  $1.39 \pm 0.90$ , e ( $T=6$ )  $1.08 \pm 0.59$ ; para o miR-335: ( $T=0$ )  $1.17 \pm 0.06$ , ( $T=3$ )  $0.66 \pm 0.05$  e ( $T=6$ )  $0.67 \pm 0.09$ , e para o miR-451: ( $T=0$ )  $0.47 \pm 0.15$ , ( $T=3$ )  $0.01 \pm 0.01$ , e ( $T=6$ ) não detectado.

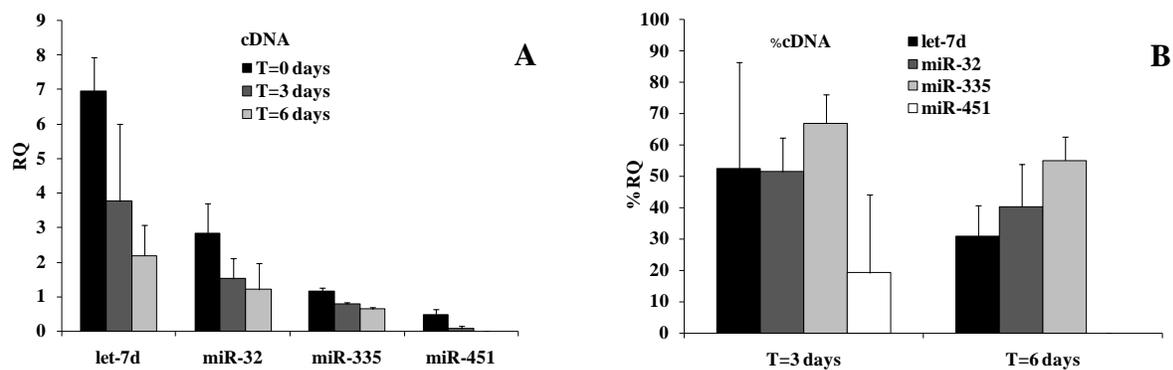
Tomando  $T=0$  como 100%, as porcentagens das RQs para os quatro miRNAs em  $T=3$  e  $T=6$  foram calculados e se mostram no painel B. O let-7d, o miR-32, o miR-335, e o miR-451 diminuíram desde o 100% em  $T=0$  até  $39.0 \pm 7.6\%$ ,  $54.0 \pm 11.1\%$ ,  $63.4 \pm 13.1\%$ , e  $5.9 \pm 3.9\%$  respectivamente no tempo de estocagem  $T=3$ . No tempo de estocagem  $T=6$  as porcentagens restantes dos miRNAs diminuíram até  $18.6 \pm 9.7\%$ ,  $36.2 \pm 9.1\%$ ,  $57.3 \pm 2.0\%$  e não detectado, respectivamente.



**Figura 5. A degradação dos miRNAs em preparações de RNA.** Foi calculada a quantificação relativa (RQ) de quatro miRNAs de rato em células de insulinoma NIT-1 usando a técnica de RT-PCR. A RQ determina a mudança na expressão dos miRNAs em uma amostra (alíquotas de RNA estocadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  por T=3 e T=6 dias), relativa a uma amostra usada como calibrador (RNA fresco isolado do tecido acinar mantido em RNAlater, T=0). (A) Os valores são apresentados como as médias das RQs  $\pm$  o desvio padrão, para  $n=3$ . Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0.05$ . Os valores de  $p$  foram calculados entre as amostras T=0 e T=3 e entre as amostras T=0 e T=6. (B) Se mostram as porcentagens calculadas das RQs nos tempos de estocagem T=3 e T=6 comparadas com a RQ para T=0.

Não foi encontrada nenhuma ligação aparente entre as taxas de degradação e a abundância para os miRNAs estudados. Por exemplo, o let-7d, que foi o miRNA mais abundante nestas células degradou-se mais rapidamente do que o miR-32 e o miR-335 (Figura 5A), enquanto que o miR-451, o miRNA menos expressado dos estudados, foi o que degradou mais rapidamente. Adicionalmente, foi investigada a estabilidade dos cDNAs derivados desses miRNAs encontrando que a estabilidade e as taxas de degradação dos cDNAs foram similares às dos miRNAs (Figura 6). As porcentagens de cDNAs restantes do let-7d, do miR-32, do miR-335, e

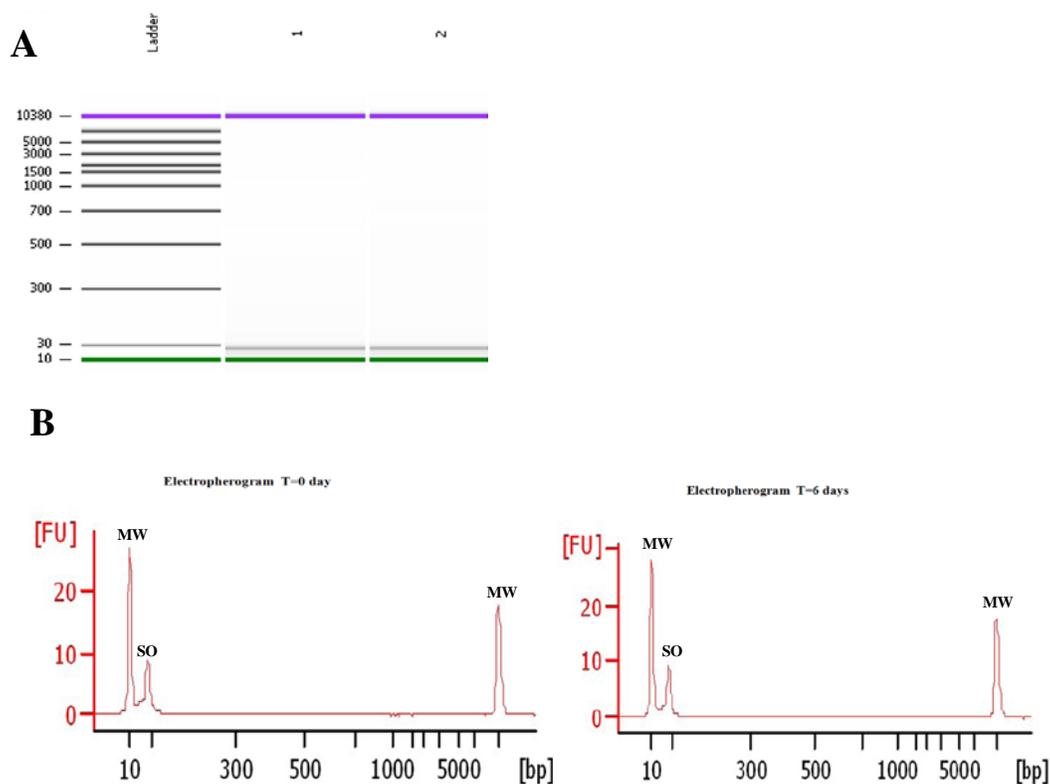
do miR-451 em T=3 comparada com as quantidades medidas originalmente em T=0 foram:  $52.3 \pm 34.1\%$ ,  $51.5 \pm 10.9\%$ ,  $67.0 \pm 9.3\%$ , e  $19.2 \pm 24.0\%$ , respectivamente. Para o tempo T=6 as porcentagens foram:  $30.9 \pm 9.8$ ,  $40.3 \pm 13.7$ ,  $55.0 \pm 7.6$ , e não detectada, respectivamente.



**Figura 6. A degradação dos cDNAs derivados dos miRNAs.** A estabilidade dos cDNAs sintetizados a partir de let-7d, de miR-32, de miR-335, e de miR-451 foi avaliada. Os cDNAs foram mantidos em alíquotas em  $-80^{\circ}\text{C}$ . As RQs foram calculadas por quantificação com RT-PCR como foi descrito para os miRNAs. A RQ representa a mudança na expressão do miRNA em uma amostra (uma alíquota de cDNA estocada em  $-80^{\circ}\text{C}$ ) relativo a uma amostra usada como calibrador (RNA fresco isolado do tecido acinar mantido em RNAlater). (A) As RQs calculadas. Os valores de  $p$  foram calculados entre as amostras T=0 e T=3 e entre as amostras T=0 e T=6. Os dados representam as médias das RQs  $\pm$  desvio padrão, para  $n=3$ , sendo considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0.05$ . (B) Se mostram as porcentagens calculadas das RQs nos tempos de estocagem T=3 e T=6 comparadas com a RQ para T=0.

Além disso, foi encontrado que a estabilidade dos miRNAs e de seus cDNAs respectivos foi baixa também nas amostras onde o RNA foi preparado usando o reagente Trizol. Este é o método padrão usado para a clonagem dos miRNAs e para a análise de perfis de expressão destas

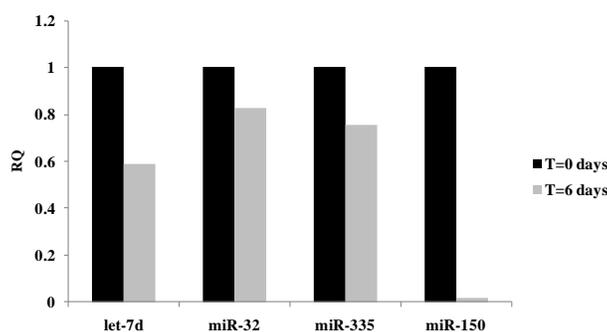
moléculas (146). Após 9 dias de estocagem em  $-80^{\circ}\text{C}$  as amostras de RNA preparadas com Trizol, contém 51.3%, 26.9%, 24.0% e 24.3% de let-7d, de miR-32, de miR-335, e de miR-451 respectivamente. Os cDNAs de let-7d, de miR-32, de miR-335, e de miR-451 mostraram uma diminuição similar de 37.8%, 35.7%, 22.3%, e não detectável, respectivamente. Assim, a degradação rápida dos miRNAs e dos cDNAs parece ser independente do método de isolamento. Aliás, um oligômero sintético de DNA que corresponde à seqüência de cDNA que deve ser obtida a partir do let-7d, foi avaliado e quantificado mediante eletroforese usando um Bioanalisador 2100 (Agilent Technologies), comprovando que o mesmo foi estável após 6 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$ . As concentrações calculadas usando o Bioanalisador foram de  $3.7 \pm 0.2$  e de  $3.8 \pm 0.2$  ng/ $\mu\text{l}$ ,  $n=3$  para as amostras que correspondiam aos tempos  $T=0$  e  $T=6$ , respectivamente. Enquanto que o conteúdo de cDNA do let-7d nas preparações de RNA foi só de 18% após o mesmo tempo de estocagem (Figura 7). Este resultado sugere que a instabilidade observada nos cDNAs, e talvez dos miRNAs, não é devida a uma característica molecular intrínseca se não que está relacionado com o método de isolamento de RNA.



**Figura 7. A estabilidade do oligômero sintético de DNA cuja seqüência corresponde ao cDNA de let-7d.** (A) A eletroforese usando o Bioanalisador 2100. O 1 corresponde à amostra fresca e o 2 à mesma amostra estocada em  $-80^{\circ}\text{C}$  por 6 dias. (B) Os electroferogramas das amostras dos oligonucleotídios correspondentes a let-7d fresco e estocado por 6 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$ . O MW representa o pico correspondente ao marcador de peso molecular e SO representa o pico do oligonucleotídio sintético. FU (unidades fluorescentes, do inglês) e bp (pares de base, do inglês).

A instabilidade foi observada também em tecidos primários. Foram analisados 4 miRNAs em preparações de RNA de fígado de camundongo mantidas em  $-80^{\circ}\text{C}$  por 6 dias usando como calibrador uma amostra de RNA de fígado fresco de camundongo. Os resultados são apresentados na Figura 8 como as RQs para os quatro miRNAs para os tempos de estocagem  $T=0$

(fresco) e T=6 (6 dias de estocagem em  $-80^{\circ}\text{C}$ ) (n=1). Em T=0 (fresco), as RQs iguais a 1 foram ajustadas para todos os miRNAs analisados. Para T=6 (6 dias de estocagem em  $-80^{\circ}\text{C}$ ) as RQs para o let-7d foi de 0.589; para o miR-32 de 0.827; para o miR-335 de 0.757 e para o miR-150 de 0.016.

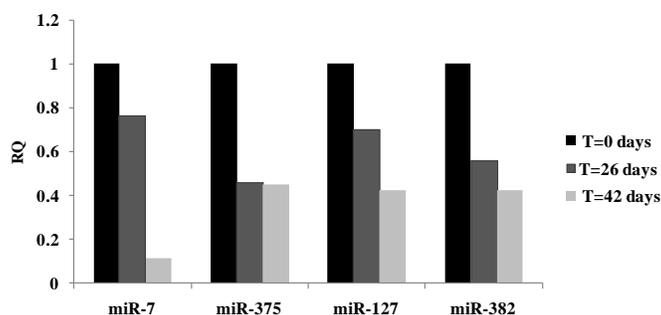


**Figura 8. A degradação dos miRNAs em preparações de RNA de fígado de camundongo.**

Foram calculadas as RQs de 4 miRNAs de fígado de camundongo usando RT-PCR. A RQ determina a mudança na expressão de uma amostra de RNA estocada por 6 dias (T=6) em  $-80^{\circ}\text{C}$  relativa a uma amostra calibrador (RNA isolado em fresco de amostras de fígado mantidas em RNAlater, T=0).

Foi analisada também a estabilidade de certos miRNAs em ilhotas pancreáticas humanas estocadas por 26 e 42 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$  comparadas com preparações frescas de ilhotas pancreáticas humanas. A Figura 9 apresenta as RQs para o miR-7, o miR-375, o miR-127 e o miR-382 para T=0 (fresco), T=26 (estocagem de 26 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$ ) e T=42 (estocagem de 42 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para n=1. Em T=0 (fresco), as RQs foram ajustadas iguais a 1 para todos os miRNAs analisados. Para o tempo de estocagem T=26 as RQs para o miR-7, o miR-375, o miR-127 e o miR-382 foram de 0.762, de 0.459, de 0.702 e de 0.558 respectivamente e para T=42 foram de 0.114, de 0.45, de 0.424 e de 0.427 respectivamente. Ambos os resultados indicam que a instabilidade dos

miRNAs não é uma característica unicamente de preparações de RNA da linhagem celular de insulinooma.



**Figura 9. A degradação dos miRNA em preparações de RNA de ilhotas pancreáticas humanas.** Foram calculadas as RQs de 4 miRNAs em ilhotas pancreáticas humanas usando RT-PCR. A RQ determina a mudança na expressão de uma amostra de RNA estocada por 26 (T=26) ou 42 dias (T=42) em  $-80^{\circ}\text{C}$  relativa a uma amostra calibrador (RNA isolado em fresco de tecido acinar humano mantido em RNAlater, T=0).

Com o objetivo de compreender melhor este fenômeno, foi decidido expandir e complementar estes estudos fazendo microarranjos de miRNAs usando o miRCURY LNA (ácidos nucleicos fechados). Esta técnica foi posta em marcha em nosso laboratório com este fim. Foi investigada a estabilidade dos miRNAs em preparações de RNA total obtidas de tecido acinar humano fornecido pelo laboratório de processamento de células de ilhotas humanas do nosso instituto, assim como em preparações de RNA total de baço de camundongo. Foram comparadas amostras estocadas por 30 dias e amostras processadas em fresco. Foram analisados quinhentos e cinquenta e sete miRNAs. Dos 130 miRNAs expressos neste tecido, 84 mostraram diminuição na expressão entre 3 e 27 vezes depois de 30 dias de estocagem em  $-80^{\circ}\text{C}$ . Trinta e oito miRNAs exibiram uma redução na expressão de entre 1.5 e 3 vezes e somente 8 miRNAs tiveram a

expressão similar aos da amostra de RNA preparada em fresco (Tabela 2). Desta lista, foram selecionados dois miRNAs para ser validados por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados foram expressos como a RQ, que representa a quantidade de um miRNA específico em amostras de RNA preparadas com tecido pancreático humano estocadas por 30 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$  contra a quantidade de miRNA em amostras de RNA do mesmo tecido processado em fresco. As porcentagens dos miRNAs restantes para o let-7d e o miR-16 no RNA estocado foram de  $40.3 \pm 24.1\%$  e de  $44.9 \pm 15.6\%$  respectivamente para  $n=3$ .

miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change
hsa-miR-768-3p	26.125	hsa-miR-24	5.740	hsa-miR-148b	2.777
hsa-miR-886-3p	18.679	hsa-miR-194	5.733	hsa-miR-887	2.645
hsa-miR-301a	18.255	hsa-miR-802	5.704	hsa-miR-214	2.644
hsa-miR-542-3p	16.916	hsa-miR-30d	5.497	hsa-miR-22	2.611
hsa-miR-199a-5p	13.974	hsa-miR-19a	5.492	hsa-miR-24-1*/24-2*	2.608
hsa-miR-195	13.590	hsa-let-7c	5.242	hsa-miR-130a	2.599
hsa-miR-338-3p	11.572	hsa-miR-335	5.237	hsa-miR-375	2.586
hsa-miR-377	11.242	hsa-miR-216a	5.207	hsa-miR-650	2.493
hsa-miR-200c	11.220	hsa-miR-153	5.038	hsa-miR-100	2.470
hsa-miR-429	10.912	hsa-miR-154	4.999	hsa-miR-34a	2.402
hsa-miR-216b	10.525	hsa-miR-26a	4.975	hsa-miR-365	2.389
hsa-miR-30e*	10.017	hsa-let-7a	4.914	hsa-miR-575	2.324
hsa-miR-148a	9.814	hsa-miR-96	4.907	hsa-miR-376a	2.286
hsa-miR-200b	9.714	hsa-miR-101	4.776	hsa-miR-409-5p	2.278
hsa-miR-193a-3p	9.275	hsa-miR-29a	4.760	hsa-miR-212	2.178
hsa-miR-25	9.264	hsa-miR-34c-5p	4.715	hsa-miR-330-3p	2.174
hsa-miR-15b	9.242	hsa-miR-127-3p	4.714	hsa-miR-32*	2.171
hsa-miR-19b	9.187	hsa-let-7b	4.603	hsa-miR-502-5p	2.137
hsa-miR-181a	9.144	hsa-miR-98	4.522	hsa-miR-302b	2.114
hsa-let-7f	9.125	hsa-let-7d	4.439	hsa-let-7g*	1.994
hsa-miR-30c	8.662	hsa-miR-10a	4.377	hsa-miR-346	1.966
hsa-miR-768-5p	8.570	hsa-miR-491-3p	4.293	hsa-miR-30a*	1.944
hsa-miR-30e	8.004	hsa-miR-29b	4.287	hsa-miR-576-3p	1.869
hsa-miR-15a	7.793	hsa-miR-23a	4.253	hsa-miR-92a	1.834
hsa-miR-30b	7.776	hsa-miR-106b	4.221	hsa-miR-20b*	1.832
hsa-miR-191	7.709	hsa-miR-151-3p	4.220	hsa-miR-331-5p	1.803
hsa-miR-151-5p	7.417	hsa-let-7i	4.192	hsa-miR-519d	1.797
hsa-miR-200a	7.236	hsa-miR-143	4.154	hsa-miR-124	1.792
hsa-miR-374b	6.875	hsa-miR-138	4.113	hsa-miR-197	1.769
hsa-miR-141	6.842	hsa-miR-182	4.016	hsa-miR-215	1.737
hsa-miR-17	6.809	hsa-miR-23b	3.944	hsa-miR-500*	1.638
hsa-miR-192	6.774	hsa-miR-425	3.851	hsa-miR-320	1.631
hsa-miR-16	6.768	hsa-miR-222*	3.749	hsa-miR-206	1.587
hsa-miR-30a	6.742	hsa-miR-574-5p	3.688	hsa-miR-499-3p	1.537
hsa-miR-148a*	6.449	hsa-miR-126	3.449	hsa-miR-204	1.519
hsa-miR-29c	6.401	hsa-miR-222	3.443	hsa-miR-381	1.476
hsa-miR-152	6.325	hsa-miR-193b	3.385	hsa-miR-7	1.446
hsa-miR-27b	6.235	hsa-miR-491-5p	3.314	hsa-miR-328	1.350
hsa-miR-106a	6.162	hsa-miR-217	3.084	hsa-miR-502-3p	1.323
hsa-miR-27a	5.931	hsa-miR-369-3p	3.083	hsa-miR-361-5p	1.228
hsa-miR-146b-5p	5.787	hsa-miR-668	2.983	hsa-miR-125a-3p	1.213
hsa-miR-125b	5.780	hsa-miR-297	2.873	hsa-miR-183	1.180
hsa-miR-21	5.780	hsa-miR-424	2.853	hsa-miR-186	1.079

**Tabela 2. A expressão diferencial dos miRNAs entre preparações de RNA de tecido acinar humano estocado por 30 dias e preparações de RNA do mesmo tecido isoladas em fresco.**

Em resumo, os miRNAs obtidos com os métodos de preparação de RNA usados atualmente são instáveis. Assim, ao trabalhar com miRNAs, o tempo de estocagem do RNA e do cDNA é crítico e têm que ser tomados em conta para permitir comparações válidas entre as amostras. Isto é particular importante para análises de expressão dos miRNA usando microarranjos. Nós sugerimos manter os tecidos e amostras em general em RNAlater até que sejam processados. Além disso, uma vez que o RNA total é isolado, a análise deve ser feita imediatamente.

### **O perfil de expressão de miRNAs das ilhotas pancreáticas.**

Para testar a hipótese que as células do tecido acinar e das ilhotas pancreáticas expressam um conjunto diferente de miRNAs, foi estudada a expressão diferencial dos mesmos nestas células utilizando as técnicas do microarranjo microfluídico (LC sciences) e do qRT-PCR. (Tabela 3 e Figura 10). Utilizando o programa “*análise estatística de microarranjos*” (SAM, do inglês) foram encontrados 17 miRNAs preferencialmente expressos em ilhotas e 28 preferencialmente expressos em tecido acinar (Tabela 3). Cinco miRNAs do grupo diferencialmente expressos em ilhotas (o miR-7, o miR-183, o miR-382, o miR-127 e o miR-29c) foram identificados com 0 probabilidades de ser um valor falso positivo ( $q=0$ ). O miR-7 mostrou a maior diferença na expressão entre estes dois grupos de células (Tabela 3). O miR-9 não foi detectado. O miR-375 não esteve integrado na versão 8.1 da lista de miRNAs da base de dados mirBase de Sanger usada para este microarranjo.

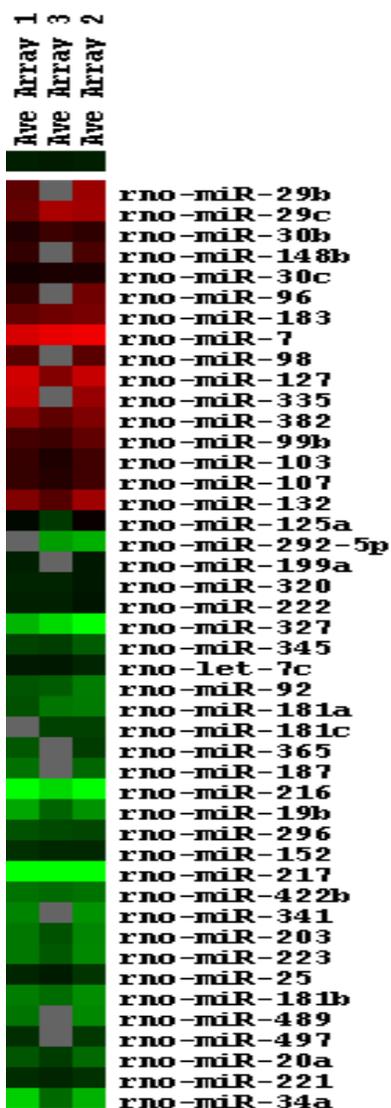
A

Gene ID	Score(d)	q-value(%)	Fold increase
rno-miR-7	21.852	0	55.002
rno-miR-183	11.191	0	6.943
rno-miR-382	6.865	0	8.611
rno-miR-127	6.502	0	26.264
rno-miR-29c	5.785	0	13.695
rno-miR-99b	5.248	0.605	3.882
rno-miR-29b	5.242	0.605	6.584
rno-miR-335	5.127	0.605	14.768
rno-miR-132	5.041	0.605	9.976
rno-miR-148b	4.969	0.605	2.044
rno-miR-107	4.689	0.605	2.452
rno-miR-30c	4.524	0.605	1.550
rno-miR-30b	4.115	0.953	2.305
rno-miR-98	3.880	0.953	3.118
rno-miR-103	3.667	0.953	2.419
rno-miR-125a	3.601	0.953	3.209
rno-miR-96	3.572	0.953	3.233

B

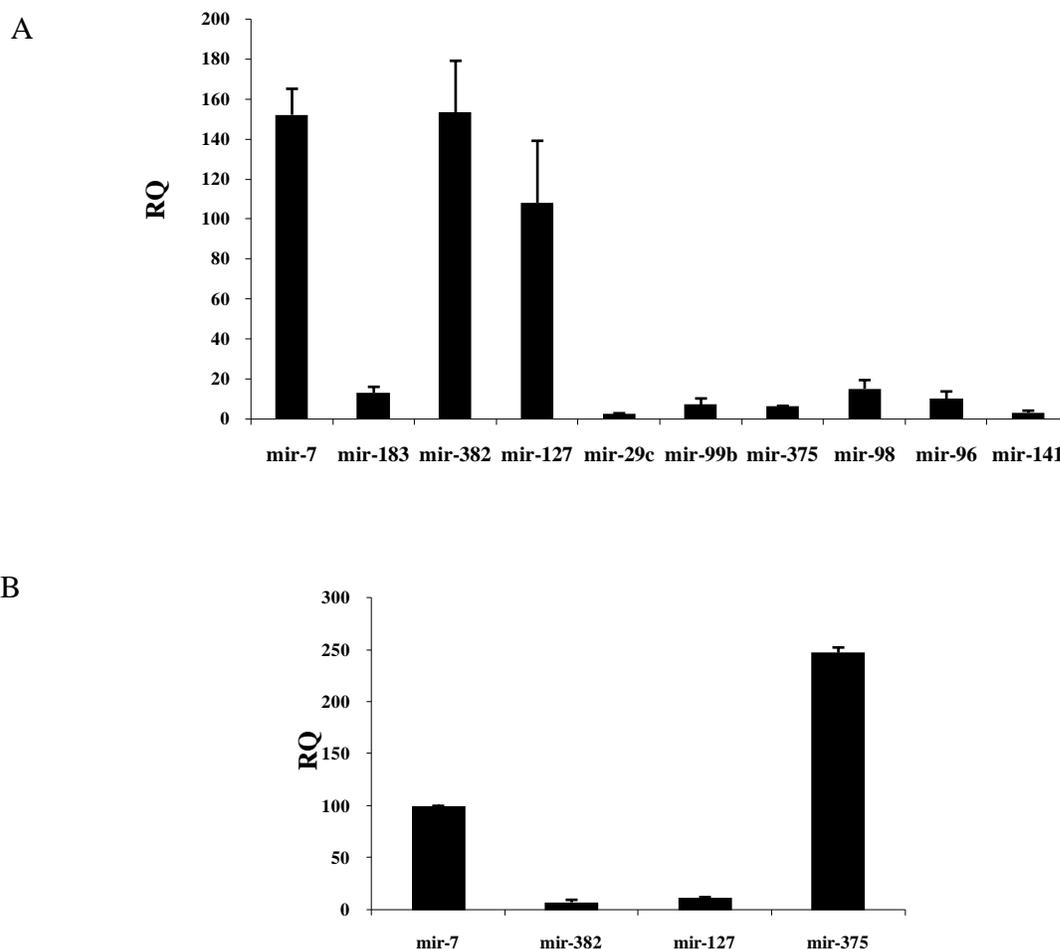
Gene ID	Score(d)	q-value(%)	Fold increase
rno-miR-25	-3.804	0.670	1.978
rno-let-7c	-3.815	0.670	1.637
rno-miR-222	-4.121	0.670	1.653
rno-miR-365	-4.164	0.670	5.225
rno-miR-320	-4.177	0.670	1.733
rno-miR-34a	-4.886	0	13.119
rno-miR-20a	-4.988	0	4.089
rno-miR-497	-5.063	0	3.642
rno-miR-199a	-5.245	0	2.442
rno-miR-327	-5.402	0	43.599
rno-miR-345	-5.639	0	3.501
rno-miR-203	-5.899	0	6.474
rno-miR-19b	-5.975	0	9.819
rno-miR-181a	-6.499	0	6.094
rno-miR-221	-6.512	0	2.152
rno-miR-92	-6.616	0	5.613
rno-miR-216	-6.634	0	104.696
rno-miR-223	-6.830	0	7.049
rno-miR-152	-7.314	0	2.103
rno-miR-181c	-7.351	0	4.692
rno-miR-489	-7.534	0	13.293
rno-miR-187	-8.393	0	9.907
rno-miR-341	-8.440	0	17.005
rno-miR-292-5p	-8.703	0	26.758
rno-miR-181b	-9.381	0	8.583
rno-miR-296	-10.747	0	3.688
rno-miR-422b	-17.996	0	6.936
rno-miR-217	-20.648	0	147.834

**Tabela 3. Os miRNAs selecionados das ilhotas e do tecido acinar de rato usando a técnica do microarranjo e o programa “análise significativa de microarranjos” (SAM).** A expressão dos miRNAs foi estudada usando microarranjos que contém a versão 8.1 da lista da base de dados mirBase de Sanger, foram feitos 3 experimentos (n=3). A pontuação dada para cada miRNA (d) representa o valor da T-estatística. Uma pontuação elevada significa uma diferença maior entre os dois grupos celulares. Os valores positivos da d representam os miRNAs expressados diferencialmente nas ilhotas (A). Os valores negativos da d representam os miRNAs expressados diferencialmente no tecido acinar (B). Os valores da q representam os valores da p adaptados à análise de um grande número de genes. Este valor é uma avaliação da possibilidade que um miRNA tenha valor positivo falso.



**Figura 10. A expressão diferencial de miRNAs pancreáticos.** O mapa de expressão foi obtido com o programa “Treeview” usando os dados apresentados na Tabela 3. Com a cor vermelha representam-se os miRNAs diferencialmente expressos nas ilhotas. Com a cor verde representam-se os miRNAs diferencialmente expressos no tecido acinar. A gradação das cores descreve a expressão dos miRNAs desde a expressão elevada (vermelho ou verde brilhante) até expressão baixa (preto) e não expressão (cinza).

Para confirmar os resultados obtidos com os microarranjos, certos miRNAs diferencialmente expressos nas ilhotas foram analisados usando o qRT-PCR. O miR-16 foi usado como controle endógeno. O miR-375 foi incluído nesta análise. Nós encontramos que o miR-7, o miR-127, e o miR-382 foram os miRNAs mais diferencialmente expressos nas ilhotas de rato comparadas com o tecido acinar. Os mesmos mostraram os seguintes valores respectivos: 152, 108, e 153; seguidos por o miR-183 e o miR-99b com 12.9 e 7.1, respectivamente (Figura 11A). A razão ilhota/tecido acinar para o miR-375 foi de  $6.2 \pm 0.3$ , significativamente menor que para o miR-7 (Figura 11B). Os valores da hibridação do microarranjo e os obtidos com o qRT-PCR foram comparados na Tabela 4.



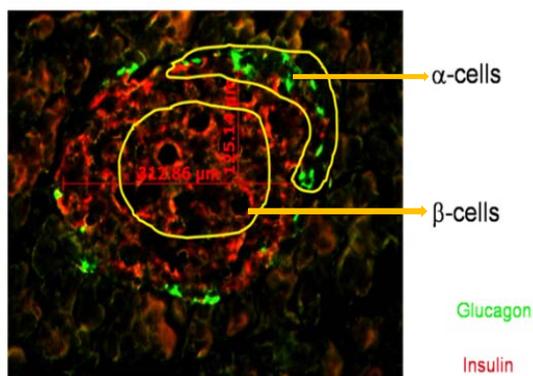
**Figura 11. Os miRNAs pancreáticos expressos diferencialmente em ilhotas. Análise quantitativa usando o qRT-PCR.** Os valores são apresentados como quantificação relativa (RQ). A RQ determina a mudança na expressão dos miRNAs nas ilhotas de rato relativo ao tecido acinar (A) ou relativo ao miR-7 para a comparação intra-ilhota (B). Os dados representam as médias das RQs  $\pm$  desvio padrão, para  $n=3$ . A partir da análise dos microarranjos foram selecionados 10 miRNAs para validar usando o qRT-PCR. O miR-7, o miR-127 e o miR-382 constituem o conjunto de miRNAs mais diferencialmente expressos nas ilhotas. O miR-7 é expressado mais de 150 vezes em ilhotas comparando sua expressão em tecido acinar. O mesmo é 9 vezes mais abundante nas ilhotas do que o miR-382 e o miR-127. O miR-375 é o miRNA mais abundantemente expresso nas ilhotas (B).

miRNA	Normalized array values	Average RQ values
miR-7	55	152
miR-183	6.9	13
miR-382	8.6	153.3
miR-127	26.3	108.6
miR-29c	13.7	2.3
miR-99b	3.9	7.2
miR-375	NA	6.2
miR-98	4.7	15
miR-96	4.8	10.3
miR-141	3	3

**Tabela 4. A comparação entre os valores da hibridação do microarranjo e os obtidos com o qRT-PCR.**

Após de determinar que o miR-7 é o miRNA endócrino mais abundante (147), o próximo passo racional seria determinar em que tipo de células pancreáticas o miR-7 é mais expresso: em  $\alpha$ ,  $\beta$  ou em ambos os tipos. Com esta finalidade as amostras foram analisadas através de microdissecação por laser (LCM, do inglês). Foram dissecadas células  $\alpha$  e  $\beta$  de seções pancreáticas de rato em parafina fixadas em formalina (FFPE, do inglês) marcadas com os anticorpos monoclonais imunofluorescentes anti-glucagão e anti-insulina (Figura 12). A expressão do miR-7 e do miR-375 nas células dissecadas foi medida usando o qRT-PCR. O miR-16 foi usado como controle endógeno.

Paraffin section → Gluc./Insulin → LCM → RNA → RT/PCR



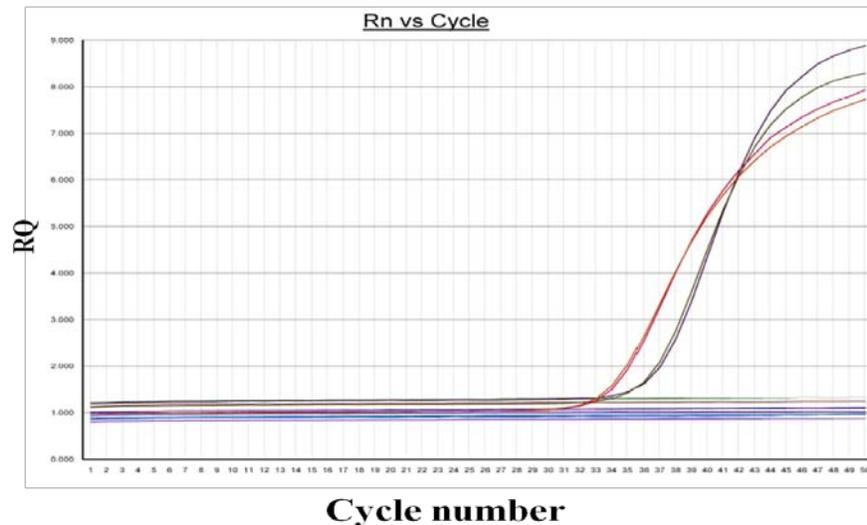
**Figura 12.** A imuno-coloração anti-insulina e anti-glucagão das seções dissecadas por LCM.

Os resultados destes ensaios são mostrados na Tabela 5 e na Figura 13, indicando que o miR-7 e o miR-375 estão expressos 2.3 e 3.1 vezes mais nas células  $\beta$  do que nas células  $\alpha$ , respectivamente.

miRNA	RQ( $\beta$ -cells/ $\alpha$ -cells) Experiment 1	RQ( $\beta$ -cells/ $\alpha$ -cells) Experiment 2	Average
mir7	2.39	2.31	2.35
mir375	3.05	3.297	3.17

**Tabela 5.** A quantificação do miR-7 e do miR-375 nas células  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas por LCM.

Apresentam-se os resultados de dois ensaios independentes (n=2).



**Figura 13.** As gráficas de amplificação do miR-7 (em azul e verde) e do miR-375 (em laranja e vermelho). Cada réplica do ensaio é mostrada em cores diferentes. As linhas horizontais correspondem aos controles sem molde e sem transcritasa reversa (RT, do inglês).

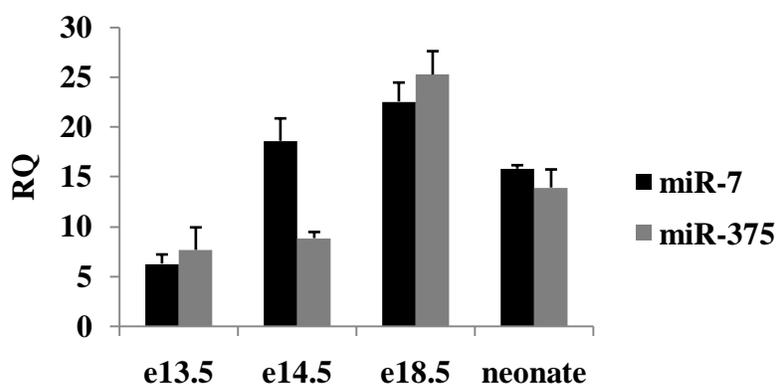
### *2.1) A expressão do miR-7 e do miR-375 no desenvolvimento de pâncreas de camundongo.*

Tem sido mostrado que a expressão dos miRNAs é necessária para o desenvolvimento de todas as linhagens pancreáticas e especificamente para as células  $\beta$  (14). É possível que a ação sincronizada de dois ou mais miRNAs, tais como o miR-7, o miR-375, ou outros identificados neste estudo, possa ser necessário para o desenvolvimento e/ou a manutenção do fenótipo das células  $\beta$  e/ou de outros tipos celulares da ilhota.

Considerando esta possibilidade, exploramos a expressão dos miRNAs mais relevantes nas ilhotas adultas em diferentes estágios do desenvolvimento pancreático.

O camundongo é um modelo ótimo para o estudo do desenvolvimento pancreático de mamíferos. Entre os dias de vida embrionária e9.5 e e11.5, aparecem as primeiras células endócrinas que expressam glucagon, seguidas pelas primeiras células  $\beta$  entre os dias e11.5 e e12.5. Em torno dos dias e13.5 e e14.5, o pâncreas em desenvolvimento começa um processo conhecido como

transição secundária, caracterizado por uma grande expansão de células produtoras de insulina. No dia e18.5, a biogênese das células  $\beta$  declina enquanto que a expansão por replicação das mesmas continua. Foi estudada a expressão do miR-7 e do miR-375 em pâncreas embrionários de camundongos para investigar se esses miRNAs são expressos no estágio pré-natal e mantidos durante a auto-duplicação ou se sua expressão origina-se durante a diferenciação das células  $\beta$  dos precursores pancreáticos. Os pâncreas embrionários de camundongos no dia e11.5 do estágio de desenvolvimento pancreático foram usados como amostras calibradores em três ensaios separados. Nestes ensaios foram medidos os níveis de expressão dos miRNAs selecionados usando qRT-PCR. O miR-16 foi usado como controle endógeno. Os níveis de expressão do miR-7 foram de  $6.3 \pm 0.9$ ,  $18.6 \pm 2.2$ ,  $22.5 \pm 1.9$  e  $15.8 \pm 0.3$  para os estágios e13.5, e14.5, e18.5 e neonato respectivamente enquanto que os níveis de expressão para o miR-375 foram de  $7.6 \pm 2.2$ ,  $8.8 \pm 0.6$ ,  $25.3 \pm 2.3$  e  $13.9 \pm 1.8$  para os mesmos estágios (Figura 14).

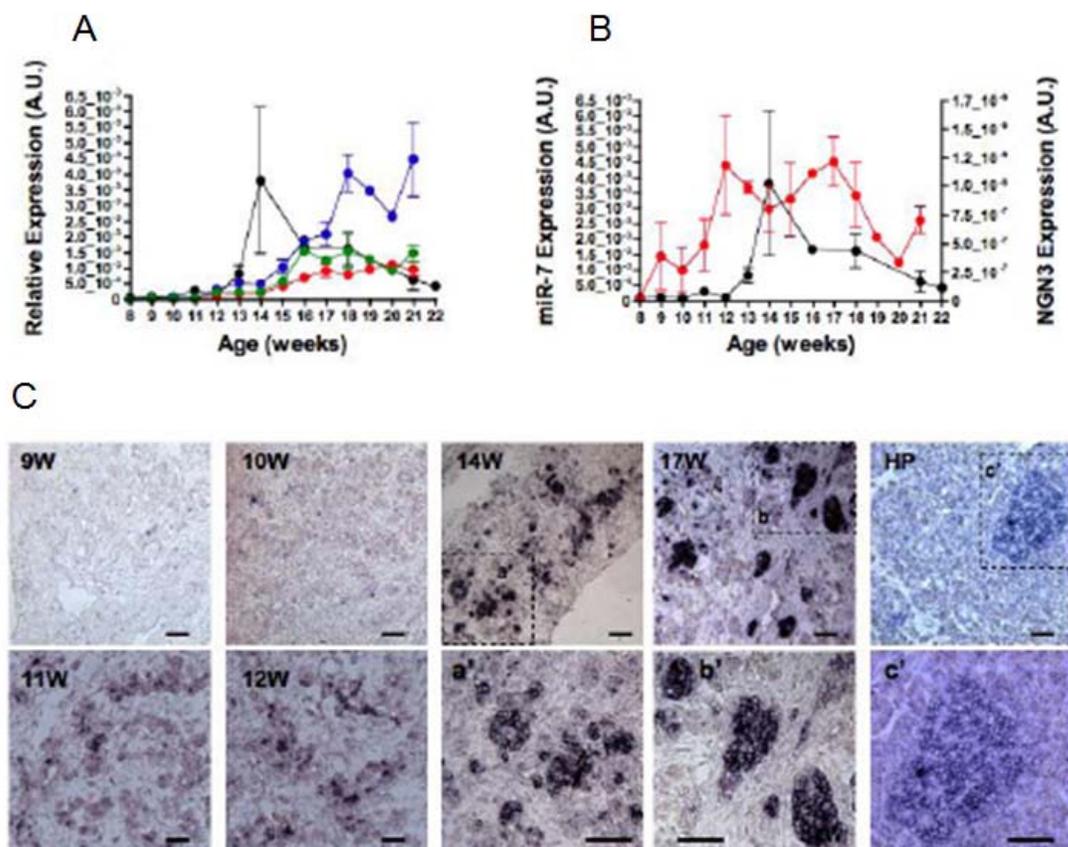


**Figura 14.** A comparação entre a expressão do miR-7 e do miR-375 nos dias e13.5, e14.5 e e18.5 do estágio embrionário pancreático e no estágio de neonato. Os valores são apresentados como as quantificações relativas (RQ) da expressão do miR-7 e do miR-375. Os dados representam as médias das RQs  $\pm$  desvio padrão, para n=3.

## 2.2) A expressão do miR-7 no desenvolvimento do pâncreas humano.

Também foi feita a análise espacial quantitativa da expressão do miR-7 durante o desenvolvimento pancreático humano. Com esta finalidade foram feitos estudos de expressão do miR-7 em pâncreas fetais desde 8 até 22 semanas de idade gestacional (wga, do inglês) assim como em pâncreas adulto usando o qRT-PCR (Figura 15). A expressão do miR-7 foi muito baixa entre as 8 e as 12 wga. Na semana 13 a expressão do mesmo começou a aumentar e na semana 14 a sua expressão aumentou 45 vezes comparada com seus níveis na semana 8. Além disso, o aumento na expressão do miR-7 coincidiu com o período no qual a expressão de genes codificadores de hormônios começou a aumentar dramaticamente (Figura 15A). Os níveis do miR-7 permaneceram elevados até a semana 18 e depois começaram a diminuir. Foi interessante o fato de que o período onde a expressão do miR-7 foi mais elevada (wga 14-18) correspondeu com os níveis máximos da expressão do marcador pró-endócrino neurogenina-3 (NGN3), embora este último apresentou um perfil de expressão ligeiramente atrasado respeito aquele do miR-7 (Figura 15B).

A seguir, foi analisada a expressão do miR-7 durante o desenvolvimento humano do pâncreas e no tecido pancreático humano adulto normal utilizando a técnica de hibridação *in situ* com uma sonda LNA anti-miR-7 (Figura 15C). As sondas LNA são análogos bicíclicos do RNA que permitem aumentar a sinal até conseguir a intensidade necessária para a detecção de sondas curtas de miRNAs (148,149). Com esta técnica a expressão do miR-7 foi observada primeiramente no epitélio do pâncreas fetal de 9 wga. A quantidade de células que expressaram o miR-7 foi muito baixa entre as 9 e as 11 semanas e aumentou posteriormente formando conglomerados de células epiteliais que expressavam o miR-7 intensamente marcadas a partir da semana 14.



**Figura 15.** O perfil de expressão do miR-7 no pâncreas fetal humano e adulto. As gráficas mostram as expressões em pâncreas fetais humanos desde as 8 até as 22 wga (A) do miR-7 (preto), da insulina (azul), do glucagão (verde) e da somatostatina (vermelho), e (B) do miR-7 (preto) e da NGN3 (vermelho) usando o qRT-PCR. Os valores são apresentados como as quantificações relativas (RQ) da expressão do miR-7. Os dados representam as médias das RQs  $\pm$  desvio padrão. O número de pâncreas fetais usados em cada estágio é mostrado na Tabela 6. (C) A hibridação *in situ* do tecido pancreático fetal humano nas semanas 9, 10, 11, 12, 14 e 17 e adulto usando uma sonda LNA marcada com fluoresceína para o miR-7 (azul escuro). Ampliação: 10X. As regiões a' e c' são mostradas com maior ampliação (20X) nos quadrados inferiores da figura. As barras escala correspondem a 50 $\mu$ m.

Gestational age (wga)	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	total
# of cases for mRNA analysis	4	4	4	4	4	4	4	3	1	3	4	2	2	3		46
# of cases for miR-7 analysis	2	2	2	2	1	3	5	0	1	2	3	0	0	3	1	28

**Tabela 6. As amostras de pâncreas fetal humano utilizadas para este estudo.**

Em resumo, foi encontrado um perfil específico de miRNAs para as células das ilhotas. O miR-7 foi o miRNA mais expresso no pâncreas endócrino, seguido por o miR-382, o miR-127, o miR-98, o miR-183, o miR-96, o miR-29c e o miR-141. A expressão do miR-7 no desenvolvimento do pâncreas segue um padrão que é correlacionado entre o camundongo e o humano. A expressão do miR-7 no camundongo começa aos 13.5 dias de idade gestacional alcançando seu nível máximo aos 14.5 dias; enquanto que no humano começa na semana 13 de idade gestacional e alcança o máximo em torno da semana 14. Em ambas as espécies os níveis de expressão diminuem depois de alcançar o máximo. Contudo, permanecem com níveis de expressões importantes no estágio adulto.

### **3) O perfil de miRNAs relacionado com o processo de inflamação.**

*3.1) O perfil de miRNAs relacionado com o processo de inflamação em modelos in vitro.*

*O efeito do TNF- $\alpha$  na expressão dos miRNAs na linhagem celular de insulinoma NIT-1.*

Foi investigado o papel dos miRNAs na morte celular de ilhotas de rato mediada por citocinas pró-inflamatórias; com a seguinte hipótese de trabalho: O TNF- $\alpha$  em combinação com a IL-1 $\beta$  e o INF- $\gamma$  induzem um padrão de expressão de miRNAs específico que mediam a morte das ilhotas pancreáticas. Com a finalidade de estabelecer as condições para estes ensaios decidimos começar o estudo utilizando um modelo simplificado tal como a linhagem celular de insulinoma NIT-1.

Estas células têm um defeito na ativação do NF- $\kappa$ B. Esta característica faz com que as mesmas sejam mais vulneráveis aos efeitos das citocinas, permitindo induzir a morte celular usando só TNF- $\alpha$  (150).

As células NIT-1 foram cultivadas durante toda a noite com o TNF- $\alpha$  (2000 U/ml de meio de cultura). Também foram cultivadas, em paralelo, células sem tratamento para ser usadas como controle. Após a purificação do RNA total que contém a fração dos miRNAs, foram feitos microarranjos usando os serviços da companhia LC Sciences (Houston, TX).

Com os resultados obtidos dos microarranjos para n=3, foi feita a análise estatística de microarranjos (SAM) (Tabela 7). Foram identificados 15 miRNAs com mudanças nos níveis de expressão (aumento ou diminuição maior do que 2.0). Nove deles aumentaram a sua expressão (Tabela 7A) e seis diminuíram-na (Tabela 7B). Os níveis de expressão para o miR-150, o miR-335, o miR-451, o miR-210 e o miR-546 foram confirmados usando o qRT-PCR (35). Seus valores são expressos como as RQs (Tabela 8). O miR-16 foi usado como controle endógeno.

A

Gene ID	Score(d)	q-value(%)	Fold increase
mmu-miR-290	4.030	0	11.240
mmu-miR-292-5p	3.476	0	5.531
mmu-miR-214	3.047	0	3.214
mmu-miR-467	3.044	0	3.260
mmu-miR-223	2.885	0	1.838
mmu-miR-546	2.617	0	9.248
mmu-miR-335	2.205	0	2.071
mmu-miR-298	1.921	0	1.404
mmu-miR-346	1.905	0	0.829

B

Gene ID	Score(d)	q-value(%)	Fold increase
mmu-miR-140*	-1.934	0	1.691
mmu-miR-409	-2.031	0	2.298
mmu-miR-96	-2.092	0	1.894
mmu-miR-376b	-2.219	0	2.390
mmu-miR-129-3p	-2.438	0	1.791
mmu-miR-28	-2.590	0	2.593

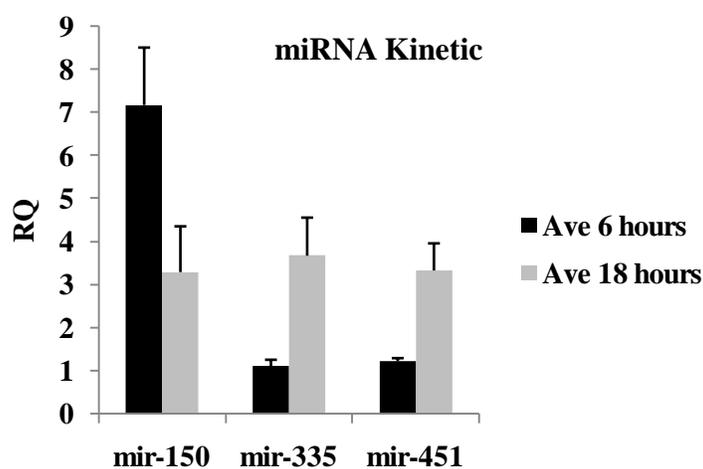
**Tabela 7. Os miRNAs que mudaram as suas expressões em presença de TNF-  $\alpha$ . Estes resultados foram obtidos aplicando a análise significativa de microarranjos (SAM) nas células NIT-1 tratadas com o TNF- $\alpha$  comparadas com as usadas como controle sem tratamento.**

<b>Relevant miRNA</b>	<b>Log<sub>2</sub> (TNF<math>\alpha</math>/Control)</b>	<b>Fold Change</b>	<b>RQ (qRT PCR confirmation)</b>
<b>miR-150</b>	6.68	102.54	4.19
<b>miR-335</b>	3.27	9.65	3.32
<b>miR-451</b>	1.93	3.81	1.28
<b>miR-210</b>	-3.53	-11.55	0.17
<b>miR-546</b>	4.57	23.75	5.28
<b>miR-467</b>	1.34	2.53	N/A
<b>miR-290</b>	4.63	24.76	N/A
<b>miR-292-5p</b>	4.06	16.68	N/A
<b>miR-214</b>	2.96	7.78	N/A

**Tabela 8. Os miRNAs que têm mudança nos níveis de expressão maior do que 2.0, em um ou outro sentido nas células NIT-1, identificados através da análise de microarranjos. Os dados são apresentados como a razão entre as células tratadas com o TNF- $\alpha$  e as células controles. Os níveis de expressão de cinco destes miRNAs foram confirmados usando o qRT-PCR.**

Tomando em consideração a falta de informação respeito das variações no perfil de miRNAs devido ao tempo de incubação com TNF- $\alpha$ , estudamos a cinética de expressão dos mesmos após o tratamento com esta citocina. Foram estudados 3 miRNAs e encontramos padrões de expressão diferentes para 6 e 18 horas de tratamento: o miR-150, o miR-335 e o miR-451 ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ). O

miR-335 e o miR-451 mostraram o aumento maior na expressão depois de 18 horas de tratamento (com mais de 3 vezes de aumento), enquanto que nenhum aumento relevante foi observado depois de 6 horas de tratamento. Contrariamente, o miR-150 mostrou o valor de expressão mais elevado após 6 horas de incubação (7 vezes) e diminuiu depois de 18 horas (com um aumento de só 4 vezes). Tanto o miR-150 como o miR-335 e o miR-451 apresentaram o mesmo nível de expressão em 18 horas de tratamento. É interessante o fato que o miR-150 mostrou a resposta mais imediata e seus níveis de expressão foram os mais elevados (Figura 16).



**Figura 16.** A cinética de expressão dos miRNAs nas células NIT-1 após o tratamento com **TNF- $\alpha$** . Foi determinada a expressão dos miRNA às 6 e 18 horas após o tratamento com **TNF- $\alpha$** . As RQs representam a mudança na expressão dos miRNAs em uma amostra tratada comparada com uma amostra não tratada usada como calibrador.

*O efeito do TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e o INF- $\gamma$  no perfil de expressão dos miRNAs em ilhotas de rato.*

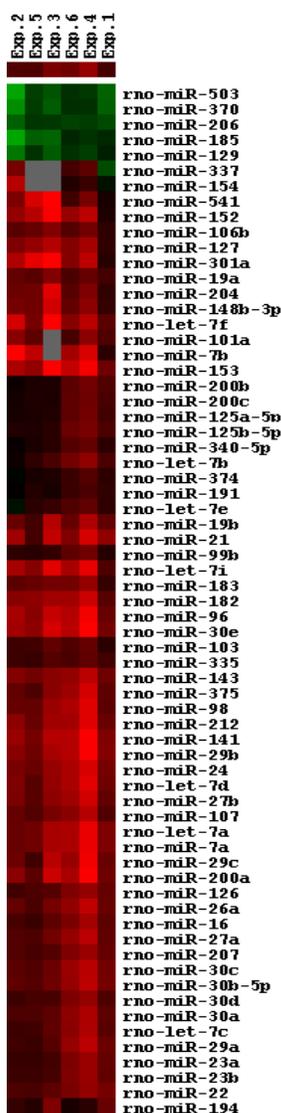
Foram feitos microarranjos utilizando sondas miRCURY LNA (ácidos nucleicos fechados). Para estudar as variações no perfil de miRNAs após o tratamento com as citocinas pró-inflamatórias, foram usados 2000 U/ml de TNF- $\alpha$ , 100 U/ml de INF- $\gamma$  e 50 U/ml de IL-1 $\beta$ . Tem sido descrito

previamente que estas concentrações induzem a morte das células  $\beta$  (151). Foi estudada a cinética de expressão dos miRNAs após o tratamento com estas citocinas utilizando microarranjos com amostras tratadas por 6 e 18 horas (n=3). Às 18 horas a expressão dos miRNAs foi muito baixa enquanto que às 6 horas foram obtidos os resultados contrários (Tabela 9A e B). Conseqüentemente, a conclusão é que o efeito máximo das citocinas sobre o perfil de miRNAs em ilhotas de rato ocorre durante as primeiras horas do tratamento. Baseado nestes fatos, os estudos de microarranjos realizados posteriormente foram feitos após 6 horas do tratamento.

Com os resultados obtidos dos microarranjos (n=3), foi aplicada a análise estatística de microarranjos (SAM). Foram identificados 64 miRNAs que têm valor zero de probabilidade de ser um positivo falso ( $q=0$ ). Dos mesmos 59 aumentaram sua expressão e 5 diminuíram-na. Na análise estatística foram consideradas as mudanças nos níveis de expressão maiores ou menores de 2.0 vezes. O resultado obtido é mostrado na Tabela 9A. Estes dados são apresentados também usando os programas “Cluster” e “TreeView”, que ajudam a análise e a visualização dos resultados obtidos através dos microarranjos (152) (Figura 17).

A	Gene ID	Score(d)	q-value(%)	Fold increase	Gene ID	Score(d)	q-value(%)	Fold increase
	rno-miR-143	6.662	0	7.473	rno-miR-27a	4.453	0	6.167
	rno-miR-30e	6.040	0	15.349	rno-let-7a	4.419	0	8.402
	rno-miR-182	5.990	0	9.062	rno-miR-375	4.379	0	7.780
	rno-miR-96	5.978	0	13.585	rno-miR-30a	4.372	0	5.279
	rno-miR-141	5.853	0	13.191	rno-miR-19b	4.308	0	6.583
	rno-miR-24	5.668	0	9.217	rno-let-7f	4.308	0	19.780
	rno-miR-29b	5.532	0	12.710	rno-miR-16	4.100	0	4.691
	rno-miR-212	5.491	0	9.764	rno-miR-29c	4.088	0	10.565
	rno-miR-7a	5.247	0	10.679	rno-miR-103	4.076	0	2.986
	rno-miR-19a	5.236	0	3.899	rno-miR-148b-3p	4.040	0	7.123
	rno-let-7i	5.159	0	13.737	rno-miR-30d	3.933	0	4.087
	rno-miR-153	5.099	0	25.010	rno-miR-301a	3.888	0	22.265
	rno-miR-22	5.067	0	4.714	rno-let-7c	3.854	0	5.110
	rno-miR-27b	5.044	0	8.113	rno-miR-23b	3.812	0	4.339
	rno-miR-21	5.019	0	10.216	rno-miR-29a	3.679	0	5.784
	rno-miR-30b-5p	4.988	0	6.612	rno-miR-23a	3.622	0	4.262
	rno-let-7d	4.942	0	9.571	rno-miR-204	3.558	0	7.446
	rno-miR-30c	4.822	0	6.475	rno-miR-541	2.946	0	13.082
	rno-miR-200a	4.791	0	12.957	rno-miR-99b	2.918	0	13.082
	rno-miR-207	4.767	0	4.647	rno-let-7b	2.807	0	3.582
	rno-miR-183	4.764	0	4.700	rno-miR-125b-5p	2.740	0	2.998
	rno-miR-127	4.760	0	7.632	rno-miR-17/17-5p	2.675	0	9.948
	rno-miR-107	4.735	0	5.980	rno-miR-194	2.537	0	2.875
	rno-miR-335	4.715	0	2.846	rno-miR-200c	2.432	0	2.609
	rno-miR-101a	4.702	0	3.922	rno-miR-125a-5p	2.428	0	2.642
	rno-miR-26a	4.699	0	6.544	rno-miR-200b	2.340	0	2.675
	rno-miR-98	4.594	0	9.321	rno-miR-340-5p	2.195	0	2.266
	rno-miR-7b	4.575	0	13.965	rno-let-7e	2.032	0	2.292
	rno-miR-126	4.542	0	4.510	rno-miR-337	1.973	0	2.002
	rno-miR-106b	4.524	0	4.030				
	<b>Gene ID</b>	<b>Score(d)</b>	<b>q-value(%)</b>	<b>Fold increase</b>				
	rno-miR-185	-2.806	0	2.685				
	rno-miR-129	-2.962	0	2.370				
	rno-miR-503	-3.247	0	2.988				
	rno-miR-370	-3.362	0	2.833				
	rno-miR-206	-4.301	0	2.529				
<b>B</b>	<b>Gene ID</b>	<b>Score(d)</b>	<b>q-value(%)</b>	<b>Fold increase</b>				
	rno-miR-877	-2.581	0	1.789				
	rno-miR-99b*	-2.671	0	3.103				

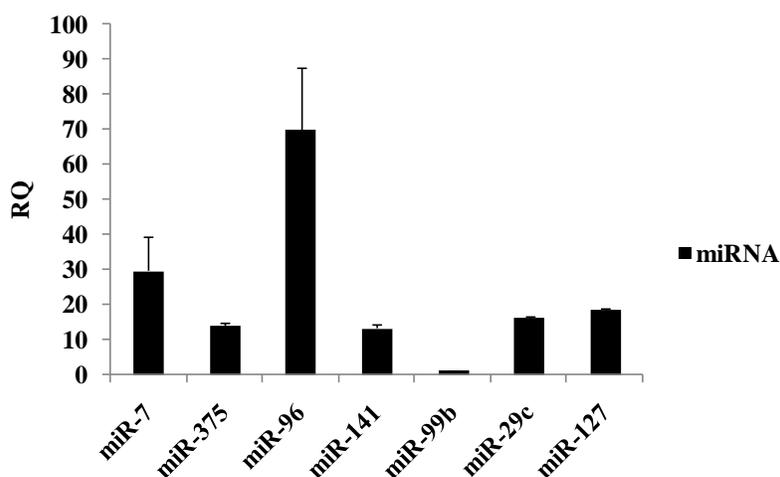
**Tabela 9. (A) A lista dos miRNAs obtida aplicando a análise significativa de microarranjos (SAM) nas ilhotas de rato tratadas com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  por 6 horas comparadas com aquelas não tratadas usadas como controles. (B) A lista dos miRNAs obtida aplicando a análise significativa de microarranjos (SAM) nas ilhotas de rato tratadas com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$  por 18 horas comparadas com as não tratadas usadas como controles.**



**Figura 17.** A expressão diferencial dos miRNAs em ilhotas de rato após 6 horas de tratamento com as citocinas pró-inflamatórias comparadas com as controles não tratadas.

O mapa de expressão foi obtido com o programa “Treeview” usando os dados apresentados na Tabela 9. Com a cor vermelha representam-se os miRNAs diferencialmente expressos nas ilhotas. Com a cor verde representam-se os miRNAs diferencialmente expressos no tecido acinar. A gradação das cores descreve a expressão dos miRNAs desde a expressão elevada (vermelho ou verde brilhante) até expressão baixa (preto) e não expressão (cinza).

Os níveis de expressão para o miR-7, o miR-375, o miR-96, o miR-141, o miR-99b, o miR-29c e o miR-127 foram confirmados usando o qRT-PCR (35). Para estes ensaios o gene 18S foi usado como controle endógeno seguindo as recomendações atualizadas da companhia (Applied Biosystem). Os níveis de expressão foram  $29.7 \pm 9.9$ ,  $14 \pm 1$ ,  $70 \pm 17.5$ ,  $13.4 \pm 0.8$ ,  $1.2 \pm 0.02$ ,  $16.3 \pm 0.6$  e  $18.6 \pm 0.4$  respectivamente para  $n=3$ . Eles são apresentados na Figura 18.



**Figura 18.** A análise quantitativa utilizando o qRT-PCR. Os miRNAs expressos diferencialmente em ilhotas de rato após o tratamento com as citocinas pró-inflamatórias por 6 horas comparadas com as amostras não tratadas usadas como controle.

#### *O efeito do NF-κB no perfil de expressão de miRNAs em ilhotas de rato.*

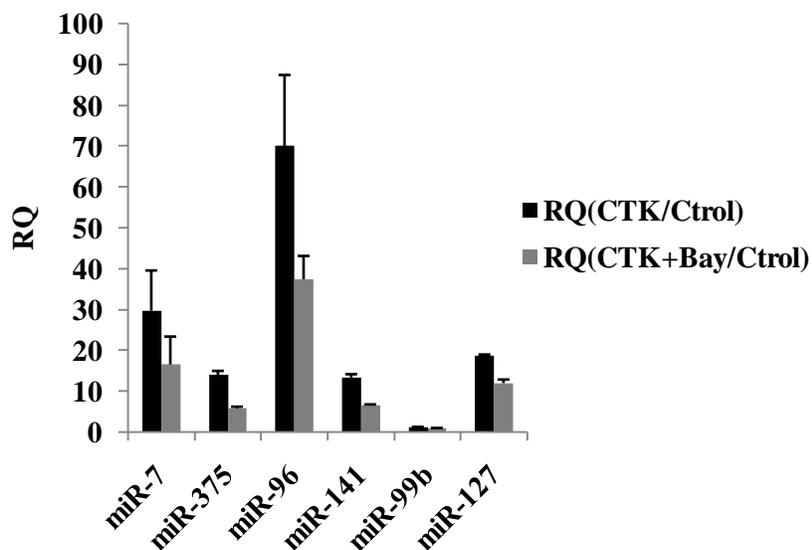
A via do NF-κB tem um papel crítico na morte das ilhotas induzida pelas citocinas pró-inflamatórias. Conseqüentemente, foi investigado se a indução dos miRNAs mediada pelas citocinas era dependente também da ativação do NF-κB.

Foram realizados os microarranjos com sondas miRCURY LNA tanto com amostras tratadas por 6 horas com a mistura de citocinas quanto com as pré-tratadas com o “Bay 11-7082”, que é um

inibidor da via do NF- $\kappa$ B (5  $\mu$ mol/l) e depois 6 horas com as citocinas. O Bay 11-7082 permaneceu no meio durante todo o tratamento. A continuação foi aplicada a análise estatística de microarranjos (SAM) para n=3. Interessantemente, todos os miRNAs que aumentaram sua expressão neste experimento coincidiram com os que aumentaram sua expressão no microarranjo onde foram analisadas as ilhotas após o tratamento com citocinas comparadas com as não tratadas (Tabela 10). Neste caso também foram confirmados os níveis de expressão de alguns miRNAs usando o qRT-PCR (35). Estes miRNAs foram selecionados tomando em consideração sua especificidade de expressão em células endócrinas de pâncreas (Tabela 3). Foram analisados dois grupos: o primeiro onde as ilhotas de rato trataram-se com as citocinas por 6 horas comparadas com ilhotas não tratadas e o segundo onde as mesmas foram pré-tratadas por 2 horas com o Bay 11-7082 e depois por 6 horas com as citocinas comparadas com ilhotas não tratadas. Os níveis de expressão obtidos para o primeiro grupo foram de  $29.7\pm 9.8$ ,  $13.9\pm 1.0$ ,  $70.0\pm 17.4$ ,  $13.3\pm 0.8$ ,  $1.2\pm 0.01$ , e  $18.5\pm 0.4$  para o miR-7, o miR-375, o miR-96, o miR-141, o miR-99b e o miR-127 respectivamente, para n=3 Para o segundo grupo foram de  $16.5\pm 6.8$ ,  $5.8\pm 0.3$ ,  $37.4\pm 5.7$ ,  $6.6\pm 0.1$ ,  $0.8\pm 0.1$ , e  $11.9\pm 0.8$  respectivamente, para n=3. Estes dados são apresentados na Figura 19. O gene 18S foi usado novamente como controle endógeno.

miRNA	Fold increase		miRNA	Fold increase	
	CTK/Ctrol	CTK+Bay/CTK		CTK/Ctrol	CTK+Bay/CTK
rno-miR-153	25.010	3.410	rno-miR-26a	6.544	NA
rno-miR-301a	22.265	NA	rno-miR-30c	6.475	3.114
rno-let-7f	19.780	2.540	rno-miR-27a	6.167	NA
rno-miR-30e	15.349	3.424	rno-miR-107	5.980	2.878
rno-miR-7b	13.965	NA	rno-miR-29a	5.784	2.751
rno-let-7i	13.737	3.616	rno-miR-30a	5.279	3.591
rno-miR-96	13.585	3.005	rno-let-7c	5.110	3.271
rno-miR-141	13.191	3.424	rno-miR-22	4.714	2.711
rno-miR-541	13.082	NA	rno-miR-183	4.700	2.594
rno-miR-99b	13.082	3.058	rno-miR-16	4.691	3.050
rno-miR-200a	12.957	3.047	rno-miR-207	4.647	2.830
rno-miR-29b	12.710	3.557	rno-miR-126	4.510	2.920
rno-miR-7a	10.679	3.122	rno-miR-23b	4.339	2.794
rno-miR-29c	10.565	4.055	rno-miR-23a	4.262	3.133
rno-miR-21	10.216	NA	rno-miR-30d	4.087	2.463
rno-miR-17/17-5p	9.948	NA	rno-miR-106b	4.030	NA
rno-miR-212	9.764	2.606	rno-miR-101a	3.922	NA
rno-let-7d	9.571	3.268	rno-miR-19a	3.899	2.069
rno-miR-98	9.321	2.768	rno-let-7b	3.582	NA
rno-miR-24	9.217	2.966	rno-miR-125b-5p	2.998	3.162
rno-miR-182	9.062	2.830	rno-miR-103	2.986	2.961
rno-let-7a	8.402	3.299	rno-miR-194	2.875	NA
rno-miR-27b	8.113	3.264	rno-miR-335	2.846	2.537
rno-miR-375	7.780	3.249	rno-miR-200b	2.675	3.157
rno-miR-127	7.632	2.488	rno-miR-125a-5p	2.642	3.042
rno-miR-143	7.473	2.962	rno-miR-200c	2.609	3.084
rno-miR-204	7.446	NA	rno-let-7e	2.292	NA
rno-miR-148b-3p	7.123	2.018	rno-miR-340-5p	2.266	2.831
rno-miR-30b-5p	6.612	3.143	rno-miR-337	2.002	NA
rno-miR-19b	6.583	2.163			

**Tabela 10. A comparação das hibridações de dois grupos de microarranjos: ilhotas tratadas com as citocinas comparadas com as não tratadas e ilhotas pré-tratadas com Bay 11-7082 e posteriormente tratadas com as citocinas comparadas com as tratadas com as citocinas somente.** A lista dos miRNAs foi obtida através da análise estatística de microarranjos (SAM). Os miRNAs com  $q=0$  têm uma probabilidade zero de ser positivos falsos. Na análise estatística foram consideradas as mudanças nos níveis de expressão maiores de 2.0 vezes.



**Figura 19.** A análise quantitativa usando o qRT-PCR de dois grupos: os miRNAs diferencialmente expressos em ilhotas de rato tratadas com as citocinas comparadas com ilhotas não tratadas e em ilhotas pré-tratadas com Bay11-7082 e posteriormente com as citocinas comparadas com ilhotas não tratadas.

### 3.1) O perfil de miRNAs relacionado com o processo de inflamação em modelos *in vivo*.

*O modelo das ilhotas expostas a um ambiente pró-inflamatório in vivo (o modelo do transplante).*

Foi investigado o efeito de um ambiente inflamatório *in vivo* na expressão dos miRNAs nas ilhotas usando modelos experimentais relevantes. No primeiro modelo as ilhotas foram transplantadas sob a cápsula do rim de ratos receptores singênicos; estes animais por ser geneticamente idênticos não fazem rejeição ao transplante. Este modelo tem um valor incalculável para o estudo do impacto da inflamação nas células da ilhota. No período imediato á pós-implantação, as células da ilhota são expostas a múltiplos estímulos nocivos através da indução de vias de transdução de sinais ativados pelo estresse e da geração de mediadores

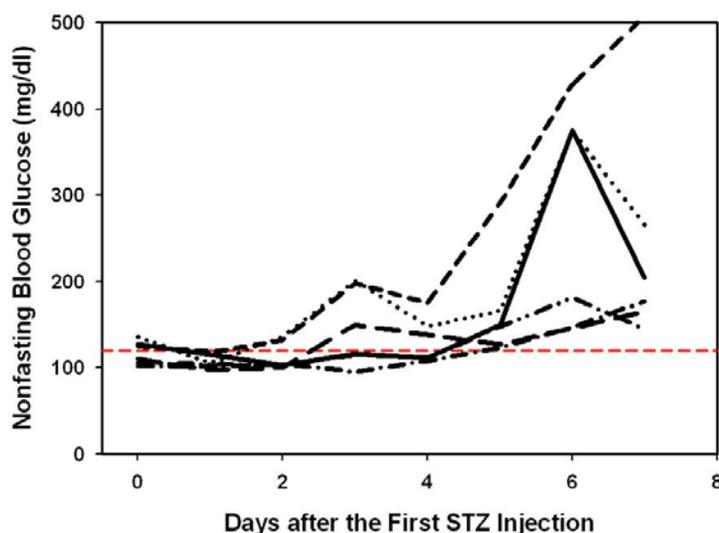
inflamatórios. Todo isso contribui à redução da função das células da ilhota e a sua morte (153-157). Uma característica importante deste sistema experimental é a disponibilidade de uma massa conspícua de ilhotas em um espaço bem definido, que permite a recuperação das mesmas para estudos moleculares posteriores simplesmente dissecando o transplante sem necessidade de uma dissociação enzimática e/ou mecânica (158). As ilhotas foram recuperadas 3 dias após o transplante dissecando o mesmo e liverando-o dos tecidos circunvizinhos. A expressão de miRNAs em ilhotas transplantadas e posteriormente recuperadas foi analisada usando os microarranjos com sondas LNA (Exiqon) (n=3) e a análise subsequente com o programa SAM. Foi determinado um perfil de 95 miRNAs cuja expressão foi alterada neste modelo *in vivo* (Tabela 11).

miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change
rno-let-7a	11.44	rno-miR-16	9.94	rno-miR-30b	6.22
rno-let-7b	11.56	rno-miR-17	8.80	rno-miR-30c	6.20
rno-let-7c	10.94	rno-miR-181a	2.46	rno-miR-30e	5.93
rno-let-7d	11.01	rno-miR-182	4.84	rno-miR-31	7.81
rno-let-7e	4.87	rno-miR-183	4.14	rno-miR-32	3.08
rno-let-7f	8.31	rno-miR-191	6.65	rno-miR-335-5p	3.87
rno-let-7g	4.33	rno-miR-193	11.13	rno-miR-340-5p	3.98
rno-let-7i	9.43	rno-miR-195	10.76	rno-miR-34a	6.29
rno-miR-100	8.35	rno-miR-199a-5p	23.54	rno-miR-365	3.75
rno-miR-101a	4.49	rno-miR-19a	5.31	rno-miR-370	3.91
rno-miR-103	3.87	rno-miR-19b	7.01	rno-miR-375	7.15
rno-miR-106a	7.00	rno-miR-200a	5.77	rno-miR-378	4.68
rno-miR-106b	6.32	rno-miR-200b	5.06	rno-miR-429	4.20
rno-miR-107	4.95	rno-miR-200c	4.57	rno-miR-434-3p	3.06
rno-miR-10a	6.95	rno-miR-207	9.65	rno-miR-451	25.00
rno-miR-125b-5p	9.09	rno-miR-20a	8.63	rno-miR-455*	3.90
rno-miR-126-3p	10.73	rno-miR-21	26.72	rno-miR-487b	7.92
rno-miR-127	4.42	rno-miR-212	9.79	rno-miR-667	6.18
rno-miR-129	4.81	rno-miR-214	18.56	rno-miR-668	6.46
rno-miR-130a	10.56	rno-miR-22	8.96	rno-miR-690	10.51
rno-miR-140	3.67	rno-miR-223	3.48	rno-miR-691	7.87
rno-miR-141	5.17	rno-miR-23a	8.59	rno-miR-697	3.06
rno-miR-142-3p	5.88	rno-miR-23b	8.32	rno-miR-700	5.90
rno-miR-142-5p	3.55	rno-miR-24	7.54	rno-miR-709	9.66
rno-miR-143	13.45	rno-miR-26a	5.78	rno-miR-7a	5.75
rno-miR-146b	6.89	rno-miR-27a	10.50	rno-miR-7b	5.19
rno-miR-148a	4.07	rno-miR-27b	9.23	rno-miR-801	4.91
rno-miR-148b	3.52	rno-miR-29a	6.60	rno-miR-96	5.20
rno-miR-152	7.94	rno-miR-29b	5.96	rno-miR-98	10.54
rno-miR-153	3.20	rno-miR-29c	6.29	rno-miR-99a	4.74
rno-miR-15a	8.88	rno-miR-301a	5.97	rno-miR-99b	6.03
rno-miR-15b	9.28	rno-miR-30a	6.03		

**Tabela 11. A comparação das hibridações dos microarranjos entre as ilhotas transplantadas sob a cápsula do rim de ratos recuperadas após 3 dias comparadas com ilhotas de rato não-transplantadas.** A lista de miRNAs foi obtida através da análise estatística de microarranjos (SAM). Na análise estatística foram consideradas as mudanças nos níveis de expressão maiores de 2.0 vezes.

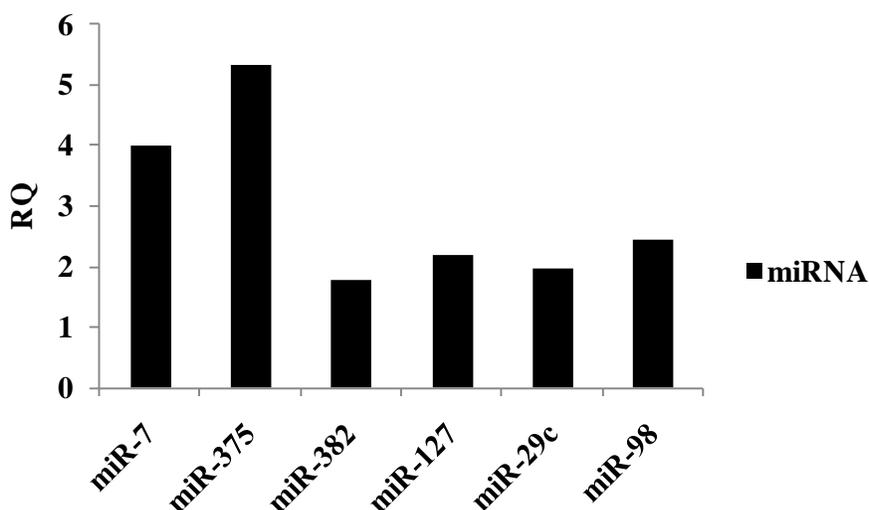
*O modelo das ilhotas expostas a um ambiente pró-inflamatório in vivo (o modelo de indução de diabetes com a estreptozotocina em rato).*

Também foi investigada a expressão do conjunto de miRNAs induzidos pelo processo inflamatório usando outro modelo experimental. Foram administradas doses baixas e repetidas de estreptozotocina (STZ) (20 mg/kg/day) para induzir uma perda progressiva das células  $\beta$  pelo recrutamento de células inflamatórias e pela produção de mediadores inflamatórios tais como o óxido nítrico (NO, do inglês) e de **espécies reativas do oxigênio (ROS, do inglês)** (143,159-162). Foi realizado um experimento usando ratos Lewis. Concordantes com o esperado, os valores da glicemia, começaram a aumentar na primeira semana desde um valor meio de  $118 \pm 14$  mg/dl até  $244 \pm 135$  mg/dl para  $n=6$  (Figura 20).



**Figura 20.** Os valores da glicemia de ratos Lewis que foram submetidos ao protocolo das doses baixas de STZ. Foi observado um aumento progressivo dos valores da glicemia ao longo do período analisado para  $n=6$ . A linha pontilhada horizontal vermelha corresponde ao valor de 120 mg/dl que é o valor de referência.

Após três dias da última injeção de STZ, as ilhotas foram isoladas para realizar estudos moleculares sobre a expressão dos miRNAs. A avaliação usando o qRT-PCR de certos miRNAs tais como o miR-7, o miR-375, o miR-29c, o miR-382, o miR-127 e o miR-98 indicou que suas expressões aumentaram 4.1, 5.2, 2.0, 1.8, 2.2 e 2.4 vezes respectivamente nas ilhotas isoladas de pâncreas expostos às doses baixas repetidas de STZ comparadas com as ilhotas isoladas de controles não tratados (Figura 21).

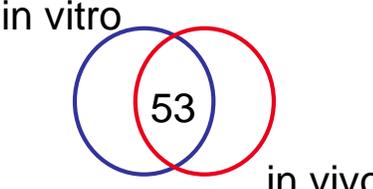


**Figura 21.** A análise quantitativa usando o qRT-PCR de certos miRNAs relacionados com o processo inflamatório em ilhotas de rato tratadas com STZ comparadas com ilhotas de animais controles não tratados.

*Determinação do perfil de miRNAs relacionado com o processo inflamatório comparando os dados obtidos em modelos in vitro e in vivo.*

Comparando os perfis de expressão de miRNAs obtidos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*, foi identificado um subconjunto de 53 miRNAs regulados comumente em ambos os modelos na ilhota pancreática (Tabela 12). Estes resultados sugerem que este grupo de miRNAs pode ser

associado com o mecanismo intrínseco molecular básico que determina o processo inflamatório e que desempenha um papel crítico na destruição das ilhotas na fase inicial de T1D.

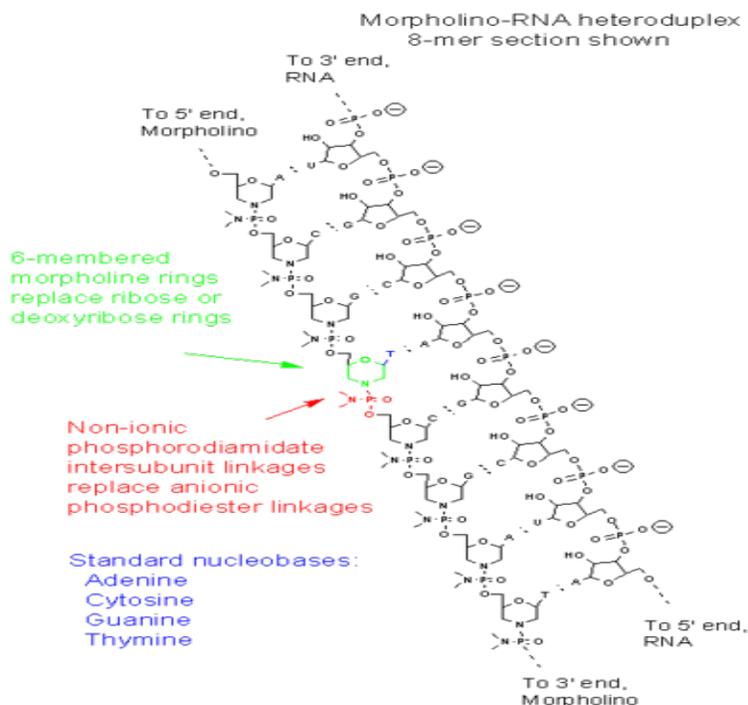


miRNA	Fold Change		miRNA	Fold Change	
	In vivo	In vitro		In vivo	In vitro
mmu-let-7a	11.44	8.45	mmu-miR-212	9.79	9.76
mmu-let-7b	11.56	3.54	mmu-miR-22	8.96	4.72
mmu-let-7c	10.94	5.12	mmu-miR-23a	8.59	4.28
mmu-let-7d	11.01	9.56	mmu-miR-23b	8.32	4.33
mmu-let-7e	4.87	2.2	mmu-miR-24	7.54	9.24
mmu-let-7f	8.31	19.7	mmu-miR-26a	5.78	6.24
mmu-let-7i	9.43	13.73	mmu-miR-27a	10.50	6.17
mmu-miR-101a	4.49	3.94	mmu-miR-27b	9.23	8.11
mmu-miR-103	3.87	2.93	mmu-miR-29a	6.60	5.78
mmu-miR-106b	6.32	4.02	mmu-miR-29b	5.96	12.71
mmu-miR-107	4.95	5.96	mmu-miR-29c	6.29	10.56
mmu-miR-126-3p	10.73	4.51	mmu-miR-301a	5.97	22.21
mmu-miR-127	4.42	7.67	mmu-miR-30a	6.03	5.27
mmu-miR-141	5.17	13.12	mmu-miR-30b	6.22	6.61
mmu-miR-143	13.45	7.42	mmu-miR-30c	6.20	6.47
mmu-miR-148b	3.52	7.11	mmu-miR-30e	5.93	15.34
mmu-miR-153	3.20	25.03	mmu-miR-335-5p	3.87	2.84
mmu-miR-16	9.94	4.62	mmu-miR-375	7.15	7.78
mmu-miR-17	8.80	9.91	mmu-miR-98	10.54	9.32
mmu-miR-182	4.84	9.03	mmu-miR-99b	6.03	13.08
mmu-miR-183	4.14	4.73	mmu-miR-207	9.65	7.63
mmu-miR-19a	5.31	3.89	mmu-miR-370	3.91	-3.32
mmu-miR-19b	7.01	6.53	mmu-miR-7a	5.66	10.69
mmu-miR-200a	5.77	12.95	mmu-miR-7b	5.19	13.96
mmu-miR-200b	5.06	2.62	mmu-miR-96	5.20	13.58
mmu-miR-200c	4.57	2.67	rno-miR-129	4.81	-29.6
mmu-miR-21	26.72	10.21			

**Tabela 12. Os miRNAs associados com a inflamação na ilhota.** As ilhotas de ratos Lewis foram expostas a ação das citocinas (a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$ ) em culturas de células (*in vitro*) ou transplantadas em animais receptores singênicos e recuperados após 3 dias (*in vivo*). A expressão de miRNAs pelas ilhotas expostas às condições inflamatórias foi comparada com ilhotas controles não manipuladas. A análise da expressão dos miRNAs foi feita usando microarranjos com sondas miRCURY LNA (Exiqon). Cinquenta e três miRNAs mudaram sua expressão sob ambas as condições inflamatórias *in vitro* e *in vivo*.

*A liberação de moléculas inibitórias da expressão de miRNAs em ilhotas in vivo.*

Com a finalidade de avaliar o impacto da modulação da expressão de miRNAs *in vivo* foi estabelecido um modelo de liberação localizada de determinados reagentes ao lugar da implantação das ilhotas em roedores. Os morfolinos (MO) são moléculas mímicas do DNA que têm sido usadas com sucesso como inibidores específicos de miRNAs *in vivo* (103) (Figura 22).

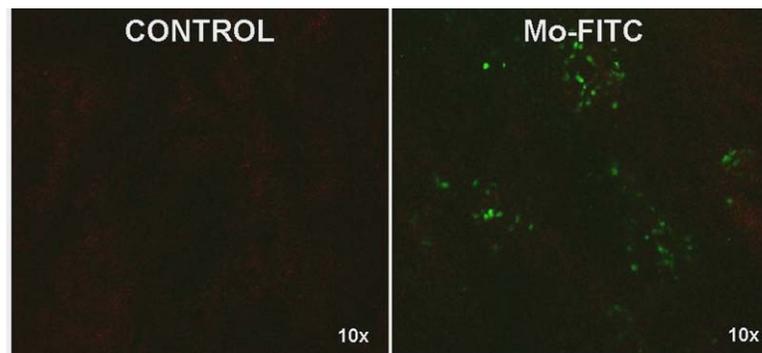


**Figura 22.** A estrutura da molécula de morfolino (MO).

O nosso modelo consiste na implantação de um cateter pequeno de silicone unido a uma bomba osmótica (Alzet) no espaço subcapsular renal muito próximo ao lugar do transplante das ilhotas. A bomba osmótica libera constantemente o MO específico em concentrações elevadas no microambiente do implante das ilhotas. Neste experimento foi utilizada uma bomba osmótica com fluxo de 1ul/hr para liberar o MO de seqüência irrelevante conjugado a um fluoróforo (MO-FITC) no lugar do transplante singênico de ~3,000 ilhotas equivalentes (IEQ, do inglês) sob a

cápsula do rim de ratos Lewis. As ilhotas transplantadas nas mesmas condições não tratadas foram usadas como controles.

Quarenta e oito horas após a transplantação das ilhotas, os rins foram removidos e analisados através de microscopia confocal *ex vivo* usando um microscópio multifóton Leica. A expressão do MO fluorescente nos transplantes tratados confirmou o sucesso da transdução do MO nas ilhotas. Os controles não tratados não mostraram fluorescência (Figura 23).

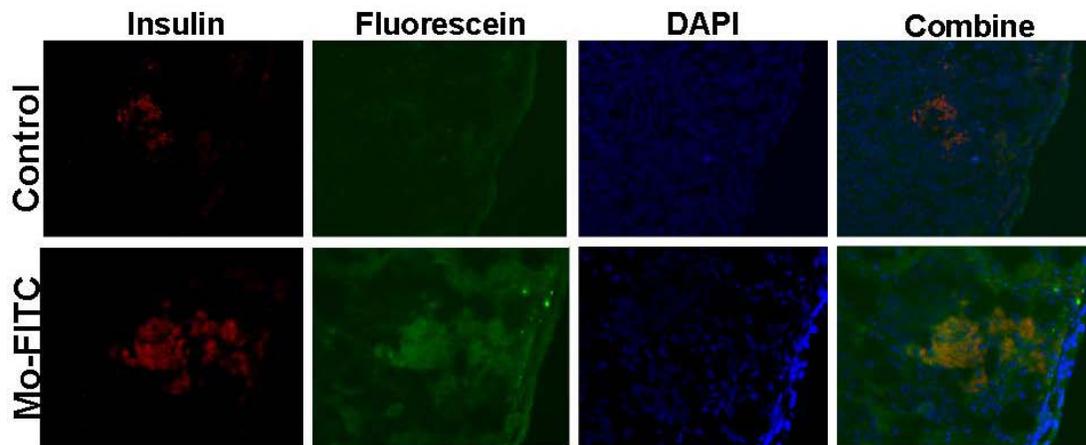


**Figura 23.** As imagens obtidas dos transplantes de ilhotas *ex vivo* através de microscopia confocal.

Os ratos Lewis receberam ~3.000 IEQ ilhotas singênicas. Um MO específico de seqüência irrelevante conjugado com uma molécula de fluoróforo FITC (MO-FITC) foi liberado no lugar do transplante usando uma bomba osmótica (Alzet, modelo 1003; fluxo de 1ul/hr). A microscopia confocal *ex vivo* dos rins transplantados com ilhotas demonstrou a expressão de fluorescência verde no lugar da implantação das ilhotas tratadas com o MO-FITC (no painel direito) e a falta de fluorescência verde no transplante controle (no painel esquerdo).

Os transplantes recuperados também foram avaliados usando a técnica de imuno-coloração para determinar a co-localização do MO-FITC nas células produtoras de insulina em crioseções. A imuno-coloração foi realizada com um anticorpo anti-insulina (marca as células  $\beta$  de vermelho),

com um anticorpo anti-fluoresceína (marca de verde os lugares onde há MO-FITC), e com o corante DAPI (marca de azul as moléculas de DNA e por tanto os núcleos) (Figura 24).



**Figura 24.** A imuno-coloração nas crioseções recuperadas dos transplantes. A microscopia fluorescente foi realizada em seções coloradas. É mostrada a falta de fluorescência verde nas amostras dos transplantes controles (nos painéis superiores) e a co-localização do MO conjugado com FITC com a insulina nos transplantes tratados com o MO-FITC (nos painéis inferiores).

Em resumo, foi encontrado um subconjunto específico de miRNAs relacionados com o processo inflamatório usando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Os miRNAs mais conspícuos que pertencem a este grupo são o miR-7, o miR-375, a família do miR-29 (a, b e c), o miR-96, o miR-21, o miR-141, o miR-127, o miR-382 e o miR-98 entre outros.

## Discussões

**Discussão do objetivo 1.** *Investigar a estabilidade dos miRNAs, otimizando as condições para a isolamento e a análise deles.*

Considerando o tamanho pequeno dos miRNAs e sua pouca abundancia (constituem entre 0.1 e 0.01% do RNA total de uma célula), a estabilidade deles é crítica para realizar análises de expressão.

Foi mostrado que os miRNAs obtidos utilizando os métodos de preparação de RNA usados atualmente em estudos de expressão são instáveis. A estocagem do RNA em  $-80^{\circ}\text{C}$  por períodos de tempo curtos como 3 dias são associados com uma diminuição dramática na quantidade de miRNAs. Aliás, em comparação, as moléculas do mRNA são estáveis por mais de 3 semanas sob as mesmas condições (163). A degradação dos miRNAs não é uniforme, alguns deles degradam-se mais rapidamente do que outros. Contudo todos os miRNAs testados mostraram degradação. Devido ao fato de que os miRNAs testados não pertencem à mesma família, é muito provável que a degradação observada não esteja relacionada com a seqüência intrínseca destas moléculas podendo fazer esta observação extensiva à maioria se não todos os miRNAs. Contrariamente à opinião comum, os cDNAs foram tão instáveis quanto seus miRNAs correspondentes em termos de degradação. Após 6 dias em  $-80^{\circ}\text{C}$  um oligômero sintético de DNA que corresponde à mesma seqüência do cDNA que deve ser obtida na reação de transcrição reversa para o let-7d foi estável mantendo sua concentração inalterada. A partir de estes dados sugerimos que a instabilidade observada para os cDNAs e talvez para os miRNAs não é devida a uma característica molecular intrínseca e sim está relacionada com o método de obtenção do RNA. De essa maneira, ao trabalhar com miRNAs, o tempo de estocagem do RNA e do cDNA é crítico e deve ser considerado para obter comparações válidas entre as amostras. Isto é particularmente importante

quando são realizadas análises de expressão utilizando a técnica de microarranjo de miRNAs usando os serviços de laboratórios especializados onde as amostras do RNA poderiam ser estocadas em baixas temperaturas por diversos dias antes de seu processamento.

Considerando estes resultados, uma recomendação muito importante é manter as amostras em “RNAlater” até que sejam processadas. Com os métodos atuais disponíveis para a obtenção de miRNAs, a análise deve ser feita imediatamente após a purificação do RNA.

**Discussão do objetivo 2.** *Determinar o perfil de expressão dos miRNAs nas ilhotas*, testando a hipótese de que o tecido exócrino pancreático expressa um grupo de miRNAs diferente daquele expressado pelas células das ilhotas endócrinas.

Com os resultados obtidos nestes experimentos foi feito pela primeira vez uma análise diferencial de expressão de miRNAs no pâncreas. Usando a técnica do microarranjo microfluídico para miRNAs, foi identificado um conjunto de miRNAs “endócrinos”, que têm expressão altamente diferencial nas ilhotas pancreáticas (Tabela 3 e Figura 10), sendo o miR-7, o miR-382 e o miR-127 os mais diferencialmente expressos nas ilhotas. A expressão de alguns destes miRNAs foi validada usando a técnica de quantificação qRT-PCR. As diferenças de expressões obtidas comparando as ilhotas com o tecido acinar mediante a técnica do qRT-PCR foram, em geral, maiores do que os valores obtidos nas hibridações de microarranjos (Tabela 4). A análise de expressão de miRNAs comparando os valores dos mesmos na ilhota e tomando como calibrador o valor obtido para o miR-7 “expressão intra-ilhota” mostra que o miR-7 é 2.5 vezes menos abundante do que o miR-375, que é um miRNA específico da ilhota previamente descrito (13) enquanto que é 10 e 6 vezes mais abundante do que o miR-382 e o miR-127, respectivamente (Figura 11B). Estes dados coincidem com a frequência de clonagem observada por Landgraf e colaboradores para o miR-375 e o miR-7, representando o 8% e o 4.3%,

respectivamente, do número total de clones obtidos das ilhotas pancreáticas (57). Portanto o miR-375 é o miRNA mais abundante na ilhota pancreática mas não é o mais específico de esta estrutura porque é também muito abundante no tecido acinar do pâncreas; enquanto que o miR-7 é o miRNA específico endócrino (tem muita baixa expressão no tecido acinar o exócrino do pâncreas) mais abundante da ilhota. Também tem sido mostrado pelo grupo do Landgraf uma alta frequência de clonagem para o miR-7 na glândula pituitária endócrina. Dessa maneira, a expressão de miR-7 nas ilhotas pancreáticas e na glândula pituitária representam mais do 50% dos clones obtidos para este miRNA nos mais de 26 órgãos analisados (57). Todos esses dados, descritos anteriormente e os nossos resultados indicam que o miR-7 é um miRNA endócrino altamente expressado nas ilhotas pancreáticas.

O miR-7 é conservado na evolução de todos os animais vertebrados (164). O mesmo tem sido identificado previamente nas ilhotas do *Danio rerio* (165), e também tem sido descrito que promove o desenvolvimento de fotorreceptores em *Drosophila melanogaster*. A expressão de miR-7 é ativada nas células assim que as mesmas começam a se diferenciar em fotorreceptores. Isto é dependente dos sinais do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR, do inglês) que provoca a ativação das quinases extracelulares reguladas por sinais (ERK, do inglês) e medeia a degradação do fator de transcrição “Yan”. Yan age como um repressor da diferenciação das células da retina (166-168). Em células não estimuladas, Yan reprime a transcrição do miR-7, enquanto que o miR-7 reprime a expressão da proteína Yan nos fotorreceptores, através da união a seqüências dentro da região 3' UTR do seu mRNA. Tem sido proposta uma retroação negativa recíproca entre o Yan e o miR-7 que assegura a expressão mutuamente exclusiva dos mesmos, com o Yan nas células progenitores e o miR-7 nas células do fotorreceptor. A expressão é invertida quando os sinais do EGFR provocam a degradação transiente do Yan.

Estes dois mecanismos sobrepostos explicam como a atividade de transdução de sinais pode gerar uma mudança estável nos padrões de expressão gênica (169). A expressão do miR-7 foi encontrada também em neurônios que formam os centros neurosecretores do cérebro do anelídeo *Platynereis dumerilii* e do peixe *Danio rerio*, tais como aqueles que expressam o pró-hormônio vasotocine (vasopressine/oxitocine)-neurofisine (170). Além disso, tem sido descrito que o gene que codifica para o miR-7 está altamente expresso na doença das artérias coronárias (CAD, do inglês) em ratos (171). A presença do miR-7 na retina do olho tem sido descrita no rato e no humano também (172).

Estas descobertas tão interessantes motivaram-nos estudar a expressão do miR-7 durante o desenvolvimento pancreático. Como a expressão deste miRNA em ilhotas adultas e em outros tecidos tinha sido confirmada, a nossa hipótese foi que o miR-7 está associado com a manutenção do fenótipo celular. Foi determinado que tanto o miR-7 quanto o miR-375 mostram um aumento dramático de suas expressões durante o desenvolvimento pancreático de camundongos. Não obstante, seus perfis de expressão foram diferentes (Figura 14). Concordante com o que ocorre nas ilhotas maduras, o miR-375 é mais abundante do que o miR-7 em todos os estágios do desenvolvimento pancreático com a exceção do dia e14.5 de idade gestacional, em que a expressão do miR-7 é mais elevada do que a expressão do miR-375. Estes resultados sugerem ações diferentes para estes miRNAs durante a biogênese das células  $\beta$ . Os estudos de expressão do miR-7 no desenvolvimento pancreático foram estendidos a humanos, analisando o padrão de expressão espacio-temporal deste miRNA durante diferentes estágios fetais. A expressão do miR-7 foi apenas detectável entre as semanas 8 a 11 de idade gestacional aumentando dramaticamente após a semana 12, alcançando seu nível máximo em torno da semana 14 e diminuindo até os níveis básicos na semana 22. No pâncreas adulto a expressão de

miR-7 é aproximadamente 200 vezes mais baixa do que na semana 14. Analisando os resultados obtidos mediante a hibridação *in situ*, comprovamos que os níveis de expressão do miR-7 entre as semanas 14 e 17 de idade gestacional parecem similares ainda quando é observado um decremento na sua expressão relativa após a semana 14 usando qRT-PCR. Isto não é muito surpreendente se tomamos em consideração o fato de que a quantidade relativa de tecido pancreático não-endócrino aumenta durante este período, “diluindo” de essa maneira os valores relativos de expressão do miR-7 obtidos nas análises usando qRT-PCR. No pâncreas adulto, a expressão do miR-7 observada utilizando a técnica de hibridação *in situ* pareceu moderadamente mais baixa. Esta redução pode estar relacionada com os problemas conhecidos com a integridade do tecido devido à expressão de enzimas exócrinas, incluindo RNAses, que conduzem à degradação rápida do pâncreas adulto.

Além, foram estudadas as expressões do miR-7 e do miR-375 nas células  $\alpha$  e  $\beta$  da ilhota pancreática através de microscopia de amostras obtidas por microdissecação com laser. Foi encontrado que ambos os miRNAs são expressos tanto nas células  $\alpha$  quanto nas  $\beta$ . Aliás, os dois parecem ser mais abundantes nas células  $\beta$  do que nas células  $\alpha$  (Tabela 5 e Figura 13). Estes dados suportam a hipótese que o miR-7 e o miR-375 têm papéis importantes na função endócrina da ilhota.

O miR-127 é outro miRNA “endócrino” interessante que tem sido estudado anteriormente. O mesmo é expresso geralmente como parte de um conjunto de miRNAs em células normais mas não em células cancerosas, sugerindo que esteja sujeito a um processo de silenciamento epigenético. É interessante que o proto-oncogene BCL6, que é um alvo potencial do miR-127, diminui a sua expressão após o tratamento com drogas modificadoras da cromatina. Estes resultados sugerem que o miR-127 pode agir como um supressor de tumores (173).

**Discussão do objetivo 3.** *Determinar o perfil de miRNAs envolvido no processo inflamatório utilizando modelos de inflamação in vitro e in vivo nas células das ilhotas.*

As citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  são conhecidas por desempenhar um papel importante durante o desenvolvimento de T1D. Neste trabalho foi testada e comprovada a hipótese que a expressão dos miRNAs da ilhota pode ser afetada por estas citocinas pró-inflamatórias. Inicialmente foram avaliados os efeitos do TNF- $\alpha$  na linhagem celular de insulinoma NIT-1. Esta linhagem celular é um modelo substituto aceitável e mais simples de células  $\beta$  primárias. O tratamento com TNF- $\alpha$  pode conduzir à morte celular programada ou à sobrevivência dependendo dos sinais e das vias que sejam ativados (125-127). A via da sobrevivência depende da ativação do NF- $\kappa$ B. As células NIT-1 têm um defeito na ativação do NF- $\kappa$ B que bloqueia a via de sobrevivência tendo por resultado um aumento da susceptibilidade destas células aos efeitos das citocinas (150). Esta característica permite a indução da morte celular usando apenas esta citocina. Foi confirmado que existe um perfil de expressão de miRNAs diferente nas células NIT-1 tratadas com TNF- $\alpha$  (Tabela 7 e 8).

Foi observado que o perfil de miRNAs varia com o tempo de tratamento. Por exemplo, dos miRNAs estudados, o miR-150 teve os níveis de expressão mais elevados e aumentou mais rapidamente, mostrando um padrão de expressão diferente do miR-335 e do miR-451 (Figura 16). Este fato sugere que a expressão dos miRNAs envolvidos na inflamação mediada por citocinas têm diferente cinética de expressão após o tratamento com citocinas *in vitro*.

A continuação, estudamos o efeito de uma mistura de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ) em ilhotas pancreáticas de rato. As ilhotas foram tratadas com essa mistura de citocinas nas concentrações descritas previamente para induzir morte de células  $\beta$  de ilhotas de rato (151). Foi obtido um perfil diferencial de expressão de miRNAs pancreáticos. Em geral, as mudanças

foram significativamente maiores que as obtidas nas células NIT-1. É notável, que o perfil de expressão de miRNAs das células NIT-1 é significativamente diferente do obtido das ilhotas de rato. Este resultado não foi completamente inesperado porque as células NIT-1 são uma linhagem celular de insulinoma com diferenças nos processos moleculares, celulares e nas vias de sinalização e ativação. Têm sido descrito que alguns dos miRNAs estudados nestes experimentos desempenham funções relacionadas com o processo inflamatório e com certas doenças. Por exemplo, o miR-16 foi encontrado significativamente diminuído ou mesmo ausente em 68% de pacientes com leucemia crônica dos linfócitos (CLL, do inglês), sugerindo que este miRNA é antagonico com o desenvolvimento do tumor promovendo apoptose (67). A inibição de sete miRNAs (o miR-1d, o miR-7, o miR-148, o miR-204, o miR-210, o miR-216 e o miR-296) leva ao aumento da atividade da caspase-3 (80). Foi encontrado que 3 deles (o miR-7, o miR-148 e o miR-204) aumentam suas expressões após 6 horas de incubação com  $\text{NF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  e  $\text{IL-1}\beta$ . O miR-29 regula a expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 (leucemia das células mielóides) (174). Esta proteína é um fator importante de sobrevivência para muitos cânceres, sua expressão contribui à quimo-resistência e à reversão da doença (175). Alguns dos miRNAs da família do let-7 tais como o let-7a, o let-7d, o let-7f e o let-7i modulam os sinais de sobrevivência dependentes de interleucina-6 nos colangiócitos malignos humanos através do fator STAT-3 (78). A STAT3 é uma proteína com uma importância crucial como transdutor de sinais e como ativador da transcrição. Ela regula a transcrição de uma variedade de citocinas (176).

O ativador do fator de transcrição “Proteína 1” (AP-1, do inglês) é conhecida como um regulador fundamental de eventos biológicos muito importantes tais como a proliferação celular, a diferenciação, a organogênese, a formação da memória, e a apoptose. A AP-1 é formada pela

dimerização de duas proteínas codificadas por os genes Fos e Jun. Relevante para este trabalho, a análise da seqüência do miR-7b sugeriu uma interação provável com a região 3' UTR do mRNA de Fos. Foi observado que a expressão do miR-7b inibe a tradução de Fos *in vitro* (177).

Foram feitos estudos cinéticos nas ilhotas de rato tratadas com a mistura de citocinas pró-inflamatórias acima mencionadas. Foi encontrado que o perfil de expressão dos miRNAs após 18 horas de tratamento foi muito baixo, enquanto que o perfil de miRNAs obtido após 6 horas foi o contrário. Este resultado implica que as diferenças significativas na expressão dos miRNAs ocorrem durante as primeiras horas após o tratamento; sugerindo que os processos moleculares regulados por estas moléculas ocorrem primeiro do que o começo da morte das células  $\beta$  induzida por citocinas. Este resultado faz emergir os miRNAs como marcadores potenciais precoces de viabilidade da ilhota.

É importante anotar que a maioria dos miRNAs diferencialmente expressos após 6 horas de tratamento com a mistura de citocinas pró-inflamatórias aumentaram. Isso implica que os processos celulares, tais como a maquinaria de transcrição das células das ilhotas, não estão ainda inibidos pelos eventos apoptóticos e necróticos induzidos pela exposição prolongada as citocinas. Estes dados igualmente sugerem que os miRNAs podem estar envolvidos na resposta de sobrevivência das células da ilhota expostas ao dano inflamatório.

Outro fato interessante é que o miR-7 e o miR-375 estão no grupo de miRNAs mais diferencialmente expressos após o tratamento com as citocinas. Isto pode significar que o miR-7 e o miR-375 desempenham um papel importante não apenas durante o processo de desenvolvimento e de manutenção do fenótipo das ilhotas mas também nos sinais de sobrevivência nos primeiros estágios da resposta inflamatória.

É interessante destacar os resultados obtidos através dos microarranjos de miRNAs com sondas LNA e as quantificações usando qRT-PCR. Como tem sido anteriormente indicado, os resultados dos métodos de análise quantitativa de miRNAs podem variar devido às características intrínsecas dos mesmos (178). Na maioria dos casos os valores obtidos com qRT-PCR foram maiores do que aqueles obtidos com os microarranjos. Não obstante, certo número de miRNAs obtidos da lista da análise estatística foi confirmado usando o qRT-PCR e todos foram aumentaram em ambos os tipos de análises.

Como tem sido descrito, o NF- $\kappa$ B tem um papel crucial na resposta mediada por citocinas. Conseqüentemente, estudamos se a expressão de miRNAs depende da ativação do NF- $\kappa$ B. Para isso inibimos a via do NF- $\kappa$ B usando “Bay 11-7082”. Foi encontrado que a inibição da via do NF- $\kappa$ B resultou em uma diminuição da transcrição de miRNAs mediada por citocinas. Foram feitos dois microarranjos: primeiramente compararam-se as ilhotas pré-tratadas com Bay 11-7082 e posteriormente com citocinas com as ilhotas tratadas com apenas as citocinas. Seguidamente, as ilhotas tratadas com as citocinas foram comparadas com as controles não tratadas. O perfil obtido pré-tratando as células com Bay 11-7082 foi inibido parcialmente. Uma possível explicação deste fenômeno é o fato de que o NF- $\kappa$ B não é o único fator envolvido nas vias de sinalização das citocinas que modulam o perfil de expressão particular de miRNAs no pâncreas.

Foram selecionados alguns miRNAs para ser validados usando qRT-PCR, todos eles pertencem ao grupo de miRNAs específicos do pâncreas endócrino mostrados na Tabela 3 (147). Nossos resultados indicam que a expressão de miRNAs depende parcialmente da ativação do NF- $\kappa$ B como é apresentado na Tabela 10 e na Figura 19.

Depois de determinar o perfil específico de miRNAs expresso nas ilhotas pancreáticas tratadas com as citocinas pró-inflamatórias, investigamos o perfil de miRNAs relacionado com a inflamação utilizando um modelo de transplante singênico de ilhotas sob a cápsula renal de rato. A coleta foi feita três dias após o transplante. Este modelo permite estudar o impacto da inflamação nas células da ilhota *in vivo*.

Entre outros, o miR-223 foi aumentado nestes experimentos. Este miRNA é um regulador da proliferação de células progenitoras e da função dos granulócitos (179). Três miRNAs endoteliais foram também aumentados: o miR-19a e o miR-19b que pertencem ao agrupamento miR-17-92 assim como o miR-21. Todos eles têm sido descritos envolvidos no processo de inflamação vascular (180).

Cinquenta e três miRNAs foram aumentados tanto nas ilhotas expostas à mistura de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, como nas ilhotas transplantadas em receptores singênicos.

Notavelmente, nesta lista encontramos o miR-7, o miR-21, o miR-29, o miR-96 e o miR-375 que têm sido descritos desempenhando funções relacionadas com inflamação e doenças. Um estudo recente indica que o miR-7 reprimiu a via das quinases específicas para serina/treonina (AKT, do inglês) através da união a genes alvos reguladores tais como os “substratos do receptor da insulina 1 e 2” (IRS1 e IRS2, do inglês) em glioblastomas (181). Esta observação sustenta a possibilidade de que o miR-7 desempenhe um papel na fisiologia da célula  $\beta$  pancreática. Os genes IRS1 e IRS2 têm funções cruciais na funcionalidade da célula  $\beta$  (182-185). Assim, a ativação do miR-7 em condições inflamatórias pode contribuir à deficiência da função deste tipo de célula inibindo a expressão de IRS-1 e IRS-2.

O miR-21 tem sido descrito como um regulador da formação da lesão da neointima: a diminuição do miR-21 expresso de maneira aberrante diminuiu a formação da neointima na

artéria carotídea de ratos após angioplastia (186). Este é um outro miRNA cuja expressão é elevada nas células endoteliais (187-189).

Os miRNAs da família do miR-29 (a, b e c) estão altamente expressos em ratos Gotto-Kakisaki (GK, do inglês), um modelo de diabetes tipo 2, e o aumento das expressões dos mesmos levam à resistência a insulina nos adipócitos 3T3-L1 (190). O miR-29 tem como um alvo confirmado a proteína anti-apoptótica 1 da leucemia das células mielóides (MCL-1, do inglês). Este miRNA regula a expressão da proteína MCL-1 e a apoptose (174). A MCL-1 é um fator anti-apoptótico importante e sua diminuição é associada com a ativação da via intrínseca de apoptose (191). A MCL-1 é um fator de sobrevivência dos fibroblastos sinoviais na artrite reumatóide inflamatória (192) e sua diminuição é regulada por TNF- $\alpha$  em neutrófilos humanos (174).

O miR-96 leva ao aumento dos níveis de mRNA e de proteína da Granufilina. A mesma é um modulador negativo da exocitose da insulina, e induz a diminuição da expressão de Noc2 que é essencial no regulamento normal da exocitose em células endócrinas e exócrinas (193). Isto resulta na diminuição da capacidade das células MIN6B1 para responder a secretagogos (105).

Finalmente, o miR-375 é conhecido por ter um papel importante na fisiologia da ilhota, como foi discutido antes. Este miRNA controla negativamente a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas mediante a união a miotrofina (Mtpn, do inglês) (13), um gene descrito primeiramente no transporte de vesículas em neurônios. Recentemente, tem sido descrito que a proteína quinase 1 dependente de 3-fosfoinositida (PKD1, do inglês) é um alvo direto do miR-375. Esta é uma proteína quinase da família Akt. Mediante essa união, o miR-375 reduz o nível da PKD1, tendo por resultado a diminuição da ação estimulante da glicose na expressão de gene da insulina (194). É importante também que o regulamento da expressão do miR-375 por a

glicose ocorre igualmente em ilhotas primárias de rato. Finalmente, a expressão do miR-375 foi encontrada diminuída em ilhotas de rato GK diabéticos alimentados.

O segundo modelo *in vivo* foi indução de inflamação por injeção de doses baixas de STZ. Foi observado um aumento nos valores das glicemias dos ratos. Os resultados foram paralelos com os obtidos utilizando o primeiro modelo *in vivo*. Todos os miRNAs relacionados com inflamação analisados aumentaram sua expressão suportando mais uma vez o fato da existência de um perfil específico de miRNAs envolvido com o processo inflamatório.

Para continuar estes estudos no futuro será crítica a manipulação da expressão dos miRNAs nas ilhotas expostas a inflamação. A nossa hipótese é que tanto a diminuição quanto o aumento de miRNAs selecionados induzirá mudanças na expressão dos genes que são importantes para a função das células da ilhota. Assim, estas análises iniciais ajudarão na identificação de genes e/ou vias associados com o processo inflamatório em ilhotas, que são potencialmente regulados por os miRNAs de interesse.

Considerando o anteriormente exposto, decidimos começar estudos funcionais dos miRNAs mais relevantes. A primeira aproximação foi o silenciamento de miRNAs específicos usando oligonucleotídeos morpholinos. Fomos capazes de liberar seletivamente MO específicos no microambiente da ilhota. É importante destacar que os MO podem ser detectados intracelularmente nas células da ilhota, suportando a viabilidade do silenciamento seletivo de miRNAs nas ilhotas *in vivo*. Este enfoque será crucial para as experiências futuras com a finalidade de explicar a função destas moléculas.

*A análise computacional para a predição de genes alvo de miRNAs.*

Foram realizadas análises para a predição de alvos de alguns dos miRNAs obtidos a partir estudo. O miR-7, o miR-141, o miR127 e a família do miR-29 aumentaram suas expressões nas ilhotas comparadas com o tecido acinar pancreático assim como nos modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamação estudados. Para o miR-7 foi encontrada a transferase que liga N-acetilglicosaminas (OGT, do inglês) como alvo putativo usando dois dos algoritmos computacionais utilizados para a predição de alvos de miRNAs; o TargetScan e o PicTar. Esta proteína catalisa a glicosilação de polipeptídios pela adição de N-acetilglicosamina (O-GlcNAc) a resíduos de serina e treonina (195). A adição e a remoção de O-GlcNAc são chaves na remodelação das histonas, na transcrição, na proliferação, na apoptose, etc. Esta via de sinalização responsiva a nutrientes modula também vias celulares muito importantes, incluindo a cascata de sinais da insulina. As alterações no metabolismo de O-GlcNAc estão associadas com várias doenças humanas incluindo o diabetes mellitus (196).

De acordo com o algoritmo miRanda, os membros 1A e 21 da superfamília de receptores do fator de necrose de tumor (TNRSF, do inglês) são potenciais alvos do miR-29, no humano e no rato respectivamente. A proteína codificada pelo gene TNRSF1A é um dos receptores principais para o TNF- $\alpha$ . Este receptor pode ativar o fator de transcrição NF-kB, mediar apoptose, e funcionar como um regulador da inflamação. Para esta família de miRNAs foi identificado também, com um valor elevado da probabilidade de ser alvo, a elastina. A elastina e o colágeno são os componentes fibrosos principais da matriz extracelular (ECM, do inglês). Estas proteínas são responsáveis da solidez, resistência e elasticidade dos tecidos e também promovem o crescimento e a diferenciação das células. Os defeitos na síntese e degradação do colágeno e da elastina contribuem ao desenvolvimento de várias doenças relacionadas com inflamação tal

como o câncer, a artrite, o enfisema e o diabetes (197-199). Em particular, acredita-se que a desregulação da elastina pode contribuir a aterogênese acelerada (200) e a disfunção endotelial associada com o endurecimento arterial nos pacientes com T2D (201,202) assim como a outras complicações vasculares associadas com o diabetes (203-206). O aumento de expressão na ilhota *in vivo* da família do miR-29, observada em nossos experimentos, pode indicar um sinal de inflamação vascular. Além disso, o aumento observado na expressão do miR-29 nas ilhotas expostas a citocinas *in vitro* pode ser indicativo de inflamação endotelial das células da ilhota; embora não possa ser descartada a possibilidade de que o miR-29 pôde ser expresso pelas células das ilhotas endócrinas *per se*.

O antígeno 9 associado com a esperma (SPAG9, do inglês) é um dos alvos putativos do miR-141. Ele foi encontrado usando o algoritmo miRanda. A proteína codificada por este gene liga-se a quinase amino-terminal C-jun, ativando dessa maneira, vias de sinais específicas relacionadas com citocinas (207).

Usando Pictar e miRanda respectivamente, foram encontramos dois alvos interessantes para o miR-127. Eles são: o membro 12 da superfamília do TNF (TNFSF12) e a proteína SOX-13. O TNFSF12 desempenha um papel importante na resposta imune inata e adaptável em mamíferos. A proteína SOX-13 é um auto-antigênico do T1D.

## Conclusões

Com este trabalho nós contribuímos à melhor compreensão da estabilidade dos miRNAs. As observações permitem-nos concluir que a instabilidade dessas moléculas e de seus cDNAs em preparações de RNA é devida aos métodos de preparação do RNA atualmente usados. A reprodutibilidade dos experimentos é afetada se as amostras de RNA são estocadas por períodos de tempo curtos como 3 dias. Este é um assunto crucial para estudos de expressão de miRNAs utilizando microarranjos.

Nosso laboratório é pioneiro em determinar perfis específicos de miRNAs em ilhotas pancreáticas normais assim como em ilhotas expostas a citocinas (diabetogênicas) pró-inflamatórias.

Baseado em nossos resultados foi determinado que o miR-7 é o miRNA específico da ilhota mais abundante e que o miR-375 é mais abundante na ilhota do que o miR-7 mas não tão específico quanto ele porque está altamente expresso também no tecido exócrino do pâncreas. Ambos os miRNAs aumentaram suas expressões durante o desenvolvimento pancreático em camundongos e humanos. Além disso, as expressões dos mesmos também foram aumentadas nas ilhotas tratadas com as citocinas pró-inflamatórias por 6 horas. Isto pode significar que o miR-7 e o miR-375 possivelmente desempenham um papel importante não apenas durante o processo de desenvolvimento e na manutenção do fenótipo da ilhota mas também nos sinais de sobrevivência nos primeiros estágios da resposta inflamatória.

Foi observado que a modulação de perfis de miRNAs depende do tempo de tratamento com a mistura de citocinas. De acordo com nossos dados os miRNAs desempenham um papel importante no início do processo inflamatório e têm expressões muito baixas após tratamentos mais longos, tais como 18 horas. Além disso, a maioria dos miRNAs parecem depender

parcialmente da ativação do NF- $\kappa$ B como foi observado em amostras pré-tratadas com Bay 11-7082, um inibidor da via do NF- $\kappa$ B.

Foi encontrado um subconjunto comum de miRNAs usando modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*. Este subconjunto pôde estar associado com o mecanismo molecular básico intrínseco que determina a inflamação, processo que desempenha um papel crítico na destruição das ilhotas no estágio inicial do T1D.

O seguimento das pesquisas nesta área pode levar à identificação de genes alvos com valor potencial terapêutico, diagnóstico e prognóstico.

## Perspetivas do estudo

A inflamação da ilhota está emergindo como um denominador comum de múltiplas condições fisiopatológicas que podem afetar a funcionalidade e a massa das células  $\beta$  pancreáticas. A melhor compreensão dos mecanismos que são base na resposta das células da ilhota à inflamação pode ser de ajuda para desenvolver terapias mais eficientes para preservar a função e a massa das células  $\beta$  em transplantes e na prevenção do diabetes. Com o desenvolvimento recente de novas tecnologias analíticas moleculares tornou-se possível estudar o regulamento de marcadores moleculares sob condições tanto fisiológicas como patológicas, tais como os miRNAs, e os efeitos da sua modulação na expressão gênica, na transdução de sinais e nos parâmetros funcionais.

Nossa aproximação experimental para o futuro incluirá a modulação de miRNAs e seus alvos mais importantes em ilhotas *in vitro* e *in vivo* para determinar seu impacto na expressão gênica, na transdução de sinais, nos mediadores de inflamação e na função da ilhota.

Foram identificados 53 miRNAs que são regulados em modelos de inflamação das ilhotas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Para começar investigar o papel destes miRNAs na resposta à inflamação nas ilhotas, nós planejamos focalizar-nos primeiramente no miR-7, no miR-29, no miR-21, no miR-96 e no miR-375, baseados em todos os resultados discutidos anteriormente. Para isso começaremos manipular a expressão destes miRNAs, silenciando-os ou sobre-expressando-os, e depois identificar os genes regulados potencialmente por eles usando microarranjos de genes.

Nós estamos confiáveis de que os estudos propostos serão de ajuda para a melhor compreensão do papel de miRNAs específicos no processo inflamatório em ilhotas e na descoberta de mecanismos moleculares novos que levam à disfunção das células da ilhota e ao diabetes.

## Referencias

1. **Ambros, V.** 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107:823-826.
2. **Pasquinelli, A.E.** 2002. MicroRNAs: deviants no longer. *Trends Genet* 18:171-173.
3. **Pasquinelli, A.E., S. Hunter and J. Bracht.** 2005. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev* 15:200-205.
4. **Bartel, D.P.** 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
5. **Griffiths-Jones, S., R.J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A.J. Enright.** 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140-144.
6. **Griffiths-Jones, S.** 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109-111.
7. **Ambros, V., B. Bartel, D.P. Bartel, C.B. Burge, J.C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S.R. Eddy, et al.** 2003. A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9:277-279.
8. **Hsu, P.W., H.D. Huang, S.D. Hsu, L.Z. Lin, A.P. Tsou, C.P. Tseng, P.F. Stadler, S. Washietl, et al.** 2006. miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res* 34:D135-139.
9. **Lewis, B.P., C.B. Burge and D.P. Bartel.** 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
10. **Xie, X., J. Lu, E.J. Kulbokas, T.R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E.S. Lander and M. Kellis.** 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434:338-345.
11. **Lewis, B.P., I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel and C.B. Burge.** 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-798.
12. **Kim, V.N. and J.W. Nam.** 2006. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22:165-173.
13. **Poy, M.N., L. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P.E. Macdonald, S. Pfeffer, T. Tuschl, et al.** 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432:226-230.
14. **Poy, M.N., M. Spranger and M. Stoffel.** 2007. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2:67-73.
15. **Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, et al.** 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419.

16. **Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg and U. Kutay.** 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303:95-98.
17. **Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara and B.R. Cullen.** 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016.
18. **Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond and G.J. Hannon.** 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
19. **Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach and G.J. Hannon.** 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.
20. **Elbashir, S.M., W. Lendeckel and T. Tuschl.** 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
21. **Diederichs, S. and D.A. Haber.** 2007. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131:1097-1108.
22. **Song, J.J., S.K. Smith, G.J. Hannon and L. Joshua-Tor.** 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434-1437.
23. **Liu, J., M.A. Carmell, F.V. Rivas, C.G. Marsden, J.M. Thomson, J.J. Song, S.M. Hammond, L. Joshua-Tor, et al.** 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441.
24. **Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl.** 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-197.
25. **Rand, T.A., K. Ginalski, N.V. Grishin and X. Wang.** 2004. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14385-14389.
26. **Rivas, F.V., N.H. Tolia, J.J. Song, J.P. Aragon, J. Liu, G.J. Hannon and L. Joshua-Tor.** 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12:340-349.
27. **Lai, E.C.** 2002. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30:363-364.
28. **Doench, J.G., C.P. Petersen and P.A. Sharp.** 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17:438-442.

29. **Hutvagner, G., J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P.D. Zamore.** 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838.
30. **Petersen, C.P., M.E. Bordeleau, J. Pelletier and P.A. Sharp.** 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21:533-542.
31. **Wienholds, E. and R.H. Plasterk.** 2005. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579:5911-5922.
32. **Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz and G. Ruvkun.** 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906.
33. **Valoczi, A., C. Hornyik, N. Varga, J. Burgyan, S. Kauppinen and Z. Havelda.** 2004. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 32:e175.
34. **Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein and D.P. Bartel.** 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.
35. **Chen, C., D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, et al.** 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179.
36. **Schmittgen, T.D., J. Jiang, Q. Liu and L. Yang.** 2004. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res* 32:e43.
37. **Cummins, J.M., Y. He, R.J. Leary, R. Pagliarini, L.A. Diaz, Jr., T. Sjoblom, O. Barad, Z. Bentwich, et al.** 2006. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3687-3692.
38. **Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, et al.** 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.
39. **Jay, C., J. Nemunaitis, P. Chen, P. Fulgham and A.W. Tong.** 2007. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. *DNA Cell Biol* 26:293-300.
40. **Cummins, J.M. and V.E. Velculescu.** 2006. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 25:6220-6227.

41. **Davison, T.S., C.D. Johnson and B.F. Andruss.** 2006. Analyzing micro-RNA expression using microarrays. *Methods Enzymol* 411:14-34.
42. **Barad, O., E. Meiri, A. Avniel, R. Aharonov, A. Barzilai, I. Bentwich, U. Einav, S. Gilad, et al.** 2004. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 14:2486-2494.
43. **Calin, G.A. and C.M. Croce.** 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857-866.
44. **Bushati, N. and S.M. Cohen.** 2007. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205.
45. **Yin, J.Q. and R.C. Zhao.** 2007. Identifying expression of new small RNAs by microarrays. *Methods* 43:123-130.
46. **Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish and D.P. Bartel.** 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303:83-86.
47. **Chen, C.Z. and H.F. Lodish.** 2005. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol* 17:155-165.
48. **Chen, J.F., E.M. Mandel, J.M. Thomson, Q. Wu, T.E. Callis, S.M. Hammond, F.L. Conlon and D.Z. Wang.** 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38:228-233.
49. **Esau, C., X. Kang, E. Peralta, E. Hanson, E.G. Marcusson, L.V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, et al.** 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:52361-52365.
50. **Chang, J., E. Nicolas, D. Marks, C. Sander, A. Lerro, M.A. Buendia, C. Xu, W.S. Mason, et al.** 2004. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 1:106-113.
51. **van Rooij, E., L.B. Sutherland, X. Qi, J.A. Richardson, J. Hill and E.N. Olson.** 2007. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316:575-579.
52. **Krichevsky, A.M., K.S. King, C.P. Donahue, K. Khrapko and K.S. Kosik.** 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna* 9:1274-1281.

53. **Suh, M.R., Y. Lee, J.Y. Kim, S.K. Kim, S.H. Moon, J.Y. Lee, K.Y. Cha, H.M. Chung, et al.** 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270:488-498.
54. **Garzon, R., F. Pichiorri, T. Palumbo, R. Iuliano, A. Cimmino, R. Aqeilan, S. Volinia, D. Bhatt, et al.** 2006. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5078-5083.
55. **Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel and T. Tuschl.** 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735-739.
56. **Monticelli, S., K.M. Ansel, C. Xiao, N.D. Socci, A.M. Krichevsky, T.H. Thai, N. Rajewsky, D.S. Marks, et al.** 2005. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 6:R71.
57. **Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, et al.** 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401-1414.
58. **Jin, P., R.S. Alisch and S.T. Warren.** 2004. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 6:1048-1053.
59. **Ramkissoon, S.H., L.A. Mainwaring, Y. Ogasawara, K. Keyvanfar, J.P. McCoy, Jr., E.M. Sloand, S. Kajigaya and N.S. Young.** 2006. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 30:643-647.
60. **Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack.** 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-269.
61. **Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, et al.** 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2257-2261.
62. **Ruvkun, G.** 2006. Clarifications on miRNA and cancer. *Science* 311:36-37.
63. **Hede, K.** 2005. Studies define role of microRNA in cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:1114-1115.
64. **Michael, M.Z., O.C. SM, N.G. van Holst Pellekaan, G.P. Young and R.J. James.** 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1:882-891.
65. **Voorhoeve, P.M., C. le Sage, M. Schrier, A.J. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y.P. Liu, J. van Duijse, et al.** 2006. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124:1169-1181.

66. **Voorhoeve, P.M., C. le Sage, M. Schrier, A.J. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y.P. Liu, J. van Duijse, et al.** 2007. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv Exp Med Biol* 604:17-46.
67. **Cimmino, A., G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik, R.I. Aqeilan, et al.** 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13944-13949.
68. **Calin, G.A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S.E. Wojcik, M.V. Iorio, R. Visone, et al.** 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793-1801.
69. **Fontana, L., E. Pelosi, P. Greco, S. Racanicchi, U. Testa, F. Liuzzi, C.M. Croce, E. Brunetti, et al.** 2007. MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* 9:775-787.
70. **Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R.M. Stephens, A. Okamoto, et al.** 2006. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9:189-198.
71. **Murakami, Y., T. Yasuda, K. Saigo, T. Urashima, H. Toyoda, T. Okanoue and K. Shimotohno.** 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25:2537-2545.
72. **Taganov, K.D., M.P. Boldin and D. Baltimore.** 2007. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26:133-137.
73. **Perwez Hussain, S. and C.C. Harris.** 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 121:2373-2380.
74. **Taganov, K.D., M.P. Boldin, K.J. Chang and D. Baltimore.** 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12481-12486.
75. **O'Connell, R.M., K.D. Taganov, M.P. Boldin, G. Cheng and D. Baltimore.** 2007. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1604-1609.
76. **Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, S. van Dongen, R.J. Grocock, et al.** 2007. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316:608-611.

77. **Thai, T.H., D.P. Calado, S. Casola, K.M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, et al.** 2007. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316:604-608.
78. **Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, H. Smith, Y. Ueno and T. Patel.** 2007. The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem* 282:8256-8264.
79. **Chan, J.A., A.M. Krichevsky and K.S. Kosik.** 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65:6029-6033.
80. **Cheng, A.M., M.W. Byrom, J. Shelton and L.P. Ford.** 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33:1290-1297.
81. **Harris, A.L.** 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.
82. **Bacon, A.L. and A.L. Harris.** 2004. Hypoxia-inducible factors and hypoxic cell death in tumour physiology. *Ann Med* 36:530-539.
83. **Gruber, M. and M.C. Simon.** 2006. Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 13:169-174.
84. **Kim, J.W., I. Tchernyshyov, G.L. Semenza and C.V. Dang.** 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3:177-185.
85. **Koumenis, C.** 2006. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Curr Mol Med* 6:55-69.
86. **Gordan, J.D. and M.C. Simon.** 2007. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17:71-77.
87. **Kulshreshtha, R., R.V. Davuluri, G.A. Calin and M. Ivan.** 2008. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* 15:667-671.
88. **Kulshreshtha, R., M. Ferracin, S.E. Wojcik, R. Garzon, H. Alder, F.J. Agosto-Perez, R. Davuluri, C.G. Liu, et al.** 2007. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 27:1859-1867.
89. **Hua, Z., Q. Lv, W. Ye, C.K. Wong, G. Cai, D. Gu, Y. Ji, C. Zhao, et al.** 2006. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS ONE* 1:e116.

90. **Hebert, C., K. Norris, M.A. Scheper, N. Nikitakis and J.J. Sauk.** 2007. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 6:5.
91. **Donker, R.B., J.F. Mouillet, D.M. Nelson and Y. Sadovsky.** 2007. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol Hum Reprod* 13:273-279.
92. **Kulshreshtha, R., M. Ferracin, M. Negrini, G.A. Calin, R.V. Davuluri and M. Ivan.** 2007. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. *Cell Cycle* 6:1426-1431.
93. **He, L., X. He, L.P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, et al.** 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447:1130-1134.
94. **Kluiver, J., A. van den Berg, D. de Jong, T. Blokzijl, G. Harms, E. Bouwman, S. Jacobs, S. Poppema, et al.** 2007. Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma. *Oncogene* 26:3769-3776.
95. **Baroukh, N., M.A. Ravier, M.K. Loder, E.V. Hill, A. Bounacer, R. Scharfmann, G.A. Rutter and E. Van Obberghen.** 2007. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 282:19575-19588.
96. **Heremans, Y., M. Van De Castele, P. in't Veld, G. Gradwohl, P. Serup, O. Madsen, D. Pipeleers and H. Heimberg.** 2002. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol* 159:303-312.
97. **Jenny, M., C. Uhl, C. Roche, I. Duluc, V. Guillermin, F. Guillemot, J. Jensen, M. Kedinger, et al.** 2002. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo J* 21:6338-6347.
98. **Treff, N.R., R.K. Vincent, M.L. Budde, V.L. Browning, J.F. Magliocca, V. Kapur and J.S. Odorico.** 2006. Differentiation of embryonic stem cells conditionally expressing neurogenin 3. *Stem Cells* 24:2529-2537.
99. **Yatoh, S., T. Akashi, P.P. Chan, H. Kaneto, A. Sharma, S. Bonner-Weir and G.C. Weir.** 2007. NeuroD and reaggregation induce beta-cell specific gene expression in cultured hepatocytes. *Diabetes Metab Res Rev* 23:239-249.
100. **Kaneto, H., Y. Nakatani, T. Miyatsuka, T.A. Matsuoka, M. Matsuhisa, M. Hori and Y. Yamasaki.** 2005. PDX-1/VP16 fusion protein, together with NeuroD or Ngn3, markedly induces insulin gene transcription and ameliorates glucose tolerance. *Diabetes* 54:1009-1022.

101. **Baeyens, L., S. Bonne, M.S. German, P. Ravassard, H. Heimberg and L. Bouwens.** 2006. Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. *Cell Death Differ* 13:1892-1899.
102. **Fukuda, A., Y. Kawaguchi, K. Furuyama, S. Kodama, M. Horiguchi, T. Kuhara, M. Koizumi, D.F. Boyer, et al.** 2006. Ectopic pancreas formation in Hes1 -knockout mice reveals plasticity of endodermal progenitors of the gut, bile duct, and pancreas. *J Clin Invest* 116:1484-1493.
103. **Kloosterman, W.P., A.K. Lagendijk, R.F. Ketting, J.D. Moulton and R.H. Plasterk.** 2007. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 5:e203.
104. **Plaisance, V., A. Abderrahmani, V. Perret-Menoud, P. Jacquemin, F. Lemaigre and R. Regazzi.** 2006. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 281:26932-26942.
105. **Lovis, P., S. Gattesco and R. Regazzi.** 2008. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol Chem* 389:305-312.
106. **Bloomston, M., W.L. Frankel, F. Petrocca, S. Volinia, H. Alder, J.P. Hagan, C.G. Liu, D. Bhatt, et al.** 2007. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama* 297:1901-1908.
107. **LeRoith, D.** 2004. *Diabetes Mellitus A fundamental and clinical text.* Lippincott Williams and Wilkins.
108. **LaPorte, R.E.** 1995. *Diabetes in America.* NIH.
109. **Rabinovitch, A.** 1998. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 14:129-151.
110. **Rabinovitch, A. and W.L. Suarez-Pinzon.** 1998. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55:1139-1149.
111. **Rabinovitch, A.** 2003. Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes. *Adv Exp Med Biol* 520:159-193.
112. **Hostens, K., D. Pavlovic, Y. Zambre, Z. Ling, C. Van Schravendijk, D.L. Eizirik and D.G. Pipeleers.** 1999. Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. *J Clin Invest* 104:67-72.

113. **Eizirik, D.L. and T. Mandrup-Poulsen.** 2001. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133.
114. **Sjoholm, A.** 1998. Aspects of the involvement of interleukin-1 and nitric oxide in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell Death Differ* 5:461-468.
115. **Hugues, S., E. Mougneau, W. Ferlin, D. Jeske, P. Hofman, D. Homann, L. Beaudoin, C. Schrike, et al.** 2002. Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity* 16:169-181.
116. **Hui, H., F. Dotta, U. Di Mario and R. Perfetti.** 2004. Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol* 200:177-200.
117. **Haller, M.J. and D.A. Schatz.** 2008. Cytokines and type 1 diabetes complications: casual or causal association? *Pediatr Diabetes* 9:1-2.
118. **Trincavelli, M.L., L. Marselli, A. Falleni, V. Gremigni, E. Ragge, F. Dotta, C. Santangelo, P. Marchetti, et al.** 2002. Upregulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by cytokine-induced damage of human pancreatic islets. *J Cell Biochem* 84:636-644.
119. **Darville, M.I. and D.L. Eizirik.** 1998. Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* 41:1101-1108.
120. **Kutlu, B., A.K. Cardozo, M.I. Darville, M. Kruhoffer, N. Magnusson, T. Orntoft and D.L. Eizirik.** 2003. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Diabetes* 52:2701-2719.
121. **Abbas, A.** 2004. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* Saunders.
122. **Vaux, D.L. and A. Strasser.** 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2239-2244.
123. **Wallach, D., E.E. Varfolomeev, N.L. Malinin, Y.V. Goltsev, A.V. Kovalenko and M.P. Boldin.** 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17:331-367.
124. **Thome, M. and J. Tschopp.** 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1:50-58.
125. **Aggarwal, B.B.** 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3:745-756.
126. **Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.

127. **Papa, S., F. Zazzeroni, C.G. Pham, C. Bubici and G. Franzoso.** 2004. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* *117*:5197-5208.
128. **Chen, G., H.E. Hohmeier and C.B. Newgard.** 2001. Expression of the transcription factor STAT-1 alpha in insulinoma cells protects against cytotoxic effects of multiple cytokines. *J Biol Chem* *276*:766-772.
129. **Rasschaert, J., D. Liu, B. Kutlu, A.K. Cardozo, M. Kruhoffer, O.R. TF and D.L. Eizirik.** 2003. Global profiling of double stranded RNA- and IFN-gamma-induced genes in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* *46*:1641-1657.
130. **Cardozo, A.K., H. Heimberg, Y. Heremans, R. Leeman, B. Kutlu, M. Kruhoffer, T. Orntoft and D.L. Eizirik.** 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* *276*:48879-48886.
131. **Cardozo, A.K., M. Kruhoffer, R. Leeman, T. Orntoft and D.L. Eizirik.** 2001. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes* *50*:909-920.
132. **Eizirik, D.L., B. Kutlu, J. Rasschaert, M. Darville and A.K. Cardozo.** 2003. Use of microarray analysis to unveil transcription factor and gene networks contributing to Beta cell dysfunction and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* *1005*:55-74.
133. **Cnop, M., N. Welsh, J.C. Jonas, A. Jorns, S. Lenzen and D.L. Eizirik.** 2005. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* *54 Suppl 2*:S97-107.
134. **Molano, R.D., T. Berney, H. Li, P. Cattan, A. Pileggi, C. Vizzardelli, N.S. Kenyon, C. Ricordi, et al.** 2001. Prolonged islet graft survival in NOD mice by blockade of the CD40-CD154 pathway of T-cell costimulation. *Diabetes* *50*:270-276.
135. **Molano, R.D., A. Pileggi, T. Berney, R. Poggioli, E. Zahr, R. Oliver, C. Ricordi, D.M. Rothstein, et al.** 2003. Prolonged islet allograft survival in diabetic NOD mice by targeting CD45RB and CD154. *Diabetes* *52*:957-964.
136. **Gittes, G.** 1993. A culture system for the study of pancreatic organogenesis. *J. Tiss. Cult. Meth* *15*:23-28.
137. **Bolstad, B.M., R.A. Irizarry, M. Astrand and T.P. Speed.** 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* *19*:185-193.

138. **Castoldi, M., S. Schmidt, V. Benes, M. Noerholm, A.E. Kulozik, M.W. Hentze and M.U. Muckenthaler.** 2006. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *Rna* 12:913-920.
139. **Tusher, V.G., R. Tibshirani and G. Chu.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116-5121.
140. **Graeme, I.** 2004. Laser Capture Microdissection: Methods and Protocols.
141. **Obernosterer, G., J. Martinez and M. Alenius.** 2007. Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc* 2:1508-1514.
142. **Makunin, I.V., M. Pheasant, C. Simons and J.S. Mattick.** 2007. Orthologous microRNA genes are located in cancer-associated genomic regions in human and mouse. *PLoS ONE* 2:e1133.
143. **Fukuda, K., G.H. Tesch, F.Y. Yap, J.M. Forbes, R.A. Flavell, R.J. Davis and D.J. Nikolic-Paterson.** 2008. MKK3 signalling plays an essential role in leukocyte-mediated pancreatic injury in the multiple low-dose streptozotocin model. *Lab Invest* 88:398-407.
144. **Shingara, J., K. Keiger, J. Shelton, W. Laosinchai-Wolf, P. Powers, R. Conrad, D. Brown and E. Labourier.** 2005. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *Rna* 11:1461-1470.
145. **Takada, S., E. Berezikov, Y. Yamashita, M. Lagos-Quintana, W.P. Kloosterman, M. Enomoto, H. Hatanaka, S. Fujiwara, et al.** 2006. Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res* 34:e115.
146. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
147. **Bravo-Egana, V., S. Rosero, R.D. Molano, A. Pileggi, C. Ricordi, J. Dominguez-Bendala and R.L. Pastori.** 2008. Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 366:922-926.
148. **Petersen, M., C.B. Nielsen, K.E. Nielsen, G.A. Jensen, K. Bondensgaard, S.K. Singh, V.K. Rajwanshi, A.A. Koshkin, et al.** 2000. The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit* 13:44-53.

149. **Kloosterman, W.P., E. Wienholds, E. de Bruijn, S. Kauppinen and R.H. Plasterk.** 2006. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 3:27-29.
150. **Thomas, H.E., E. Angstetra, R.V. Fernandes, L. Mariana, W. Irawaty, E.L. Jamieson, N.L. Dudek and T.W. Kay.** 2006. Perturbations in nuclear factor-kappaB or c-Jun N-terminal kinase pathways in pancreatic beta cells confer susceptibility to cytokine-induced cell death. *Immunol Cell Biol* 84:20-27.
151. **Cetkovic-Cvrlje, M. and D.L. Eizirik.** 1994. TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6:399-406.
152. **Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown and D. Botstein.** 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14863-14868.
153. **Brandhorst, D., H. Brandhorst, A. Zvolinski, F. Nahidi and R.G. Bretzel.** 2002. High-dosed nicotinamide decreases early graft failure after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation* 73:74-79.
154. **Contreras, J.L., C.A. Smyth, G. Bilbao, C.J. Young, J.A. Thompson and D.E. Eckhoff.** 2002. 17beta-Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. *Transplantation* 74:1252-1259.
155. **Gysemans, C., K. Stoffels, A. Giulietti, L. Overbergh, M. Waer, M. Lannoo, U. Feige and C. Mathieu.** 2003. Prevention of primary non-function of islet xenografts in autoimmune diabetic NOD mice by anti-inflammatory agents. *Diabetologia* 46:1115-1123.
156. **Johansson, U., A. Olsson, S. Gabrielsson, B. Nilsson and O. Korsgren.** 2003. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 308:474-479.
157. **Barshes, N.R., S. Wyllie and J.A. Goss.** 2005. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 77:587-597.
158. **Laybutt, D.R., Y.C. Hawkins, J. Lock, J. Lebet, A. Sharma, S. Bonner-Weir and G.C. Weir.** 2007. Influence of diabetes on the loss of beta cell differentiation after islet transplantation in rats. *Diabetologia* 50:2117-2125.

159. **Kolb, H., V. Burkart, B. Appels, H. Hanenberg, G. Kantwerk-Funke, U. Kiesel, J. Funda, U. Schraermeyer, et al.** 1990. Essential contribution of macrophages to islet cell destruction in vivo and in vitro. *J Autoimmun* 3 *Suppl 1*:117-120.
160. **Yang, Z., M. Chen, L.B. Fialkow, J.D. Ellett, R. Wu and J.L. Nadler.** 2003. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Pancreas* 26:e99-104.
161. **Anjaneyulu, M. and P. Ramarao.** 2003. Protective effect of pioglitazone against multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25:205-208.
162. **Dufrane, D., M. van Steenberghe, Y. Guiot, R.M. Goebbels, A. Saliez and P. Gianello.** 2006. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* 81:36-45.
163. **Wilkening, S. and A. Bader.** 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model. *J Biomol Tech* 15:107-111.
164. **Lynn, F.C., P. Skewes-Cox, Y. Kosaka, M.T. McManus, B.D. Harfe and M.S. German.** 2007. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 56:2938-2945.
165. **Wienholds, E., W.P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. de Bruijn, H.R. Horvitz, S. Kauppinen, et al.** 2005. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309:310-311.
166. **Flores, G.V., H. Duan, H. Yan, R. Nagaraj, W. Fu, Y. Zou, M. Noll and U. Banerjee.** 2000. Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell* 103:75-85.
167. **O'Neill, E.M., I. Rebay, R. Tjian and G.M. Rubin.** 1994. The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78:137-147.
168. **Xu, C., R.C. Kauffmann, J. Zhang, S. Kladny and R.W. Carthew.** 2000. Overlapping activators and repressors delimit transcriptional response to receptor tyrosine kinase signals in the *Drosophila* eye. *Cell* 103:87-97.
169. **Li, X. and R.W. Carthew.** 2005. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 123:1267-1277.

170. **Tessmar-Raible, K., F. Raible, F. Christodoulou, K. Guy, M. Rembold, H. Hausen and D. Arendt.** 2007. Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129:1389-1400.
171. **Archacki, S.R., G. Angheloiu, X.L. Tian, F.L. Tan, N. DiPaola, G.Q. Shen, C. Moravec, S. Ellis, et al.** 2003. Identification of new genes differentially expressed in coronary artery disease by expression profiling. *Physiol Genomics* 15:65-74.
172. **Arora, A., G.J. McKay and D.A. Simpson.** 2007. Prediction and verification of miRNA expression in human and rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3962-3967.
173. **Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman, J.C. Chuang, G.A. Coetzee and P.A. Jones.** 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9:435-443.
174. **Mott, J.L., S. Kobayashi, S.F. Bronk and G.J. Gores.** 2007. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26:6133-6140.
175. **Chen, L., S.N. Willis, A. Wei, B.J. Smith, J.I. Fletcher, M.G. Hinds, P.M. Colman, C.L. Day, et al.** 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393-403.
176. **Davoodi-Semiromi, A., M. Laloraya, G.P. Kumar, S. Purohit, R.K. Jha and J.X. She.** 2004. A mutant Stat5b with weaker DNA binding affinity defines a key defective pathway in nonobese diabetic mice. *J Biol Chem* 279:11553-11561.
177. **Lee, H.J., M. Palkovits and W.S. Young, 3rd.** 2006. miR-7b, a microRNA up-regulated in the hypothalamus after chronic hyperosmolar stimulation, inhibits Fos translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15669-15674.
178. **Bravo, V., S. Rosero, C. Ricordi and R.L. Pastori.** 2007. Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 353:1052-1055.
179. **Johnnidis, J.B., M.H. Harris, R.T. Wheeler, S. Stehling-Sun, M.H. Lam, O. Kirak, T.R. Brummelkamp, M.D. Fleming, et al.** 2008. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 451:1125-1129.
180. **Urbich, C., A. Kuehbacher and S. Dimmeler.** 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79:581-588.

181. **Kefas, B., J. Godlewski, L. Comeau, Y. Li, R. Abounader, M. Hawkinson, J. Lee, H. Fine, et al.** 2008. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 68:3566-3572.
182. **Kitamura, T., C.R. Kahn and D. Accili.** 2003. Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol* 65:313-332.
183. **Kulkarni, R.N., J.C. Bruning, J.N. Winnay, C. Postic, M.A. Magnuson and C.R. Kahn.** 1999. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96:329-339.
184. **Kulkarni, R.N., J.N. Winnay, M. Daniels, J.C. Bruning, S.N. Flier, D. Hanahan and C.R. Kahn.** 1999. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J Clin Invest* 104:R69-75.
185. **Kubota, N., Y. Terauchi, K. Tobe, W. Yano, R. Suzuki, K. Ueki, I. Takamoto, H. Satoh, et al.** 2004. Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J Clin Invest* 114:917-927.
186. **Ji, R., Y. Cheng, J. Yue, J. Yang, X. Liu, H. Chen, D.B. Dean and C. Zhang.** 2007. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 100:1579-1588.
187. **Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J.S. Pober and W.C. Sessa.** 2007. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100:1164-1173.
188. **Kuehbacher, A., C. Urbich, A.M. Zeiher and S. Dimmeler.** 2007. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101:59-68.
189. **Poliseno, L., A. Tuccoli, L. Mariani, M. Evangelista, L. Citti, K. Woods, A. Mercatanti, S. Hammond, et al.** 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108:3068-3071.
190. **He, A., L. Zhu, N. Gupta, Y. Chang and F. Fang.** 2007. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 21:2785-2794.
191. **Thyrell, L., V. Arulampalam, L. Hjortsberg, M. Farnebo, D. Grander and K. Pokrovskaja Tamm.** 2007. Interferon alpha induces cell death through interference with interleukin 6 signaling and inhibition of STAT3 activity. *Exp Cell Res* 313:4015-4024.

192. **Liu, H., P. Eksarko, V. Temkin, G.K. Haines, 3rd, H. Perlman, A.E. Koch, B. Thimmapaya and R.M. Pope.** 2005. Mcl-1 is essential for the survival of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol* *175*:8337-8345.
193. **Gomi, H., S. Mizutani, K. Kasai, S. Itohara and T. Izumi.** 2005. Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol* *171*:99-109.
194. **El Ouaamari, A., N. Baroukh, G.A. Martens, P. Lebrun, D. Pipeleers and E. van Obberghen.** 2008. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes* *57*:2708-2717.
195. **Konrad, R.J. and J.E. Kudlow.** 2002. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med* *10*:535-539.
196. **Love, D.C. and J.A. Hanover.** 2005. The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* *2005*:re13.
197. **Flannery, C.R.** 2006. MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front Biosci* *11*:544-569.
198. **Doring, G.** 1994. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* *150*:S114-117.
199. **Plantier, L., C. Rochette-Egly, D. Goven, A. Boutten, M. Bonay, G. Leseche, M. Fournier, B. Crestani, et al.** 2008. Dysregulation of elastin expression by fibroblasts in pulmonary emphysema : Role of Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2. *Thorax*.
200. **McDonald, T.O., R.G. Gerrity, C. Jen, H.J. Chen, K. Wark, T.N. Wight, A. Chait and K.D. O'Brien.** 2007. Diabetes and arterial extracellular matrix changes in a porcine model of atherosclerosis. *J Histochem Cytochem* *55*:1149-1157.
201. **Diez, J.** 2007. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol* *44*:76-95.
202. **Winer, N. and J.R. Sowers.** 2007. Diabetes and arterial stiffening. *Adv Cardiol* *44*:245-251.
203. **Nicoloff, G., C. Petrova, P. Christova and A. Nikolov.** 2007. Detection of free elastin-derived peptides among diabetic children. *Atherosclerosis* *192*:342-347.
204. **Tanno, T., K. Yoshinaga and T. Sato.** 1993. Alteration of elastin in aorta from diabetics. *Atherosclerosis* *101*:129-134.
205. **Sullivan, C.J., T.H. Teal, I.P. Luttrell, K.B. Tran, M.A. Peters and H. Wessells.** 2005. Microarray analysis reveals novel gene expression changes associated with erectile dysfunction in diabetic rats. *Physiol Genomics* *23*:192-205.

206. **Luttrell, I.P., M. Swee, B. Starcher, W.C. Parks and K. Chitale.** 2008. Erectile dysfunction in the type II diabetic db/db mouse: impaired venoocclusion with altered cavernosal vasoreactivity and matrix. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2204-2211.
207. **Lee, C.M., D. Onesime, C.D. Reddy, N. Dhanasekaran and E.P. Reddy.** 2002. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14189-14194.

## **Appendice**

### **Appendice 1.**

**Bravo V**<sup>1</sup>, Rosero S<sup>1</sup>, Ricordi C, Pastori RL. Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;353:1052–1055.

### **Appendice 2.**

**Bravo-Egana V**<sup>1</sup>, Rosero S<sup>1</sup>, Molano RD, Pileggi A, Ricordi C, Domínguez-Bendala J, Pastori RL. Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366: 922–926.

### **Appendice 3.**

Correa-Medina M, **Bravo-Egana V**, Rosero S, Ricordi C, Edlund H, Diez J, Pastori R.L. MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas, *Gene Expression Patterns* (2008), doi: [10.1016/j.gep.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.12.003).

## Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations

Valia Bravo<sup>1</sup>, Samuel Rosero<sup>1</sup>, Camillo Ricordi, Ricardo L. Pastori\*

*Diabetes Research Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine, 1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA*

Received 12 December 2006

Available online 27 December 2006

### Abstract

Micro RNAs (miRNAs) are small RNA molecules, which function as important regulators of gene expression. We found that RNA preparation methods commonly utilized for miRNA expression studies yield highly unstable miRNAs. We studied the stability of four miRNAs belonging to different miRNAs families. A significant degradation of these molecules may be observed already three days after RNA isolation. Moreover, the respective cDNAs are highly unstable as well. Our findings indicate that instability of miRNAs and their cDNAs should be considered when designing miRNA expression studies.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

*Keywords:* MicroRNA isolation; MicroRNA stability; Quantification of microRNAs; MiRNA cDNA stability

Recent advances in the identification and characterization of non-coding small RNA molecules are unveiling a whole new level of gene expression regulation mediated by miRNAs [1–3]. miRNAs are non-coding gene products small RNAs (~19–22 nt) that play a key role in post-transcriptional regulation by inhibiting gene expression through selective binding to complementary messenger RNA sequences [4]. As reviewed [1,5–8], miRNAs are transcribed by the RNA polymerase II (Pol-II) into primary miRNAs which are cleaved in the nucleus by RNase III endonuclease Droscha, releasing a ~60–70 nt stem loop pre-miRNA precursor. The pre-miRNA is actively transported to the cytoplasm by export receptor exportin-5 where it is processed by the enzyme Dicer yielding a ~19–22 nt double-stranded RNA cleavage product. Following denaturation by the action of helicases, the active, single-stranded miRNA is loaded in a ribonucleoprotein complex known as RISC (RNA-induced silencing complex), which will guide the particular miRNA to its messenger RNA target. Pairing usually occurs at the 3'-UTR of mRNA, and involves nucleotides 2–8 in the 5'-domain of

the miRNA, known as “seed” sequences. Upon binding to target RNA, RISC-miRNA will either cleave the mRNA or repress its translation. The current number of human miRNA genes listed in the miRNA database is 474 [9]. However it is expected that this number will increase to almost 1000, which would amount to almost 3% of the protein-coding genes [1]. miRNAs are of great interest because of their role as macroregulators of gene expression. Each miRNA can have multiple target messenger RNAs. According to two bio-computational studies, up to 25% of mammalian genes could be regulated by miRNAs [10,11], and several studies have highlighted the role of miRNAs in gene expression regulation in a variety of cellular systems, pathways and pathological conditions. These studies have relied largely on specific RNA preparation protocols that preserve the small miRNAs molecules. The stability of miRNAs in RNA preparations and the stability of their cDNAs derivatives have not been previously studied. In this study, we investigated the stability of four mouse miRNAs belonging to different miRNAs families; let7d, mir32, mir335, and mir451 as well as the stability of their cDNAs in RNA preparations. Our results showed that both miRNAs and their cDNAs are highly instable, and suggest that these findings should be taken in account when designing miRNAs expression studies.

\* Corresponding author. Fax: +1 305 243 4404.

E-mail address: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu) (R.L. Pastori).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

## Material and methods

**Cell cultures and tissues.** NIT-1 cells (mouse insulinoma  $\beta$ cell line) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC—Manassas VA) and cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in F-12K Nutrient mixture Kaighn's modification medium, supplemented with 10% of dialyzed fetal bovine serum. Mouse liver and acinar tissues were preserved in RNAlater storage solution (Ambion, Austin, TX) at –80 °C.

**RNA isolation.** RNA was prepared using *mirVana miRNA Isolation kit* (Ambion) or the Trizol reagent (Invitrogen, La Jolla, CA). Purity and concentration of the samples were assessed with a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. RNA was kept at –80 °C in aliquots in order to prevent thawing more than once.

**miRNA quantification: quantitative real-time PCR.** The real-time PCR quantification was performed using a method termed looped-primer RT-PCR [12], following the protocol described for TaqMan MicroRNA Assays from Applied Biosystems, using 7500 Fast real-time PCR system Instrument. The assay includes two steps: RT to synthesize cDNA from miRNA and PCR amplification. Both reactions were performed in triplicates using looped-primers and primers specific for each miRNA (TaqMan miRNA assays panel). Relative quantification (RQ) was calculated using Applied Biosystems SDS software based on the equation  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $C_t$  is the threshold cycle to detect fluorescence.  $C_t$  data were normalized to the internal standard, mir16.

**Synthesis of a let7dcDNA.** The sequence of the 61-mer let7dcDNA was: 5'-gtcgtatccagtgcagggtccgaggtattcgactggatcagcactatgcaacctactacctct-3' (synthesized by Sigma Genosys, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). It corresponds to the expected DNA product synthesized by the reverse transcriptase and a specific let7d looped-primer. let7dcDNA was dissolved in TE buffer and kept aliquoted at –80 °C. Fresh let7dcDNA samples and samples stored 6 days at –80 °C were analyzed and quantified using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

**Statistical analysis.** The paired two-tailed *t*-test was performed to detect statistical differences ( $P < 0.05$ ).

## Results and discussion

Utilizing quantification RQ-RT-PCR we have investigated the influence of RNA storage time on miRNA expression stability of let7d, mir32, mir335, and mir451, four miRNAs belonging to different miRNAs families. For this purpose, we prepared total RNA from mouse NIT-1 insulinoma cells, enriched in small RNA molecules, including miRNAs. This extraction method has been specifically used for miRNA cloning and profiling of microRNA expression [13,14]. The RNA was kept in aliquots at –80 °C. We quantified the amount of each miRNA using a method termed looped-primer RT-PCR, which is particularly suited for the accurate and sensitive detection of miRNAs as well as other non-coding RNA (ncRNA) molecules [12]. The results are expressed as the relative quantification (RQ) equal to quantity of the specific miRNA in RNA samples prepared from NIT-1 cells stored at –80 °C for various lengths of time versus quantity of miRNA in RNA samples from mouse pancreatic acinar tissue, freshly processed for every time point. The acinar tissue was embedded with “RNAlater” (Ambion) and kept at –80 °C until RNA preparation. We have previously determined that acinar tissue treated with “RNAlater” preserves miRNAs at least for five months and is therefore a suitable control material.

We found that the amount of miRNA decreases rapidly in RNA preparations stored at –80 °C and that the rate of

degradation depends on the particular miRNA (Fig. 1). In panel A are shown the RQs for the miRNAs at  $T = 0$  (fresh),  $T = 3$  (3 days at –80 °C) and  $T = 6$  (6 days storage at –80 °C). For let7d they are: ( $T = 0$ )  $6.95 \pm 1.00$ , ( $T = 3$ )  $2.19 \pm 0.50$ , and ( $T = 6$ )  $1.33 \pm 0.80$ , for mir32: ( $T = 0$ )  $2.84 \pm 0.86$ , ( $T = 3$ )  $1.39 \pm 0.90$ , and ( $T = 6$ )  $1.08 \pm 0.59$ ; for mir335: ( $T = 0$ )  $1.17 \pm 0.06$ , ( $T = 3$ )  $0.66 \pm 0.09$ , and ( $T = 6$ )  $0.67 \pm 0.05$ ; and for mir451: ( $T = 0$ )  $0.47 \pm 0.15$ , ( $T = 3$ )  $0.01 \pm 0.01$ , and ( $T = 6$ ) undetectable. Taking  $T = 0$  as 100%, the percentages of RQ for the four miRNAs at  $T = 3$  and  $T = 6$  were calculated (Fig. 1B). let7d, mir32, mir335, and mir451 decreased from 100% at  $T = 0$  to  $39.0 \pm 7.6\%$ ,  $54.0 \pm 11.1\%$ ,  $63.4 \pm 13.1\%$ , and  $5.9 \pm 3.9\%$  at  $T = 3$ , respectively, at  $T = 6$  the percentage of remaining miRNA decreased to  $18.6 \pm 9.7\%$ ,  $36.2 \pm 9.1\%$ ,  $57.3 \pm 2.0\%$  and undetectable, respectively. There was no apparent association between the observed miRNAs rates of degradation and their abundance. For example, let7d, the most abundant microRNA in these cells (Fig. 1A) degraded faster than mir32 and mir335 (Fig. 1A), while mir451, the least expressed miRNA, degraded fastest.

Additionally, we investigated the stability of miRNA-derived cDNAs. We found that cDNAs synthesized from miRNAs had similar differential stability and degradation

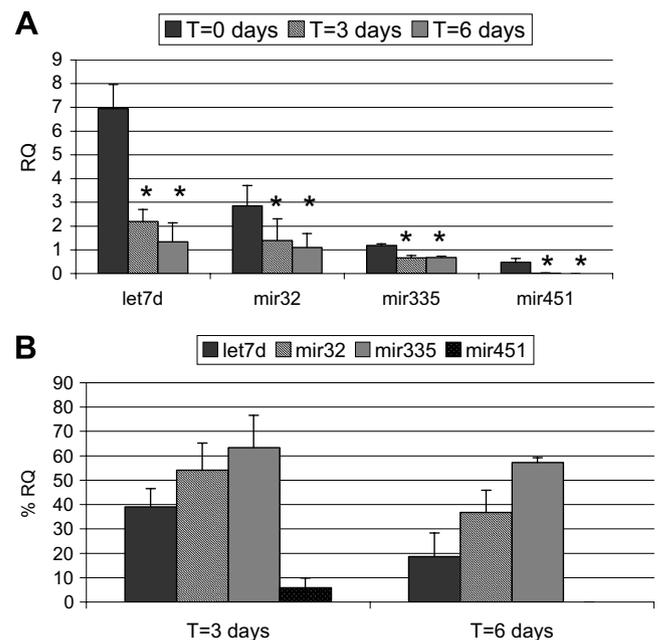


Fig. 1. miRNA degradation in RNA preparations. Relative quantification (RQ) of four mouse miRNAs in NIT-1 insulinoma cells by RT-PCR was calculated. Specific forward primers, looped RT-primers, reverse primers, and TaqMan probes were from Applied Biosystems. RQ determines the change in expression of miRNA transcripts in a test sample (aliquots of RNA stored at –80 °C,  $T = 3$  and  $T = 6$  days, relative to a calibrator sample (RNA freshly isolated from acinar tissue embedded in RNAlater,  $T = 0$ )). (A) Values are presented as calculated RQ expression. Data represent means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. \* $P$  values were calculated between samples  $T = 0$  and  $T = 3$  and  $T = 0$  and  $T = 6$ . (B) The percentages of RQ at  $T = 3$  and  $T = 6$  compared to RQ at  $T = 0$  were calculated.

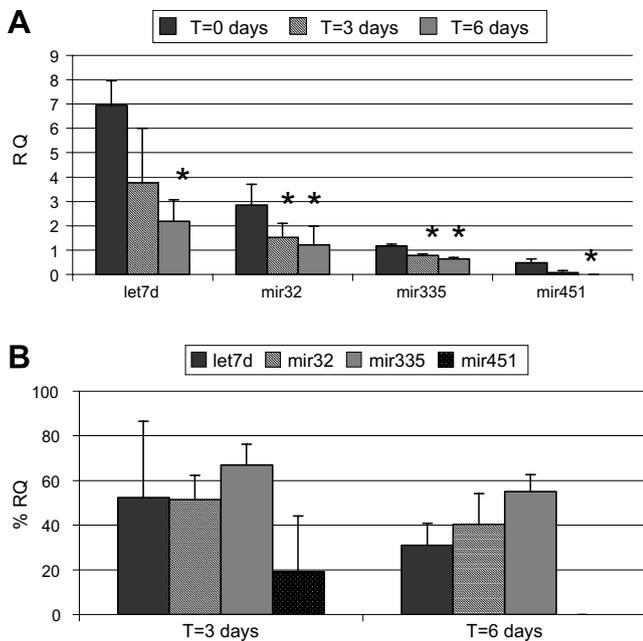


Fig. 2. Degradation of cDNAs derived from miRNAs. The stability of cDNAs synthesized from let7d, mir32, mir335, and mir451 was evaluated. cDNAs were kept aliquoted at  $-80^{\circ}\text{C}$ . RQ was evaluated by RT-PCR quantification as described for miRNAs. RQ represents the change in expression of miRNA in a test sample (aliquots of cDNA stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  relative to a calibrator sample (RNA freshly isolated from acinar tissue embedded in RNAlater)). (A) Calculated RQ. *P* values were calculated between samples  $T=0$  and  $T=3$  and  $T=0$  and  $T=6$ . Data represent means  $\pm$  SD,  $n=3$ , values of  $*P<0.05$  were considered statistically significant. (B) The percentages of RQ at  $T=3$  and  $T=6$  compared to RQ at  $T=0$  were calculated.

rates as miRNAs (Fig. 2). The percentage of remaining cDNAs from let7d, mir32, mir335, and mir451 at  $T=3$  compared to the amount originally measured at  $T=0$  were:  $52.3 \pm 34.1\%$ ,  $51.5 \pm 10.9\%$ ,  $67.0 \pm 9.3\%$ , and  $19.2 \pm 24.0\%$ , respectively. For  $T=6$  the percentages were:  $30.9 \pm 9.8\%$ ,  $40.3 \pm 13.7\%$ ,  $55.0 \pm 7.6\%$ , and undetectable, respectively.

Furthermore, we found that the stability of miRNAs and respective cDNAs is just as low in RNA samples prepared with Trizol, the standard method used for miRNA cloning and profiling analysis [15]. After 9 days of storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  the Trizol prepared RNA samples, contained 51.3%, 26.9%, 24.0% and 24.3% of let7d, mir32, mir335, and mir451 respectively. The cDNAs from let7d, mir32, mir335, and mir451 showed a similar decrease to 37.8%, 35.7%, 22.3%, and undetectable, respectively. Thus, the rapid degradation of miRNAs and cDNAs seems to be independent of the method of isolation, either method used exhibited similar losses after storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Moreover, a synthetic DNA oligomer corresponding to the cDNA sequence that should be obtained in the RT reaction using the reverse looped primer for let7d, was stable after 6 days at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as evaluated by electrophoresis and quantification using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). The concentration calculated by the Bioanalyzer was  $3.68 \pm 0.19$  and  $3.80 \pm 0.20$  ng/ $\mu\text{l}$ ,  $n=3$  for samples

corresponding to  $T=0$  and  $T=6$ , respectively, while the let7d cDNA content in RNA preparations was only 18% after the same storage time (Fig. 1B). This result suggests that the observed instability of cDNAs, and perhaps of miRNAs, is not due to an intrinsic molecular feature but rather is related to RNA isolation method. The instability of the same four miRNAs was also observed in RNA preparations from primary tissues such as mouse liver (data not shown), indicating that this is not a unique feature of RNA preparations from insulinoma cell line.

In conclusion, we show that miRNAs obtained with RNA preparation methods currently used in expression studies are unstable. Storage of RNA at  $-80^{\circ}\text{C}$  for as little as 3 days is associated with a dramatic decrease in the amount of miRNAs. As a comparison, messenger RNA molecules are stable for more than 3 weeks under the same conditions [16]. The degradation of miRNAs is not uniform, some degrade faster than others. Yet all of the miRNAs tested showed degradation. Because the miRNAs tested were not part of the same family, the observed degradation is most likely not related to their intrinsic sequence and should apply to most if not all miRNAs. In addition, contrary to common belief, even the cDNAs were as unstable as their cognate miRNAs in terms of degradation rate. Thus, when working with miRNAs, time of RNA or cDNA storage is critical and has to be taken into consideration to allow for valid comparisons among samples. This is particularly important when microRNA gene array analysis is outsourced to specialized laboratories in which RNA samples could be stored at low temperatures for several days before being processed.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from the American Diabetes Association (R.L.P.), the Diabetes Research Institute Foundation, the Peacock foundation and Foundation for Diabetes Research, New Jersey. We thank Drs. Dagmar Klein, Alberto Pugliese, and Juan Dominguez-Bendala for critical reading of the manuscript. We thank the University of Miami DNA microarray Core Facility (<http://www.biomed.miami.edu/arrays>) for technical assistance with DNA electrophoresis and quantification using the 2100 Bioanalyzer, (Agilent).

## References

- [1] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116 (2004) 281–297.
- [2] V. Ambros, The functions of animal microRNAs, *Nature* 431 (2004) 350–355.
- [3] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs, *Science* 294 (2001) 853–858.
- [4] M.A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G.J. Hannon, R. Parker, Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs, *Genes Dev.* 20 (2006) 515–524.
- [5] B.R. Cullen, Transcription and processing of human microRNA precursors, *Mol. Cell* 16 (2004) 861–865.

- [6] V.N. Kim, MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 376–385.
- [7] E.P. Murchison, G.J. Hannon, miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 (2004) 223–229.
- [8] Y. Tomari, P.D. Zamore, MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner, *Curr. Biol.* 15 (2005) R61–R64.
- [9] S. Griffiths-Jones, The microRNA registry, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D109–D111.
- [10] B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell* 120 (2005) 15–20.
- [11] X. Xie, J. Lu, E.J. Kulbokas, T.R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E.S. Lander, M. Kellis, Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals, *Nature* 434 (2005) 338–345.
- [12] C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahuvakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, K.J. Guegler, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e179.
- [13] J. Shingara, K. Keiger, J. Shelton, W. Laosinchai-Wolf, P. Powers, R. Conrad, D. Brown, E. Labourier, An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling, *RNA* 11 (2005) 1461–1470.
- [14] S. Takada, E. Berezikov, Y. Yamashita, M. Lagos-Quintana, W.P. Kloosterman, M. Enomoto, H. Hatanaka, S. Fujiwara, H. Watanabe, M. Soda, Y.L. Choi, R.H. Plasterk, E. Cuppen, H. Mano, Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e115.
- [15] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [16] S. Wilkening, A. Bader, Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model, *J. Biomol. Tech.* 15 (2004) 107–111.

## Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA

Valia Bravo-Egana<sup>1</sup>, Samuel Rosero<sup>1</sup>, R. Damaris Molano, Antonello Pileggi, Camillo Ricordi, Juan Domínguez-Bendala, Ricardo L. Pastori<sup>\*</sup>

*Diabetes Research Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine, 1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA*

Received 29 November 2007

Available online 18 December 2007

### Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding gene products that regulate gene expression through specific binding to target mRNAs. Cell-specific patterns of miRNAs are associated with the acquisition and maintenance of a given phenotype, such as endocrine pancreas (islets). We hypothesized that a subset of miRNAs could be differentially expressed in the islets. Using miRNA microarray technology and quantitative RT-PCR we identified a subset of miRNAs that are the most differentially expressed islet miRNAs (ratio islet/acinar > 150-fold), miR-7 being the most abundant. A similarly high ratio for miR-7 was observed in human islets. The ratio islet/acinar for miR-375, a previously described islet miRNA, was <10 and is 2.5× more abundant in the islets than miR-7. Therefore, we conclude that miR-7 is the most abundant endocrine miRNA in islets while miR-375 is the most abundant intra-islet miRNA. Our results may offer new insights into regulatory pathways of islet gene expression.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Pancreatic islets; MicroRNAs; MicroRNA microarrays; q-RT-PCR

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding small RNAs (~19–22 nt) that regulate gene expression by post-transcriptional interference with specific messenger RNAs (mRNA) [1]. The discovery of miRNAs as modifiers of gene expression is one of the milestones in the field of gene expression regulation. The current knowledge of miRNA biology is mostly derived from pioneering studies performed in the nematode *Caenorhabditis elegans*, showing a temporal-specific expression of the lin-4 miRNA [2]. As each miRNA can have multiple target messenger RNAs individually or jointly with other miRNAs, they are able to control highly complex regulatory networks of gene expression [3]. The current number of human miRNA genes listed in the Sanger database is 533 [4]. It was suggested that this number will increase up to 1000, which

would amount to almost 3% of the protein-coding genes [1]. However, a new mammalian miRNA atlas describes 300,000 sequences from 256 small RNA libraries and presents evidence for expression of approximately 400 miRNA genes in each genome [5].

The biological function of most miRNAs remains currently unknown, but some of their messenger RNA targets have been experimentally confirmed. To this group belongs miR-375, which negatively controls insulin secretion in  $\beta$ -cells by targeting myotrophin (Mtpn) [6], a gene originally described in neuron vesicle transport. Another miRNA with reported biological function in insulin producing cells is miR-9. This miRNA, predominantly expressed in brain, negatively controls insulin secretion in insulinoma cells [7].

Several studies have shown that miRNAs regulate embryonic development and have tissue/cell-specific patterns [8–11]. miRNAs are necessary for islet cell genesis in the mouse [12]. It has been reported that inhibition

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +1 305 243 4404.

E-mail address: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu) (R.L. Pastori).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

of miR-375 has a profound deleterious effect on pancreatic development, particularly on endocrine cells [13]. Thus, expression of a specific subset of miRNAs could have a crucial effect on the acquisition and maintenance of a given phenotype, such as that of pancreatic islets. For this reason, we investigated the expression profile of miRNAs differentially expressed in the endocrine pancreas (islets).

## Materials and methods

**Tissue procurement.** Rat islets and acinar tissue were isolated at the Preclinical Cell Processing and Translational Models Core of the Diabetes Research Institute from the pancreas of donor Lewis rats (Charles River Labs) by digestion of the pancreatic tissue with purified enzyme blend Liberase RI® (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN) at a concentration of 0.16 mg/mL, following a procedure described earlier [14]. Human pancreatic islets and acinar tissue were obtained from the Human Islet Cell Processing Facility at the Diabetes Research Institute. All animal studies were performed under protocols approved by the University of Miami Animal Care and Use Committee.

**MicroRNA microarray studies.** Total RNA was isolated by a method that preserves RNA molecules <200 bp, using mirVana miRNA Isolation kit (Ambion, Foster City, CA). In order to achieve comparative results for all the samples, special caution was taken to prevent degradation of miRNAs and their cDNAs in RNA preparations [15]. Samples were processed for miRNA profiling by LC Sciences (Houston, TX). Two to five microgram total RNA samples were size fractionated using YM-100 Microcon centrifugal filter (Millipore, Billerica, MA) to enrich the miRNA fraction. RNA was 3' extended with poly(A) tail. An oligonucleotide tag was then ligated to the poly(A) tail for subsequent fluorescent dye staining. Two different tags were used for the two RNA samples, islets and acinar tissue, on each dual-sample chip. Hybridization was performed overnight on a  $\mu$ ParaFlo™ microfluidic chip using a micro-circulation pump. The Array contained probes for 312 mature microRNAs (Sanger v. 8.1) plus multiple controls including housekeeping small RNA genes and the oligonucleotide microRNA probes with single mutations (mismatch probe negative controls). Hybridization was carried out with 100  $\mu$ L of 6 $\times$  SSPE buffer (0.90 M NaCl, 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 6 mM EDTA, pH 6.8) containing 25% formamide at 34 °C. After hybridization, fluorescence labeling with tag-specific Cy3 and Cy5 dyes provided detection. For each pair of islets and acinar samples, two chips were analyzed: in one chip, islets were labeled with Cy5 and acinar with Cy3 and in the other one the dyes were reversed. Hybridization images were collected with GenePix 4000B laser scanner (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and digitized by Array-Pro image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Data were analyzed by first subtracting the background and then normalizing the signals using a LOWESS filter (Locally weighted Regression) [16]. A total of three experiments were performed. Replicate hybridizations of the same islet and acinar samples were performed utilizing the two-color (Cy3/Cy5) “dye flip reversal method” (a total of six hybridizations). For two-color experiments, the ratio of the two sets of detected signals ( $\log_2$  transformed, balanced) and *p*-values of the *t*-test were calculated; differentially detected signals were those with less than 0.01 *p*-values.

**Statistical analysis.** The averages of both hybridizations (Cy5/Cy3 and Cy3/Cy5) for the three samples were analyzed by Significant Analysis of Microarray SAM (False Discovery Rate [FDR] < 1%) [17]. The analysis only included those miRNAs detected in at least two averages arrays.

**miRNA quantification: quantitative real time PCR (qRT-PCR).** RNA was isolated using mirVana miRNA Isolation kit (Ambion-Applied Biosystems, Foster City, CA). Purity and concentration of the samples were assessed with a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. The quantification of miRNA was performed with a method termed

looped-primer RT-PCR [18], following the Applied Biosystems protocol for TaqMan MicroRNA Assays with 7500 Fast Real-Time PCR system, utilizing TaqMan Universal reagents and miRNA assays (Applied Biosystems). RQ determines the change in transcript expression in islet versus acinar tissue. RT and PCR were done in triplicates using looped-primers and primers specific for each miRNA (Applied Biosystems). RQ was calculated via Applied Biosystems SDS software based on the equation  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ , where  $C_t$  is the number of cycles at which amplification reaches a threshold, determined by the software, within the exponential amplification phase.  $C_t$  data were normalized to endogenous control miR-16.

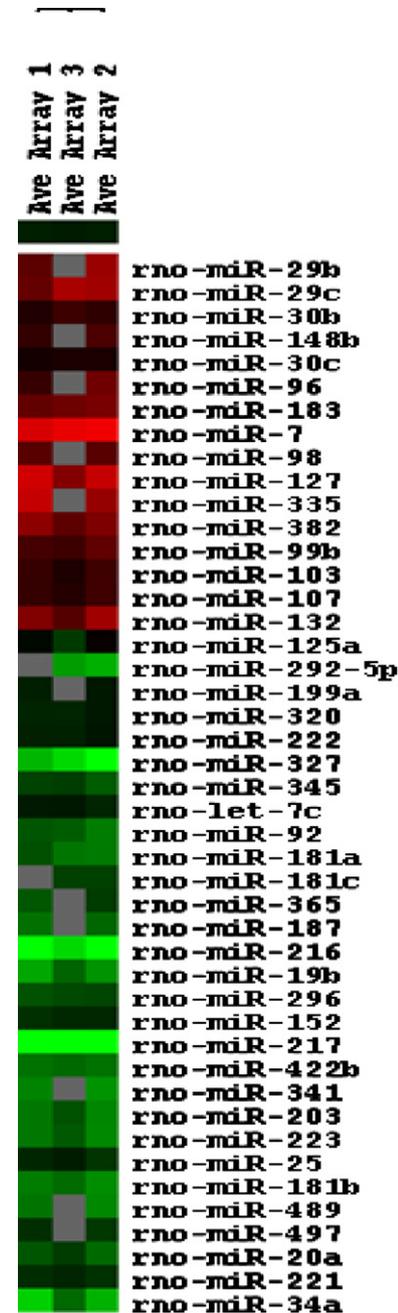


Fig. 1. Differential expression of pancreatic miRNAs. The heat map figure was obtained by Treeview [21] using the data presented from Table 1. Red represents differentially expressed islet miRNAs. Green represents differentially expressed acinar miRNAs. Colorgram depicts expression from high (bright red or green) to low (black) and no expression (gray).

## Results and discussion

### MicroRNA microarray studies

To test the hypothesis that acinar and islet cells might express a different subset of miRNAs, we studied the differential expression of miRNAs in these cells by microarray technology and qRT-PCR. Advances in microarray technology made possible the use of chip arrays to study the expression of miRNAs in various cells and tissues [3]. Using miRNA microarray microfluidic technology, we compared miRNA expression profile in rat endocrine (islets) versus exocrine (acinar) pancreas (Table 1 and Fig. 1). Statistical analysis of microarrays (SAM) reveals 17 miRNAs that are preferentially expressed in islets and 28 miRNAs that are preferentially expressed in acinar tissue (Table 1). Five miRNAs from the group of miRNAs differentially expressed in islets (miR-7, miR-183, miR-382, miR-127 and miR-29c) were identified with 0 probability of being a false positive ( $q = 0$ ). MiR-7 displays the highest rank, indicating the largest difference of expression between the two groups, islets and acinar tissue (Table 1). MiR-9 could not be detected. MiR-375 was not integrated in the Sanger mirBase release 8.1.

### Quantitative analysis of miRNA expression

To confirm the microarray results, selected miRNAs differentially expressed in islets were analyzed by qRT-PCR utilizing the looped-primer method, which is particularly suited for the accurate and sensitive detection of miRNAs as well as other non-coding RNAs (ncRNAs). MiR-375 was included in qRT-PCR analysis. We found that miR-7, miR-127, and miR-382 were the most differentially expressed miRNAs (152-fold, 108-fold, and 153-fold, respectively) in rat islets, followed by miR-183 and miR-99b (12.9- and 7.1-fold, respectively) (Fig. 2). The ratio islet/acinar for miR-375 was  $6.2 \pm 0.3$ , significantly lower than that for miR-7. The differences in expression in islet versus acinar obtained by qRT-PCR were, in general, larger than the microarray hybridization values (Table 2).

The analysis of the intra-islet miRNA expression shows that miR-7 is 2.5× less abundant than miR-375, but >10-fold and 6-fold higher than miR-382 and miR-127, respectively (Fig. 3). This is in agreement with the reported cloning frequency of miR-375 and miR-7, representing 8% and 4.3%, respectively, of the total number of clones obtained from pancreatic islets [5]. Therefore, miR-375 is the most

Table 1  
miRNAs selected by significant analysis of microarrays (SAM) from rat islets versus rat acinar miRNA arrays

A			B		
Gene ID	Score (d)	<i>q</i> -value (%)	Gene ID	Score (d)	<i>q</i> -value (%)
rno-miR-7	21.85186934	0	rno-miR-25	-3.804360969	0.669997729
rno-miR-183	11.19053836	0	rno-let-7c	-3.815447467	0.669997729
rno-miR-382	6.865388356	0	rno-miR-222	-4.121389981	0.669997729
rno-miR-127	6.502270927	0	rno-miR-365	-4.164014962	0.669997729
rno-miR-29c	5.785380065	0	rno-miR-320	-4.176820756	0.669997729
rno-miR-99b	5.247589635	0.604632097	rno-miR-34a	-4.88621479	0
rno-miR-29b	5.242054216	0.604632097	rno-miR-20a	-4.9876824	0
rno-miR-335	5.126914677	0.604632097	rno-miR-497	-5.063393797	0
rno-miR-132	5.040701163	0.604632097	rno-miR-199a	-5.244896186	0
rno-miR-148b	4.969027834	0.604632097	rno-miR-327	-5.402334731	0
rno-miR-107	4.689482155	0.604632097	rno-miR-345	-5.63857305	0
rno-miR-30c	4.523719063	0.604632097	rno-miR-203	-5.89915699	0
rno-miR-30b	4.114960417	0.953458306	rno-miR-19b	-5.975438034	0
rno-miR-98	3.880077695	0.953458306	rno-miR-181a	-6.498564619	0
rno-miR-103	3.666801583	0.953458306	rno-miR-221	-6.511775959	0
rno-miR-125a	3.601285236	0.953458306	rno-miR-92	-6.615840829	0
rno-miR-96	3.572033167	0.953458306	rno-miR-216	-6.633610661	0
			rno-miR-223	-6.82954414	0
			rno-miR-152	-7.314267564	0
			rno-miR-181c	-7.351031858	0
			rno-miR-489	-7.533937702	0
			rno-miR-187	-8.393161889	0
			rno-miR-341	-8.440403162	0
			rno-miR-292-5p	-8.703401641	0
			rno-miR-181b	-9.381454291	0
			rno-miR-296	-10.74678853	0
			rno-miR-422b	-17.99621725	0
			rno-miR-217	-20.6481374	0

The expression of miRNAs was examined by microarrays containing the rat Sanger mirBase released 8.1 list.  $N = 3$  independent experiments. The score (d) represents the value of the T-statistic. A higher score means a greater difference between the two groups. Positive (d) values represent miRNAs differentially expressed in islets (A). Negative (d) values represent miRNAs differentially expressed in acinar tissue (B). *q*-values represent the *p*-values adapted to the analysis of large number of genes. It is an evaluation of the chance that a given miRNA be a false positive.

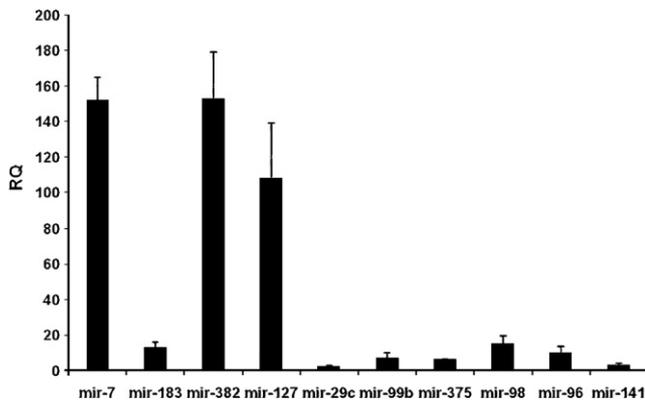


Fig. 2. Pancreatic miRNAs differentially expressed in islets. Quantitative RT-PCR analysis. Values are presented as Relative Quantification (RQ) of rat miRNA transcripts in islets relative to acinar tissue or relative to miR-7 for intra-islet comparison (B). Data represent means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). We selected 10 miRNAs to validate the microarray analysis. MiR-7, miR-127, and miR-382 constitute a subset of endocrine islet miRNAs that are the most differentially expressed (>100-fold).

Table 2  
Comparison between the microarray hybridization values and qRT-PCR

miRNA	Normalized array value	Average RQ values
MiR-7	55	152
MiR-183	6.9	13
MiR-382	8.6	153.3
MiR-127	26.3	108.6
MiR-29c	13.7	2.3
MiR-99b	3.9	7.2
MiR-375	NA	6.2
MiR-98	4.7	15
MiR-96	4.8	10.3
MiR-141	3	3

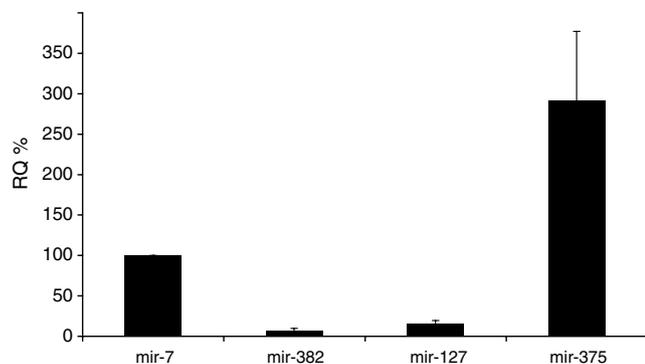


Fig. 3. Intra-islet expression of miRNAs. Quantitative RT-PCR analysis. Values are presented as relative quantification (RQ) of rat miRNA transcripts in islets. RQs for miR-7 are taken as 100%. Data represent means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). MiR-7 is >10-fold and 6-fold higher than miR-382 and miR-127, respectively. MiR-375 is the most abundantly expressed miRNA in islets.

abundant intra-islet miRNA, while miR-7 is the most abundant endocrine islet miRNA.

Table 3  
qRT-PCR analysis of the differential expression of miRNAs in human islets versus acinar tissue

miRNA	Rat	Human 1	Human 2	Human 3
MiR-7	152 $\pm$ 13.8	223.96	239.57	204.88
MiR-375	6.2 $\pm$ 0.4	7.324	5.847	3.82
MiR-183	13 $\pm$ 3.7	17.517	13.117	10.007
MiR-382	153.3 $\pm$ 26.1	25.411	12.7	4.931
MiR-141	3 $\pm$ 1	0.918	0.449	0.184
MiR-127	108.6 $\pm$ 31	78.303	23.265	11.374
MiR-99b	7.2 $\pm$ 3.1	17.773	7.006	5.697

There is an inherent high variability in the quality and viability of human islet preparations. This is due to the noxious effects in the harvested pancreas caused by donor brain death and cold ischemia time. Therefore, the results of the three independent experiments are presented separately.

### Expression of miR-7 in human islet cells

Subsequently, we compared the expression of the subset of miR-7, miR-127, miR-382, miR-183, miR-99b, and miR-375 in human islets and acinar tissue. We found an even higher differential expression of miR-7 in human than in rat in three independent islet preparations (Table 3).

To our knowledge this is the first study to report a differential expression analysis of pancreatic miRNAs. We identified a subset of endocrine miRNAs, which are highly differentially expressed in islets, miR-7 being the most abundant.

MiR-7 is conserved across all vertebrates [12]. It has been previously identified in zebrafish islets [8], and was reported to promote photoreceptor development in *Drosophila* [19]. MiR-7 expression was also found in the annelid *Platynereis dumerilii* and in zebrafish in neurons that are components of neurosecretory brain centers, such as the ones expressing the prohormone vasotocin (vasopressin/oxytocin)–neurophysin [20]. A high frequency cloning of miR-7 in the endocrine pituitary gland was also reported. Indeed, the expression of miR-7 in islets and pituitary gland represents more than 50% of the miR-7 clones obtained from the screening of more than 26 organ systems [5]. Collectively, the above reports and our results indicate that miR-7 is an endocrine miRNA highly expressed in the pancreatic islets. These findings open new avenues of research aimed at exploring its potential role in the development and maintenance of islet cell phenotype.

### Acknowledgments

This work was supported by National Institutes of Health-NCRR-Islet Cell Resources (U42 RR016603) grant, the Diabetes Research Institute Foundation, the Peacock Foundation and the Foundation for Diabetes Research. We thank Dr. Dagmar Klein for critical reading of the manuscript and Judith Molina, Elsie Zahr and Sergio San Jose for technical assistance.

## References

- [1] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116 (2004) 281–297.
- [2] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75 (1993) 843–854.
- [3] V.N. Kim, J.W. Nam, Genomics of microRNA, *Trends Genet.* 22 (2006) 165–173.
- [4] S. Griffiths-Jones, The microRNA registry, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D109–D111.
- [5] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A.O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N.D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D.B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C.E. Rogler, J.W. Nagle, J. Ju, F.N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M.J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J.J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing, *Cell* 129 (2007) 1401–1414.
- [6] M.N. Poy, L. Eliasson, J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, X. Ma, P.E. Macdonald, S. Pfeffer, T. Tuschl, N. Rajewsky, P. Rorsman, M. Stoffel, A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion, *Nature* 432 (2004) 226–230.
- [7] V. Plaisance, A. Abderrahmani, V. Perret-Menoud, P. Jacquemin, F. Lemaigre, R. Regazzi, MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26932–26942.
- [8] E. Wienholds, W.P. Kloosterman, E. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Berezikov, E. de Bruijn, H.R. Horvitz, S. Kauppinen, R.H. Plasterk, MicroRNA expression in zebrafish embryonic development, *Science* 309 (2005) 310–311.
- [9] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, T. Tuschl, Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Curr. Biol.* 12 (2002) 735–739.
- [10] S. Baskerville, D.P. Bartel, Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes, *RNA* 11 (2005) 241–247.
- [11] M.R. Suh, Y. Lee, J.Y. Kim, S.K. Kim, S.H. Moon, J. Lee, K.Y. Cha, H.M. Chung, H.S. Yoon, S.Y. Moon, V.N. Kim, K.S. Kim, Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs, *Dev. Biol.* 270 (2004) 488–498.
- [12] F.C. Lynn, P. Skewes-Cox, Y. Kosaka, M.T. McManus, B.D. Harfe, M.S. German, MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse, *Diabetes* (2007).
- [13] W.P. Kloosterman, A.K. Lagendijk, R.F. Ketting, J.D. Moulton, R.H. Plasterk, Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development, *PLoS Biol.* 5 (2007) e203.
- [14] A. Pileggi, R.D. Molano, C. Ricordi, E. Zahr, J. Collins, R. Valdes, L. Inverardi, Reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device, *Transplantation* 81 (2006) 1318–1324.
- [15] V. Bravo, S. Rosero, C. Ricordi, R.L. Pastori, Instability of miRNA and cDNAs derivatives in RNA preparations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 1052–1055.
- [16] B.M. Bolstad, R.A. Irizarry, M. Astrand, T.P. Speed, A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias, *Bioinformatics* 19 (2003) 185–193.
- [17] V.G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 5116–5121.
- [18] C. Chen, D.A. Ridzon, A.J. Broomer, Z. Zhou, D.H. Lee, J.T. Nguyen, M. Barbisin, N.L. Xu, V.R. Mahavakar, M.R. Andersen, K.Q. Lao, K.J. Livak, K.J. Guegler, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e179.
- [19] X. Li, R.W. Carthew, A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye, *Cell* 123 (2005) 1267–1277.
- [20] K. Tessmar-Raible, F. Raible, F. Christodoulou, K. Guy, M. Rembold, H. Hausen, D. Arendt, Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution, *Cell* 129 (2007) 1389–1400.
- [21] M.B. Eisen, P.T. Spellman, P. Brown, D. Botstein, Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 14863–14868.

## Accepted Manuscript

MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas

Mayrin Correa-Medina, Valia Bravo-Egana, Samuel Rosero, Camillo Ricordi, Helena Edlund, Juan Diez, Ricardo L. Pastori

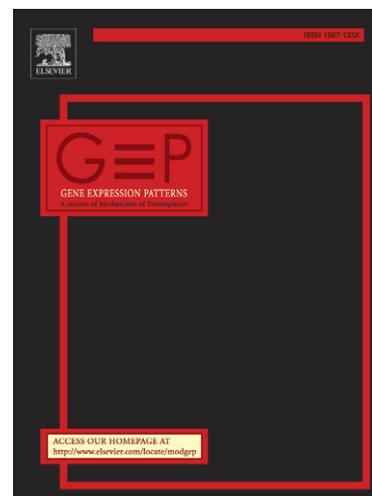
PII: S1567-133X(08)00125-7  
DOI: [10.1016/j.gep.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.12.003)  
Reference: MODGEP 658

To appear in: *Gene Expression Patterns*

Received Date: 26 September 2008  
Revised Date: 8 December 2008  
Accepted Date: 11 December 2008

Please cite this article as: Correa-Medina, M., Bravo-Egana, V., Rosero, S., Ricordi, C., Edlund, H., Diez, J., Pastori, R.L., MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas, *Gene Expression Patterns* (2008), doi: [10.1016/j.gep.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.12.003)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



**MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of  
the developing and adult human pancreas**

Mayrin Correa-Medina<sup>\*1</sup>, Valia Bravo-Egana<sup>\*1</sup>, Samuel Rosero<sup>\*1</sup>, Camillo Ricordi<sup>1</sup>,  
Helena Edlund<sup>2</sup>, Juan Diez<sup>\*\*1</sup>, Ricardo L. Pastori<sup>\*\*1</sup>

<sup>1</sup>Cell Transplant Center, Diabetes Research Institute University of Miami Leonard  
M. Miller School of Medicine, Miami, Florida.

<sup>2</sup>Umeå Center for Molecular Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden.

\* MC, VBE, and SR equally contributed to this work.

\*\*JD and RLP are corresponding senior investigators.

Key words: microRNA, miR-7, human fetal pancreas, pancreatic islets, endocrine  
cells, insulin, glucagon, Neurogenin3, in situ hybridization

Please address correspondence to:  
Ricardo L. Pastori, Ph.D.  
Diabetes Research Institute  
University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine  
1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA  
Tel: +1 (305) 243-5349  
Fax: +1 (305) 243-4404  
e-mail address: rpastori@med.miami.edu

**Abstract**

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs that inhibit gene expression through binding to complementary messenger RNA sequences. MiRNAs have been predicted to target genes important for pancreas development, proper endocrine cell function and metabolism. We previously described that miRNA-7 (miR-7) was the most abundant and differentially expressed islet miRNA, with 200-fold higher expression in mature human islets than in acinar tissue. Here we have analyzed the temporal and spatial expression of miR-7 in human fetal pancreas from 8 to 22 weeks of gestational age (wga). Human fetal (8-22 wga) and adult pancreases were processed for immunohistochemistry, *in situ* hybridization, and quantitative RT-PCR of miRNA and mRNA. MiR-7 was expressed in the human developing pancreas from around 9 wga and reached its maximum expression levels between 14 and 18 wga, coinciding with the exponential increase of the pancreatic endocrine hormones. Throughout development miR-7 expression was preferentially localized to endocrine cells and its expression persisted in the adult pancreas. The present study provides a detailed analysis of the spatiotemporal expression of miR-7 in developing human pancreas. The specific localization of miR-7 expression to fetal and adult endocrine cells indicates a potential role for miR-7 in endocrine cell differentiation and/or function. Future functional studies of a potential role for miR-7 function in islet cell differentiation and physiology are likely to identify novel targets for the treatment of diabetes including the development of improved protocols for generating insulin-producing cells for cell replacement therapy.

## 1. Results and discussion

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play a key role in post-transcriptional regulation of gene expression by interaction with specific sites located in the 3' untranslated region (UTR) of target mRNAs (Bartel, 2004). miRNA function was originally discovered by forward genetic analysis in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993). Expression of miRNAs has been shown essential for mouse islet genesis (Lynn et al., 2007) and in zebrafish inhibition of miR-375 has a deleterious effect, particularly on endocrine cells of developing pancreas (Kloosterman et al., 2007). Recent studies showed that miRNAs such as miR-124a (Baroukh et al., 2007), and four miRNAs; miR-195, miR-15a, miR-15b, and miR-16, play a role in regulating pancreatic development by inhibiting the expression of pancreatic transcription factors (Joglekar et al., 2007). Furthermore, miRNAs were reported to have an important role in islet physiology. MiR-375 negatively controls insulin secretion in pancreatic islets by targeting myotrophin (*Mtpn*) (Poy et al., 2004), a gene first described in neuron vesicle transport. Moreover, miRNAs such as miR-9, originally described in mouse brain development (Krichevsky et al., 2003), and miR-96, a miRNA with a broad pattern of expression, regulate the expression of proteins associated with insulin exocytosis in insulinoma cells (Lovis et al., 2008a; Plaisance et al., 2006). Likewise, miR-34a and miR-146 contribute to fatty acid-induced beta-cell dysfunction (Lovis et al., 2008b).

We have previously performed a differential expression analysis of miRNAs in human and rat adult acinar tissue and islets and this study identified miR-7 to be

the most highly and selectively expressed miRNA in islets (Bravo-Egana et al., 2008), with an islet/acinar ratio of expression greater than 200. Recent data suggest that miR-7 is expressed at high levels also during human pancreatic islet development (Joglekar et al., 2008). Here we describe a quantitative time-course and a spatial analysis of miR-7 expression in the developing human pancreas.

### **1.1 miR-7 is expressed at high levels in the developing human pancreas.**

We first analyzed the expression of miR-7 in fetal, from 8 to 22 wga, and adult human pancreas by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (Fig. 1). MiR-7 expression was very low between 8 to 12 wga. At week 13 the expression of miR-7 started to increase and by week 14 a 45-fold increase in expression, compared to the level at 8 wga, was observed. Moreover, the increase in miR-7 expression coincided with the time at which expression of hormone encoding genes began to dramatically rise (Fig. 1A). MiR-7 levels remained high until 18 wga to decrease afterwards. The expression of miR-127 and miR-382, two miRNAs that we described as preferentially expressed in adult islets (Bravo-Egana et al., 2008) and miR-375 showed a similar pattern of expression (Fig.1B). Also, the period with higher expression of miR-7 (14-18 wga) corresponded with the maximum expression levels of the pro-endocrine marker *NGN3*, albeit with a slightly delayed profile (Fig. 1C). Next we analyzed miR-7 expression during human pancreas development and in normal adult human pancreatic tissue by *in situ* hybridization using an anti-miR-7 LNA probe. LNA probes are bi-cyclic RNA analogs that allow an enhanced stringency for short probes as required for miRNA detection

(Kloosterman et al., 2006; Petersen et al., 2000). MiR-7 expression was first observed in the epithelium of 9 wga fetal pancreas (Fig. 2). The number of miR-7 expressing cells was very low from 9 to 11 wga but increased, concomitantly with an increased intensity of expression, to form clusters of intensely stained miR-7-expressing epithelial cells by week 14 onwards (Fig. 2). MiR-7 expression levels at 14 and 17 wga, as judged by the intensity of the hybridization signal, appeared similar (Fig.2) even though there was a decline in the relative expression as detected by RT-PCR after 14 wga (Fig. 1A). This is however not surprising since the relative amount of non-endocrine tissue increase during this period, thus “diluting” the relative miR-7 expression values obtained by RT-PCR analyses.

### **1.2. miR-7 is predominantly expressed in endocrine cells.**

On a morphological level the *in situ* hybridization revealed that miR-7 was expressed in the epithelial part of the developing pancreas. In order to identify the nature of the cells expressing miR-7 we performed counterstaining of the *in situ* hybridized sections with antibodies specific for endocrine markers. The 14 wga human fetal pancreas was selected since miR-7 was robustly expressed, as observed both by qRT-PCR and *in situ* hybridization analyses (Fig.1 and 2), at this stage. Moreover, hormones levels rise dramatically and islet-like structure start to appear at this stage (Figure 1; (Piper et al., 2004) and our own unpublished observations).

The expression of IPF1/PDX1, a homeodomain transcription factor expressed in early pancreatic progenitor cells and in differentiated beta cells (Edlund, 2001;

Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996; Ohlsson et al., 1993), was detected in miR-7 positive cells (Fig. 3 A). However, some of the cells present in miR-7-positive clusters did not express IPF1 suggesting that these cells could be non-beta endocrine cells (Fig. 3A). Likewise, many IPF1-positive cells did not express miR-7, probably because they were undifferentiated precursor cells. Next, we compared the expression of miR-7 with that of ISL1, a marker for differentiated endocrine cells (Ahlgren et al., 1997), and these analyses showed that most of the miR-7 cells co-expressed ISL1. However, and as expected, the vast majority of cells expressing ISL1 did not express the pro-endocrine gene *NGN3* (Fig. 3A). Due to the difficulties we have encountered using human *NGN3* antibody on frozen tissue sections, and the technical problems associated with the combined detection of miRNA and mRNA by double *in situ* hybridization, the expression of miR-7 and *NGN3* were thus indirectly compared based on the co-expression of miR-7 and *NGN3*, respectively, with that of ISL1. Taken together, these data provide evidence that miR-7 expression is restricted to differentiated, ISL1 positive endocrine cells and that consequently *NGN3* and miR-7 are not co-expressed. Furthermore, the miR-7 expression profile is slightly delayed from that of *NGN3* (Fig. 1C) and in fetal and adult tissue not only insulin, but also glucagon and somatostatin positive cells expressed miR-7 (Fig. 3 and Fig. 4). The islets' restricted expression of miR-7 in adult human pancreas was further emphasized by the lack of co-expression between miR-7 and the ductal marker CK19 and the exocrine marker amylase, respectively (Fig. 4). The scattered miR-7 signal

observed in the exocrine pancreas is due to the high background found in human pancreas preparations.

Previous reports have suggested that the expression of miR-7, a very well evolutionary-conserved miRNA (Lim et al., 2003), is restricted to endocrine tissues such as the islets of zebra-fish (Wienholds et al., 2005), the neurosecretory cells of the annelid *Platynereis dumerillii* and zebra fish (Tessmar-Raible et al., 2007), human pancreatic islets (Landgraf et al., 2007) and pituitary gland (Farh et al., 2005; Landgraf et al., 2007). Our findings show that miR-7 is predominantly expressed in endocrine cells in the developing and adult human pancreas. The role that miR-7 may play in the development and/or function of the endocrine pancreas remains, however, unknown. In *Drosophila*, miR-7 has been shown to induce eye photoreceptor differentiation by targeting the transcriptional repressor Yan that prevents progenitors from differentiating spontaneously (Li and Carthew, 2005). Among several target genes, Yan also represses the transcription of miR-7. Following EGF receptor-mediated degradation of Yan, miR-7 is expressed and inhibits Yan translation by binding its 3'UTR, thereby further decreasing the levels of Yan, which in turn allows the differentiation of eye photoreceptors.

Interestingly, it has recently been reported that in glioblastoma miR-7, independently, suppressed EGFR expression and Akt signalling, the latter by targeting upstream regulators such as IRS-1 and IRS-2 (Kefas et al., 2008). EGF and Akt signaling are both implicated in regulation of beta-cell mass and/or function (Elghazi et al., 2007; Miettinen et al., 2008) raising the possibility that miR-7 might play a role in regulation of beta-cell mass or physiology. In mouse,

conditional deletion of *Dicer*, the gene encoding the enzyme responsible for miRNAs maturation, in early pancreatic progenitor cells by *PDX-1* promoter driven Cre expression impairs the formation of endocrine pancreas . However, inactivation of *Dicer* at later stages of pancreatic development using the *Ngn3* or *Insulin* promoter to drive the expression of the Cre recombinase did not affect islet formation as revealed by immunostaining (Lynn et al., 2007). However, whether inactivation of *Dicer* in proendocrine or insulin cells affected the function of the adult islets cells in these mice remains unknown. In developing human pancreas we observed that miR-7 followed *NGN3* expression. This would suggest that miR-7 is not directly involved in the differentiation of endocrine pancreatic progenitor cells but does not rule out the possibility that miR-7 might be implicated in the regulation and/or maintenance of the endocrine function.

Collectively, these results suggest that miR-7 is a marker of differentiated endocrine cells and that miR-7 expression appears in the differentiating endocrine cells following the transient expression of *NGN3* (Fig. 5). Further studies will be required to define the role of miR-7 during endocrine pancreas formation and/or function, which may contribute to the identification of targets for treatment of diabetes as well as to the development of protocols to generate insulin-producing cells for cell replacement therapy.

## **2. Experimental Procedures.**

### **2.1. Tissue procurement**

Human fetal pancreases from 8 to 22 wga were collected from fetal tissue immediately after elective termination of pregnancy from healthy women that were admitted to local clinics and gave their proper consent to use fetal tissues for research studies. The study is in compliance with US legislation and the guidelines of the University of Miami. Gestational age was determined on the basis of time since the last menstrual period, the measured of the Crown-Rump Length (CRL), and the biparietal diameter (BPD) by ultrasonography. Human adult pancreas fragments were obtained from the Human Islet Cell Processing Facility at the Diabetes Research Institute. Two or more independent pancreases were analyzed in each stage (Table 1).

## **2.2. miRNA quantification: Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).**

MiRNAs were quantified from total RNA isolated using mirVana miRNA Isolation kit (Ambion-Applied Biosystems, Foster City, CA) and mRNAs were quantified using total RNA isolated using RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's directions. Purity and concentration of the samples were assessed with a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The quantification of miRNA was performed with a method termed looped-primer RT-PCR (Chen et al., 2005), following the Applied Biosystems protocol for TaqMan MicroRNA Assays and the quantification of mRNA was carry out using FAM labeled target gene probe (Applied Biosystems) in a 7500 Fast Real-Time PCR system. The primers used in this article are listed in Table 2. For a particular sample, values are shown as RQ (relative

quantification), the ratio of expression of a given miRNA or mRNA over the expression of the endogenous 18S ribosomal RNA. RT and PCR reactions were performed in triplicates. RQ was calculated via Applied Biosystems SDS software based on the equation  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) where Ct is the number of cycles at which amplification reaches a threshold, determined by the software, within the exponential amplification phase.

### **2.3. *In situ* hybridization and Immunohistochemistry.**

*In situ* hybridization using fluorescein-labeled anti-human miR-7 Locked Nucleic Acid (LNA) probe (Exiqon, Denmark) or DIG-labeled *NGN3* probe was performed essentially as described (Obernosterer et al., 2007). A total of 1pmol of fluorescein-labeled LNA or 30ng of DIG-labeled *NGN3* probe were diluted into 150  $\mu$ l of hybridization buffer, applied to the slides and allowed to hybridize at 60°C or 70°C respectively overnight. Slides were then washed for 1 h in 0.2 x SSC solution (Ambion-Applied Biosystems, CA) and incubated with alkaline phosphatase-conjugated sheep anti-fluorescein antibody (1/1500, Roche) or alkaline phosphatase-conjugated sheep anti-DIG (1/2500, Roche) antibodies overnight at 4°C. Alkaline phosphatase reaction was carried out in PVA with 200 $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> 1M and 140 $\mu$ l of NBT/BCIP stock (Roche) for 1-3 days. Hybridization with sense fluorescein-labeled LNA miR-159 (Exiqon) was used as control. MiR-159, a miRNA described in *Arabidopsis thaliana* does not have a known target in the Sanger miRBase. Human fetal intestine and spleen, tissues in which miR-7

was undetectable by RT-PCR, were used as negative control (data not shown) and also negative control assays were performed without primary antibodies. Immunofluorescence localization of antigens, double-label immunofluorescence, and confocal microscopy were performed essentially as previously described (Apelqvist et al., 1997; Obernosterer et al., 2007). The primary antibodies and the dilutions used were: guinea pig anti human-Insulin (1/50, Dako), mouse anti-glucagon (1/1500, Sigma), anti-somatostatin (1/500, Dako), mouse anti-Cytokeratin 19 (1/50, Biogenex), rabbit anti- Amylase (1/200, Sigma) rabbit anti-IPF1 (1/4000), generated against human IPF1 peptide by Agrisera AB) and rabbit anti-ISL1 (1/250, (Ahlgren et al., 1997)). Secondary antibodies used were: Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (1/400, Molecular Probes), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-guinea pig (1/400, Molecular Probes) and Alexa Fluor 647 Goat anti-mouse (1/400, Molecular Probes). DAPI (12.5µg/ml, Invitrogen) was used as a nuclear counterstaining.

#### **2.4. Statistical analysis**

Results are expressed as arbitrary units and are presented as the mean value  $\pm$  standard errors (S.E.M)

#### **Acknowledgments**

This work was supported by National Institutes of Health-NCRR-Islet Cell Resources (U42 RR016603) grant, the Diabetes Research Institute Foundation, the Karasik Foundation, the Peacock Foundation and the Foundation for Diabetes

Research. We would like to thank Karen Bookbinder, Dr. Gerald Applegate and member of the clinic (Eve Medical Center) for the human fetal tissue; George McNamara (DRI Imaging Core Facility); Kevin Johnson (DRI Immunohistochemistry Core); Elisabet Palsson (Umea center of Molecular Medicine) and Daniel Gutman for technical assistance; and Dagmar Klein for critical reading and comments.

## REFERENCES

- Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T., and Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* *385*, 257-260.
- Apelqvist, A., Ahlgren, U., and Edlund, H. (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* *7*, 801-804.
- Baroukh, N., Ravier, M. A., Loder, M. K., Hill, E. V., Bounacer, A., Scharfmann, R., Rutter, G. A., and Van Obberghen, E. (2007). MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* *282*, 19575-19588.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Bravo-Egana, V., Rosero, S., Molano, R. D., Pileggi, A., Ricordi, C., Dominguez-Bendala, J., and Pastori, R. L. (2008). Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* *366*, 922-926.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., *et al.* (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* *33*, e179.
- Edlund, H. (2001). Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia* *44*, 1071-1079.
- Elghazi, L., Rachdi, L., Weiss, A. J., Cras-Meneur, C., and Bernal-Mizrachi, E. (2007). Regulation of beta-cell mass and function by the Akt/protein kinase B signalling pathway. *Diabetes Obes Metab* *9 Suppl 2*, 147-157.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* *310*, 1817-1821.

- Joglekar, M. V., Joglekar, V. M., and Hardikar, A. A. (2008). Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns*. doi:10.1016/j.gep.2008.10.001
- Joglekar, M. V., Parekh, V. S., Mehta, S., Bhonde, R. R., and Hardikar, A. A. (2007). MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3. *Dev Biol* 311, 603-612.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.
- Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fine, H., Chiocca, E. A., Lawler, S., and Purow, B. (2008). microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 68, 3566-3572.
- Kloosterman, W. P., Lagendijk, A. K., Ketting, R. F., Moulton, J. D., and Plasterk, R. H. (2007). Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 5, e203.
- Kloosterman, W. P., Wienholds, E., de Bruijn, E., Kauppinen, S., and Plasterk, R. H. (2006). In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 3, 27-29.
- Krichevsky, A. M., King, K. S., Donahue, C. P., Khrapko, K., and Kosik, K. S. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *Rna* 9, 1274-1281.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401-1414.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Li, X., and Carthew, R. W. (2005). A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 123, 1267-1277.
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lovis, P., Gattesco, S., and Regazzi, R. (2008a). Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol Chem* 389, 305-312.
- Lovis, P., Roggli, E., Laybutt, D. R., Gattesco, S., Yang, J. Y., Widmann, C., Abderrahmani, A., and Regazzi, R. (2008b). Alterations in microRNA expression

contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 57, 2728-2736.

Lynn, F. C., Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., McManus, M. T., Harfe, B. D., and German, M. S. (2007). MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 56, 2938-2945.

Miettinen, P., Ormio, P., Hakonen, E., Banerjee, M., and Otonkoski, T. (2008). EGF receptor in pancreatic beta-cell mass regulation. *Biochem Soc Trans* 36, 280-285.

Obernosterer, G., Martinez, J., and Alenius, M. (2007). Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc* 2, 1508-1514.

Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L., and Wright, C. V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-995.

Ohlsson, H., Karlsson, K., and Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 12, 4251-4259.

Petersen, M., Nielsen, C. B., Nielsen, K. E., Jensen, G. A., Bondensgaard, K., Singh, S. K., Rajwanshi, V. K., Koshkin, A. A., Dahl, B. M., Wengel, J., and Jacobsen, J. P. (2000). The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit* 13, 44-53.

Piper, K., Brickwood, S., Turnpenny, L. W., Cameron, I. T., Ball, S. G., Wilson, D. I., and Hanley, N. A. (2004). Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol* 181, 11-23.

Plaisance, V., Abderrahmani, A., Perret-Menoud, V., Jacquemin, P., Lemaigre, F., and Regazzi, R. (2006). MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 281, 26932-26942.

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

Tessmar-Raible, K., Raible, F., Christodoulou, F., Guy, K., Rembold, M., Hausen, H., and Arendt, D. (2007). Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129, 1389-1400.

Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H. R., Kauppinen, S., and Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310-311.

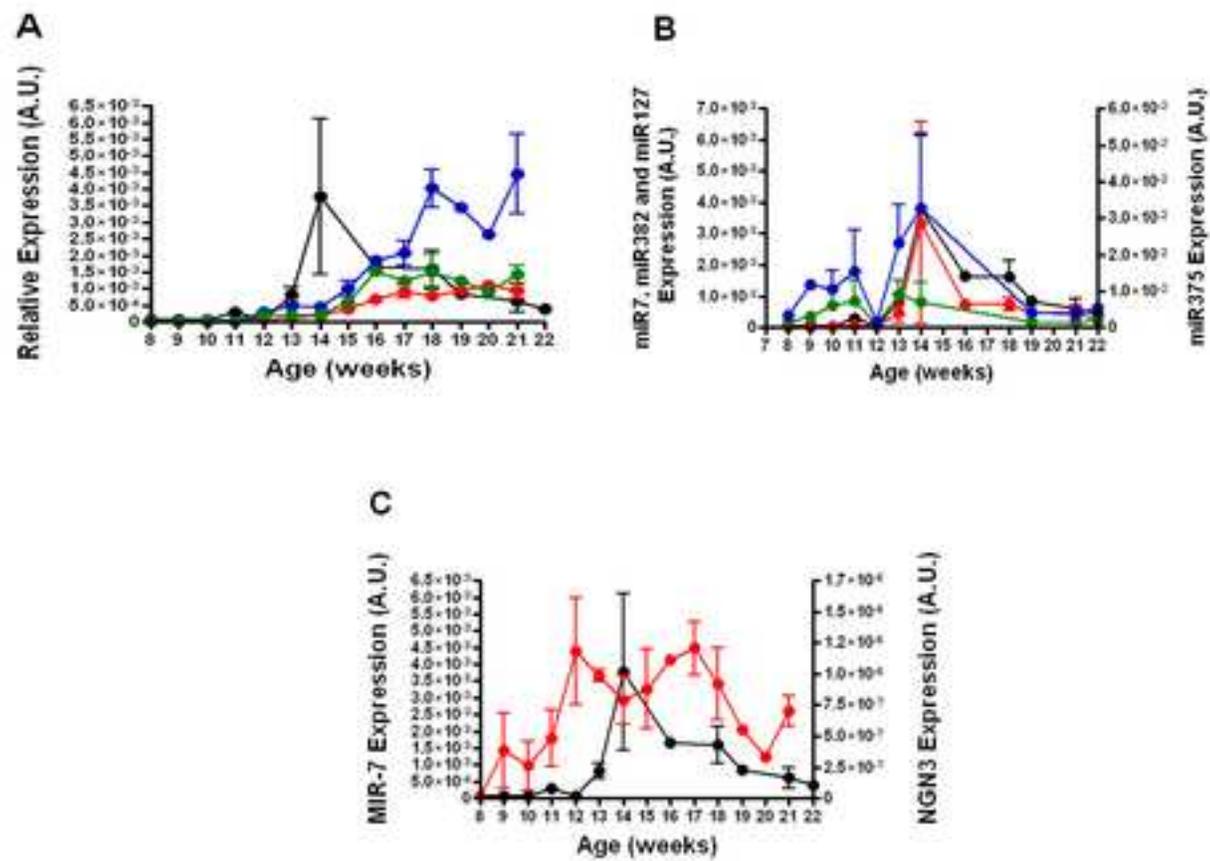
**Figure 1. miR-7 expression profile in fetal pancreas.** Expression in fetal human pancreas from 8 to 22 wga of gestational age by quantitative PCR of (A) miR-7 (black), insulin (blue), glucagon (green) and somatostatin (red), (B) miR-7 (black), miR-127 (blue), miR-382 (green), miR-375 (red) and (C) miR-7 (black) and *NGN3* (red). Number of fetal pancreases used in each stage is shown in Table 1. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

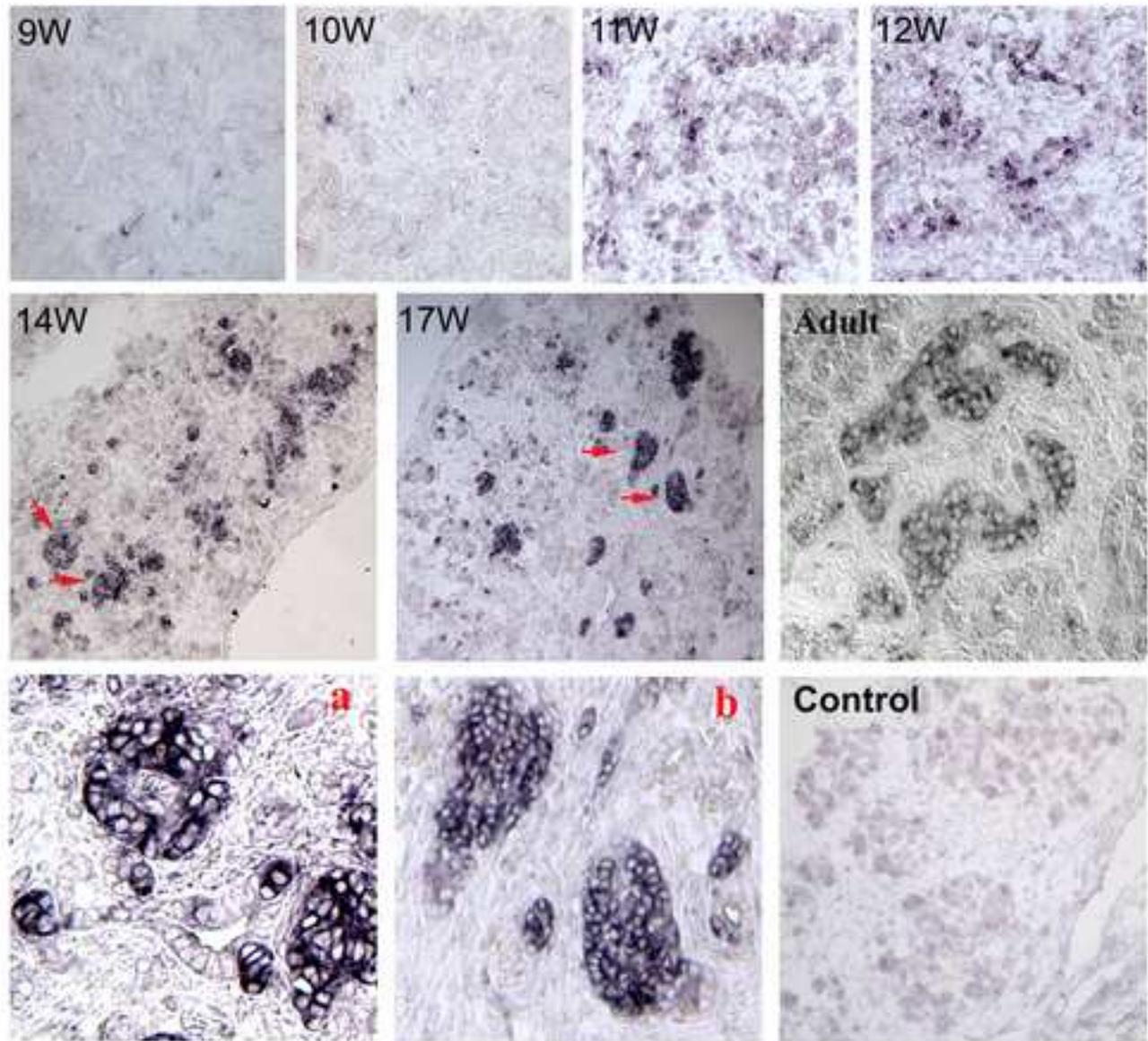
**Figure 2. miR-7 in situ hybridization.** *In situ* hybridization of fetal (9, 10, 11, 12, 14 and 17 wga (w)) and adult human pancreatic tissue using fluorescein-labeled miR-7 LNA probe (dark blue). Control: 14 wga human pancreatic tissue was hybridized with sense miR-159 LNA oligonucleotide. There is no known target for this probe in the Sanger miRBase. (a) and (b) are higher magnification of areas indicated by red arrows. Magnification: 10X except adult, (a) and (b) which are 20X.

**Figure 3. Localization of miR-7 in the developing human pancreas.** *In situ* hybridization of a 14 wga fetal human pancreas using fluorescein-labeled miR-7 LNA probe or DIG-labeled *NGN3* probe (black), counterstained with antibodies against (A) IPF1/PDX1, and ISL1, (B) insulin, glucagon and somatostatin all in green. In the merged images (In situ+IF) *in situ* hybridization is pseudocolored in red (miR-7 and *NGN3*). Right panels show enlarged images of areas indicated by arrows.

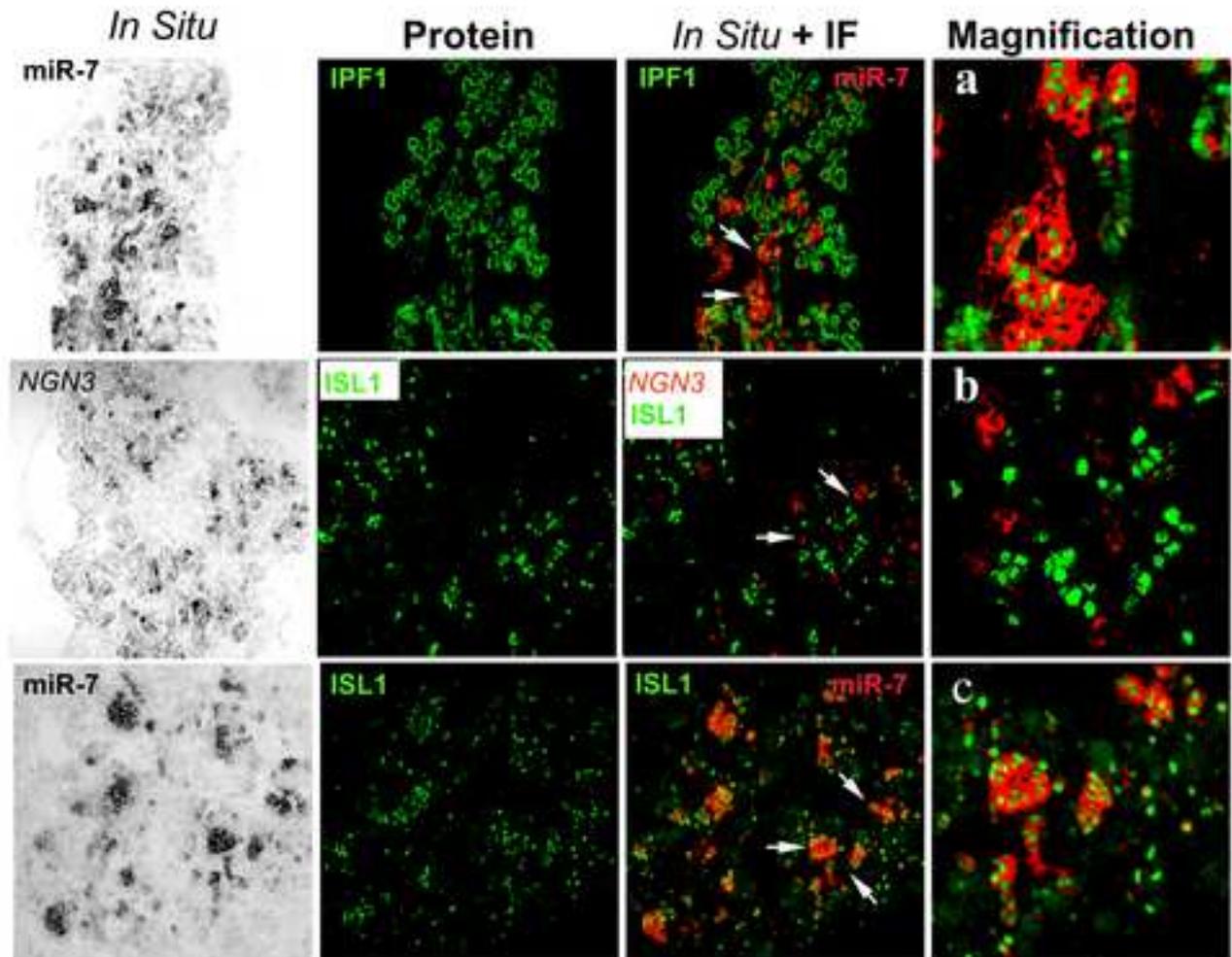
**Figure 4. Localization of miR-7 in adult human pancreas.** *In situ* hybridization of adult human pancreas using fluorescein-labeled miR-7 LNA probe (black), counterstained with antibodies against insulin, glucagon, somatostatin, CK19 and amylase, all in green. In the merged images *in situ* hybridization is pseudocolored in red. Insets show enlarged areas.

**Figure 5. Schematic summary of miR-7 expression during human pancreatic development.**





A



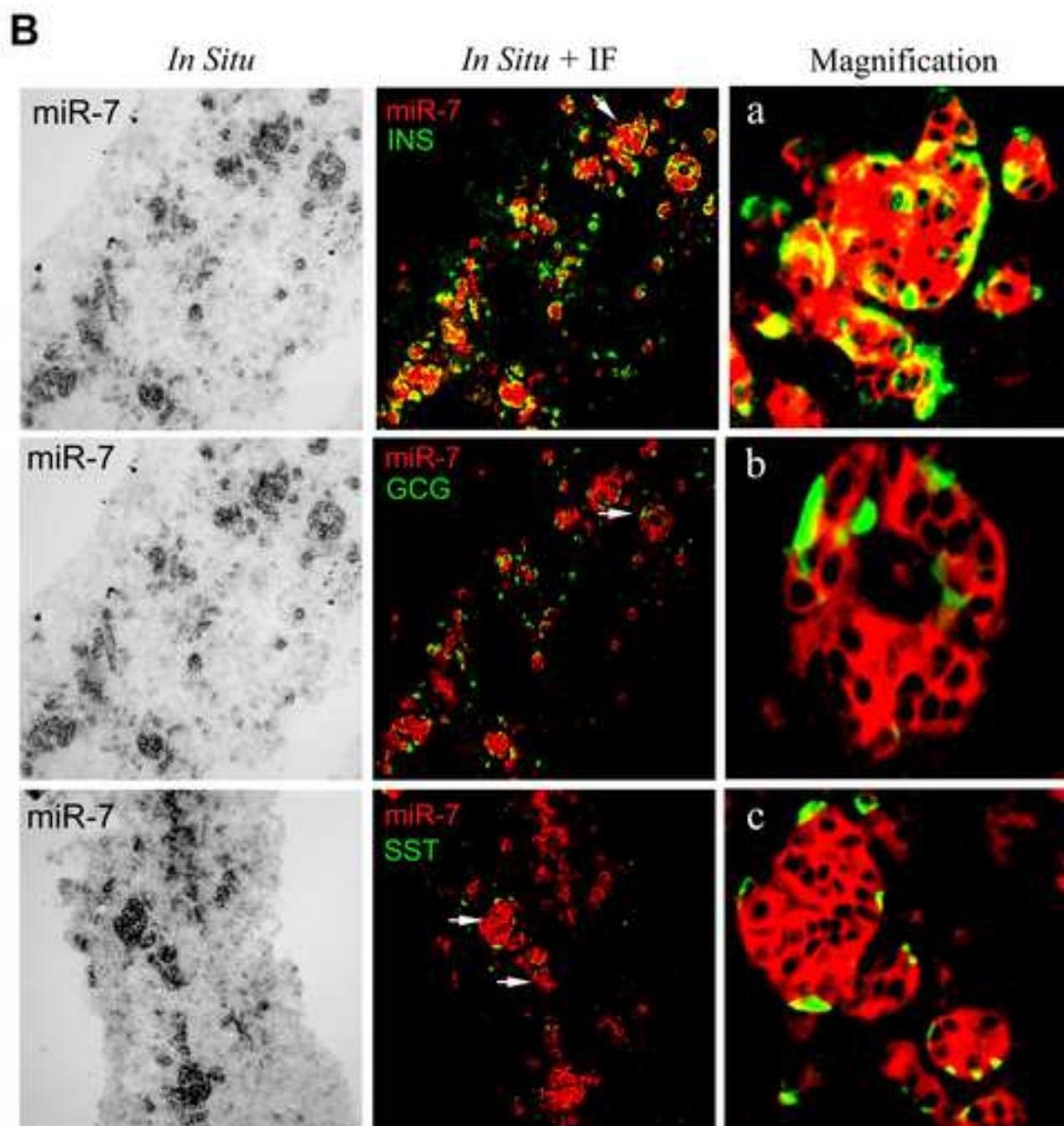


Figure 4

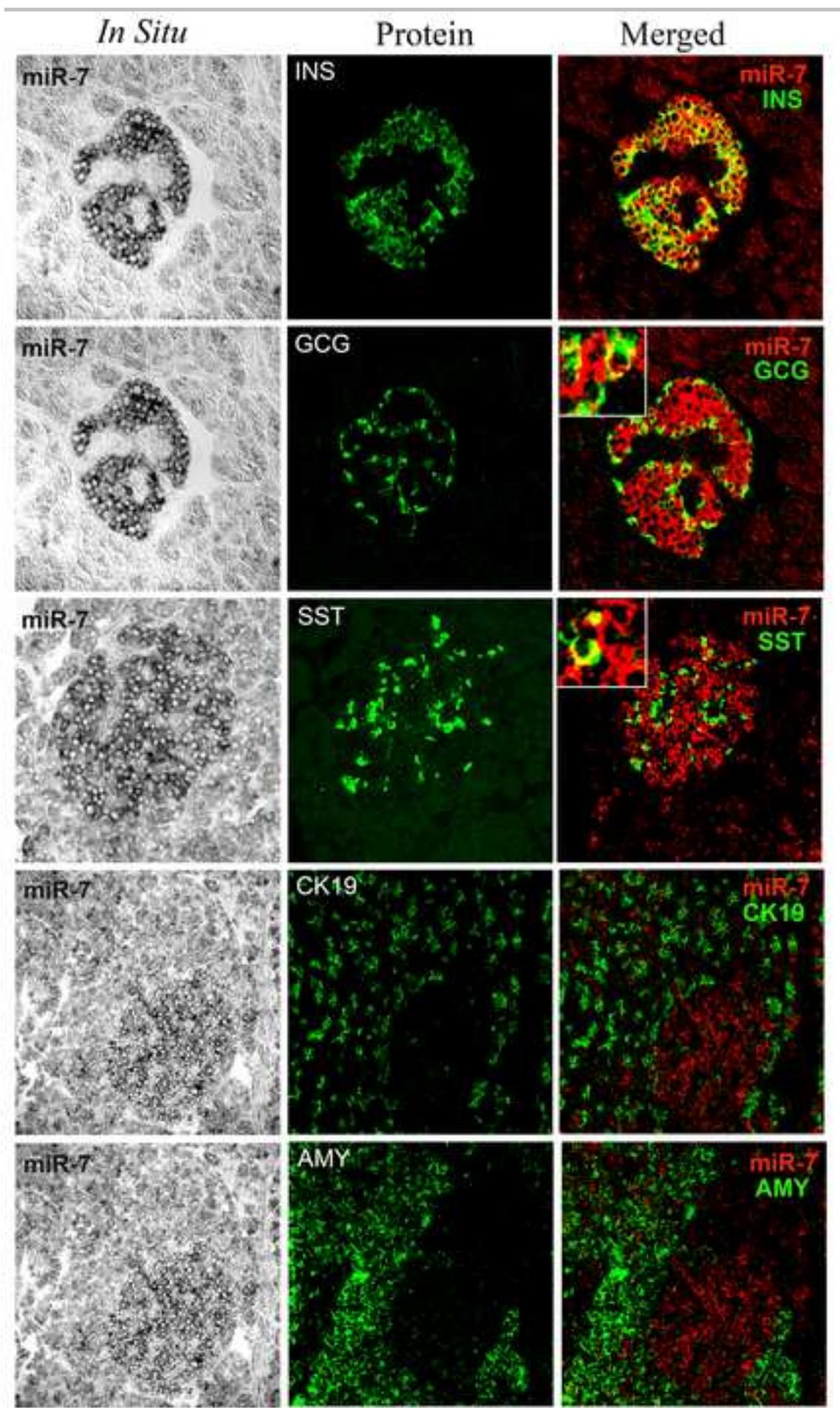
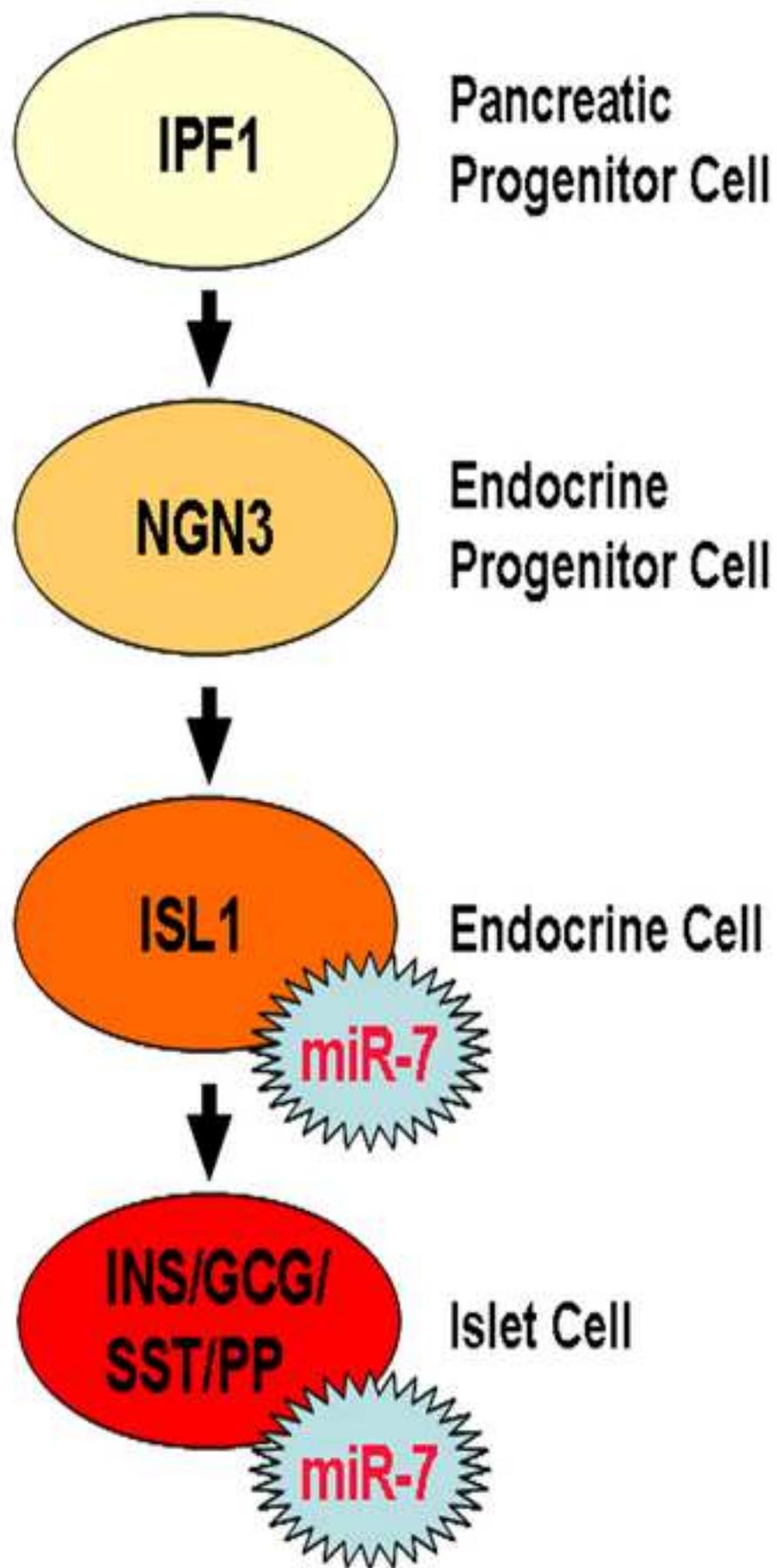


Figure 5



Gestational age (wga)	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	total
# of cases for mRNA analysis	4	4	4	4	4	4	4	3	1	3	4	2	2	3		46
# of cases for miR-7 analysis	2	2	2	2	1	3	5	0	1	0	2	1	0	3	1	25
# of cases for miR-127 analysis	2	2	2	2	1	3	5	0	0	0	0	1	0	2	1	21
# of cases for miR-382 analysis	2	2	2	2	1	3	4	0	0	0	0	1	0	2	1	20
# of cases for miR-375 analysis	2	2	2	2	1	3	5	0	1	0	2	1	0	3	1	25

Table 1. Human fetal pancreas samples utilized in the study.

Gene Abb	Gene Name	Applied Biosystems ID gene
18S	eukaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1
INS	insulin	Hs02741908_m1
GCG	glucagon	Hs00174967_m1
SST	somatostatin	Hs00356144_m1
NGN3	neurogenin 3	Hs00360700_g1
miR-7	hsa-miR-7	000386

Table 2 Primers used for mRNA and miRNA quantification by RT-PCR.