

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS SÃO GABRIEL**

PRISCILA CAROLINE THIAGO DOBBLER

**RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE: MECANISMOS, CARACTERÍSTICAS E
FUNCIONALIDADES DO DNA “LIXO”**

**SÃO GABRIEL
2015**

PRISCILA CAROLINE THIAGO DOBBLER

**RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE: MECANISMOS, CARACTERÍSTICAS E
FUNCIONALIDADES DO DNA “LIXO”**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à comissão avaliadora
de graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Pampa
campus São Gabriel - RS, Brasil,
para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientador: Paulo Marcos Pinto

**SÃO GABRIEL
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA AUTOMATICAMENTE COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A) ATRAVÉS DO MÓDULO DE BIBLIOTECA DO SISTEMA GURI (GESTÃO UNIFICADA DE RECURSOS INSTITUCIONAIS).

D959r DOBBLER, Priscila Caroline Thiago

RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE: MECANISMOS,
CARACTERÍSTICAS E FUNCIONALIDADES DO DNA “LIXO” /
Priscila Caroline Thiago Dobbler.

33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do
Pampa, BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA, 2015.

"Orientação: Paulo Marcos Pinto".

1. RNA Longo Não-codificante. 2. Transcritos não codificantes. I. Título.

PRISCILA CAROLINE THIAGO DOBBLER

**RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE: MECANISMOS, CARACTERÍSTICAS E
FUNCIONALIDADES DO DNA “LIXO”**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, *campus* São Gabriel - RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Ciências Biológicas

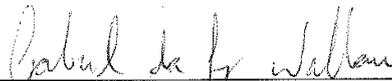
Trabalho de Conclusão de Curso: apresentado e aprovado em 23 de Janeiro de 2015.

Banca examinadora:

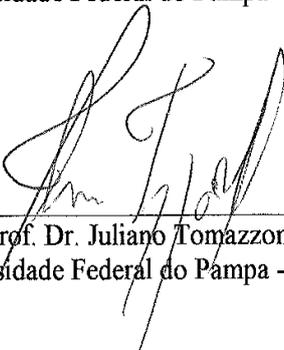


Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Gabriel da Luz Wallau
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico aos meus pais (Milton e Angela) e a minha irmã (Patrícia). Obrigada pela dedicação e apoio inquestionável.

AGRADECIMENTOS

A minha família que com muito carinho e apoio não mediram esforços para mais esta realização;

A minha irmã, Patrícia, que com seu companheirismo e entusiasmo conseguiu diminuir a distância entre São Gabriel-RS e Porto Velho-RO;

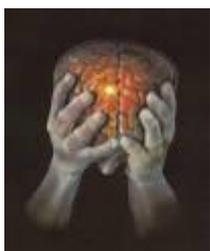
As minhas amigas, Andressa e Anna, pela amizade que desenvolvemos ao longo dessa jornada;

A esta universidade, ao corpo docente e ao administrativo, que foram tão importantes na minha vida acadêmica, pois a mim proporcionaram conhecimento e experiência, fundamentais para a minha jornada profissional;

Obrigada a todos que mesmo não estando citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão;

Em especial a Arcia, por ter me acolhido em seu lar com alegria nas datas em que eu mais sentia falta do aconchego da minha casa;

Por fim, ao meu orientador Paulo, pelo apoio e compreensão dispensado para que a conclusão deste trabalho fosse possível.



“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento”

Stephen Hawking

RESUMO

No início da década de 1990, encontrou-se um RNA não codificante quando visavam encontrar novos genes codificantes de proteína. Os RNAs não codificantes podem ser agrupados em duas classes principais: pequenos RNAs não codificantes, e longos RNAs não-codificantes. Atualmente não há uma definição clara para RNAs longos não-codificantes (lncRNA em inglês), baseada em premissas biológicas, milhares de RNAs não-codificantes são transcritos a partir do genoma de mamíferos; até noventa por cento do genoma humano é transcrito, no entanto não se sabe se estas transcrições são funcionais. A biogênese dos lncRNAs é similar a dos RNAs codificantes de proteínas, lncRNAs são transcritos principalmente pela RNA Polimerase II e alguns são transcritos pela RNA Polimerase III. Sugere-se um sistema de classificação em que se leva em consideração a posição do lncRNA relativa a posição de regiões codificadoras de proteínas, que vem sendo usado desde então. lncRNAs podem atuar de diversas formas, até o momento estas moléculas foram descritas agindo como: (a) guia; (b) modificadoras de estruturas da cromatina, por interação com proteínas associadas com DNA; (c) reguladoras transcricionais, afetando interações da RNA polimerase e fatores de transcrição; (d) *scaffolds*, recrutando múltiplas proteínas formando complexos ribonucleoprotéicos; e (e) artifício. lncRNAs podem exercer funcionalidade a níveis transcricionais e pós-transcricionais, incluindo como modificadores de cromatina, coativadores de fatores de transcrição, controle do decaimento de mRNAs, entre outros. Embora apenas um pequeno número de lncRNAs são bem documentados, estudos realizados até os dias atuais sugerem que lncRNAs podem estar relacionados a quase todas as fases da regulação de expressão gênica, demonstrando o quão importante é o estudo destas moléculas. Neste trabalho, procuramos reunir as principais características biológicas e mecanismos funcionais dos lncRNAs.

PALAVRAS-CHAVES: RNA longo não-codificante. lncRNAs. ncRNA. RNA não-codificante.

ABSTRACT

At the beginning of the 90's decade a noncoding RNA was found when they the aim was to find new protein coding genes. The noncoding RNAs can be grouped into major classes: small noncoding RNAs, and long noncoding RNAs. Nowadays, there is no clear definition for long noncoding RNAs (lncRNAs) based on biological premises. Thousands of noncoding RNAs are transcribed from mammal's genome. Up to ninety percent of the human genome is transcribed, however it is not known if all these transcripts are functional. Long noncoding RNA's biogenesis is similar to the protein coding RNAs, mostly of them are transcribed by RNA Polymerase II and some by RNA Polymerase III. It was suggested a classification system, in which the relative position of lncRNAs to protein coding regions is taken into account, and it has been used since then. LncRNAs can function in several different ways, so far these molecules were described acting as: (a) guide; (b) chromatin modifiers, by interaction with DNA associated protein; (c) transcriptional regulators, affecting RNA polymerase interactions e transcription factors; (d) scaffolds, recruiting multiple protein forming a ribonucleoprotein complex; and (e) decoy. LncRNAs can exert their functional role at transcriptional and post-transcription levels, including as a chromatin modifier, transcriptional factors coactivator, decay of mRNAs, among others. Although there are only a few well documented lncRNAs, studies made so far suggest that lncRNAs may be related to almost all levels of gene expression regulation, demonstrating how important is the study of these molecules. In this review, we aim to gather the main lncRNAs biological characteristics and functional mechanisms.

Keywords: Long noncoding RNA. LncRNA. NcRNA. Noncoding RNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Publicações anuais.....	15
Figura 2 - Número de distribuição de éxons presentes nos transcritos lncRNAs. ...	20
Figura 3 - Classificação de lncRNAs em relação a região codificadora de proteínas	22
Figura 4 - Modelos de ação do lncRNA Xist sobre o cromossomo X.....	26
Figura 5 - Mecanismos Funcionais dos lncRNAs.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais bancos de dados públicos de lncRNAs.....	15
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MANUSCRITO	17
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
5 REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Os RNAs não codificantes abordados nesta revisão diferem de RNAs não codificantes clássicos como RNA ribossomal (rRNA) e RNA transportador (tRNA). Esses RNAs não codificantes foram encontrados pela primeira vez em 1990, no entanto, na época não havia conhecimentos sobre essas moléculas. Mais tarde foi demonstrado o envolvimento desse RNA não codificante na inativação do cromossomo X em mamíferos (BROWN et al, 1992), nesse período genes codificantes de proteínas eram a principal área de estudos, sabia-se muito pouco sobre RNAs não-codificantes.

Atualmente sabe-se que o número de genes codificantes de proteínas no genoma humano é menor que 2%, e foi recentemente estabelecido em torno de 20 mil genes. Devido a isso o termo DNA “lixo” foi aplicado por muitos pesquisadores às sequências gênicas não codificantes de proteínas (POINTING; BELGARD, 2010). Um pensamento comum era de que essas sequências “extras”, como genes duplicados e sequências não codificantes, poderiam apresentar funcionalidade acumulando mutações sem que estas ocorressem em genes codificantes. E que devido ao tamanho do genoma humano, havia maior probabilidade dessas mutações ocorrerem em regiões não funcionais que em regiões codificantes.

No entanto, atualmente está claro que até 90% do genoma eucarioto é transcrito, gerando uma grande quantidade de RNAs sem capacidade codificadora, questionando assim o papel de mensageiro que foi aplicado ao RNA, onde este seria apenas um mensageiro entre DNA e proteína. Mais ainda, dados disponíveis atualmente demonstram que sítios de iniciação da transcrição em eucariotos podem ser promíscuos, e que a maior parte dos nucleotídeos do genoma humano estão associados a pelo menos um transcrito primário. (ENCODE Project Consortium et al., 2007).

Pode ser difícil distinguir RNAs codificantes e não-codificantes. Em eucariotos um transcrito codificante de proteína é comumente definido pela presença de uma fase aberta de leitura maior que 100 aminoácidos. No entanto, um RNA longo não codificante (lncRNA), por puro acaso, pode conter uma fase aberta de leitura como essa. Alguns lncRNAs bem caracterizados contêm fase aberta de leitura longas. Reciprocamente, proteínas menores que 100 aminoácidos também

podem ser traduzidas, com peptídeos tão pequenos quanto 11 aminoácidos, como foi demonstrado em *Drosophila melanogaster* (KONDO et al., 2007).

Tem sido explorada a observação de que a seleção favorece mutações sinônimas ao invés de não sinônimas para preservar o uso do códon, e isso tem ajudado a distinguir entre transcritos com fases de leitura aberta verdadeiras ao invés de falsas (LIN et al, 2007). Não obstante, apesar desses recentes avanços na anotação de transcritos, ainda não há uma definição clara de RNAs não codificantes. E portanto, ainda restam muitos transcritos ambíguos que exibem ambas as características codificantes e não-codificantes. Essas ambiguidades podem refletir na possibilidade de que a evolução desses genomas resultou na codificação em um espectro contínuo de transcritos e informações. (DINGER et al, 2008).

A extensa sobreposição de isoformas codificantes e não codificantes que sofrem *splicing* alternativo torna o problema de distinguir transcritos codificantes e não codificantes ainda mais confuso. E é possível que possa haver uma falsa dicotomia entre eles. Estudos que demonstraram que um lncRNA, RNA ativador de receptor esteroide (SRA), também codifica uma proteína funcional. O RNA mensageiro de *p53* pode ser outro exemplo de tal ocorrência, já que também exibe função na forma de RNA. Estes exemplos sugerem que transcritos podem potencialmente exibir funcionalidade a nível de RNA e ainda codificar uma proteína ou peptídeo funcional (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009).

Estes RNAs não codificantes podem ser agrupados em duas classes principais: pequenos RNAs não codificantes, possuindo menos de 200 nucleotídeos, e longos RNAs não-codificantes, possuindo mais de 200 nucleotídeos. Atualmente os RNAs não-codificantes mais estudados são os pequenos RNAs, sendo que dentro desta classe, os micro RNAs são os mais descritos.

Com os avanços das tecnologias de sequenciamento, tanto de DNA quanto de RNA, e análise das sequências geradas, pesquisadores têm gerado uma vasta gama de informações. A maioria destas sequências estão disponíveis em bancos de dados públicos (Tabela 1), como o NONCODE, e alguns possuem sequências de mais de 200.000 lncRNAs.

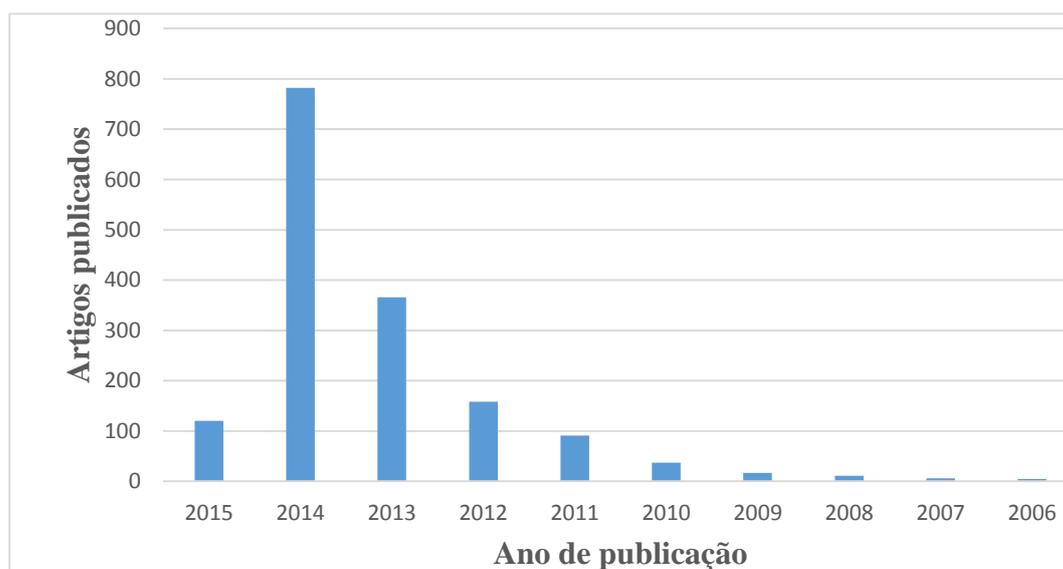
Tabela 1 - Principais bancos de dados públicos de lncRNAs

Banco de dados	Espécies	Website	Referências
fRNAdba	Múltiplas	http://www.ncrns.org.frnadbcatalog	Mituyama et al, 2009
GENCODE	Homem, camundongo	http://www.gencodegenes.org/	Derrien et al, 2012
LINCipedia	Homem	http://www.lncipedia.org/	Volders et al, 2013
NONCODE	Múltiplas	http://www.noncode.org/	Xie et al, 2014

Fonte: Do autor, 2015.

Mesmo que atualmente a literatura sobre RNAs não codificantes seja dominada por RNAs curtos, há um número crescente de estudos descrevendo lncRNAs. No entanto, houve um aumento abrupto de publicações nos últimos dois anos, considerando-se um espaço de dez anos (Figura 1). Atualmente há cerca de 1590 artigos disponíveis no PubMed (ver materiais e métodos para mais informações). Apesar disso, ainda é necessário grande investimento na área, desenvolvimento de novos métodos e formas de análises de dados são importantes. Por isso a divulgação ampla dos conhecimentos adquiridos até o momento é essencial para impulsionar novas descobertas na área.

Figura 1 - Publicações anuais



Fonte: PubMed. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 13 janeiro de 2015.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar uma revisão bibliográfica reunindo as informações mais recentes sobre a classe emergente de RNAs longos não codificantes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Esclarecer as definições e classificação dos RNAs longos não-codificantes;
- Reunir informações sobre suas características biológicas;
- Reunir os mecanismos funcionais e regulatórios sugeridos atualmente;
- Reunir os RNAs longos não codificantes mais caracterizados;

3 MANUSCRITO

RNA LONGO NÃO-CODIFICANTE: MECANISMOS, CARACTERÍSTICAS E FUNCIONALIDADES DO DNA “LIXO”

Priscila Caroline Thiago Dobbler, Paulo Marcos Pinto

RESUMO

RNAs longos não codificantes, podem ser primariamente definidos pelo seu tamanho. São transcritos não codificantes de no mínimo 200 nucleotídeos. RNAs longos não codificantes foram observados em diversas espécies, desde mamíferos a plantas, leveduras e vírus. É importante considerar que lncRNAs podem possuir pequenas fases de leitura aberta, o que dificulta muito a distinção entre RNAs codificantes e não codificantes. Portanto, não há uma definição exata do que se considera lncRNA. Estes transcritos podem ser classificados de acordo com sua localização relativa a genes codificantes de proteína no genoma. Apesar de haver um aumento no interesse por lncRNAs, pouco se sabe sobre seus mecanismos funcionais. Sabe-se que eles exercem função em todos os níveis da regulação gênica, no entanto os fatores envolvidos muitas vezes são desconhecidos. Nesta revisão reunimos as informações mais recentes sobre lncRNAs e os lncRNAs mais caracterizados.

PALAVRAS-Chave: RNA longo não-codificante. LncRNA. NcrRNA. RNA não-codificante.

INTRODUÇÃO

Análises de transcriptomas em larga-escala conduzidas no decorrer da última década, incluindo estudos recentes realizados pelo ENCODE (*Encyclopedia of DNA elements Consortium*) têm revelado que genomas de mamíferos são difusamente transcritos, mas não de forma indiscriminada, portanto, dando origem

a uma grande variedade de transcritos de RNAs codificantes e não codificantes (ncRNAs) (ENCODE Project Consortium et al, 2007). LncRNAs são observados em diversas espécies como: mamíferos (BROWN et al, 1992, CLEMSON et al, 1996), plantas (SWIEZEWSKI et al, 2009), leveduras (HOUSELEY et al, 2008), procariotos (BERNSTEIN et al, 1993) e até mesmo em vírus (REEVES et al, 2007).

O repertório celular de ncRNAs consiste de pequenos *housekeeping* RNAs, como os RNAs ribossomais (rRNA) e RNAs transportadores (tRNAs), microRNAs, e RNAs longos não codificantes (lncRNAs), incluindo RNAs anti-senso e RNAs *enhancer*. As funções de muitos destes são pouco conhecidas, mas há grande interesse em desvendar suas funções biológicas e mecanismos moleculares de ação. Nesta revisão, nós enfocamos nos lncRNAs, apresentando as informações mais atuais na descoberta, ações moleculares e funções biológicas.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Atualmente não há uma definição para RNAs longos não-codificantes (lncRNA em inglês) baseada em premissas biológicas e largamente aceita pela comunidade científica. A definição mais utilizada é baseada no comprimento do transcrito. Portanto lncRNAs são primariamente definidos como sendo transcritos não codificantes com no mínimo 200 nucleotídeos (MERCER et al, 2009; WILUSZ et al, 2009). Considera-se este tamanho por conveniência, ao utilizar esse limite mínimo os atuais protocolos de purificação de RNA são capazes de separar lncRNAs de pequenos RNAs (KAPRANOV et al, 2007; SUN; KRAUS, 2014).

No entanto, essa definição é por vezes arbitrária e não possui uma distinção biológica clara. Por isso foi sugerido por AMARAL et al (2011) definir lncRNAs como RNAs não-codificantes com no mínimo 200 nucleotídeos que apresentam funcionalidade como transcrito primário ou transcrito resultante de *splicing*.

O termo “não-codificante” também se mostra, de tal maneira, questionável. Alguns estudos sugerem que lncRNAs podem recrutar ribossomos e produzir pequenos peptídeos (INGOLIA et al, 2011), enquanto outros demonstram que lncRNAs não codificam proteínas (GUTTMAN et al, 2013). Além do potencial de

codificação limitado, lncRNAs não apresentam códons de iniciação típicos, regiões 3' não traduzidas e códons de terminação.

Ainda assim, há a possibilidade de um lncRNA codificar um peptídeo e ainda apresentar funcionalidade independente de codificação como demonstrado por LANZ et al (1999) por meio do RNA ativador do receptor de esteroides (SRA), um lncRNA bem caracterizado envolvido na regulação de expressão gênica mediada pelo receptor nuclear (NR). O gene *SRA* produz um RNA não-codificante funcional, bem como uma variante codificadora de proteína (CHOONIEDASS-KOTHARI et al, 2004), estas características tornam difíceis as classificações destes RNAs.

Contradizendo estudos anteriores, HEESH et al (2014) demonstrou que lncRNAs estão presentes em todos os compartimentos celulares, largamente associados a ribossomos no citoplasma, e sugere que lncRNAs têm um espectro de funções maiores que o antecipado.

CONSERVAÇÃO E EVOLUÇÃO

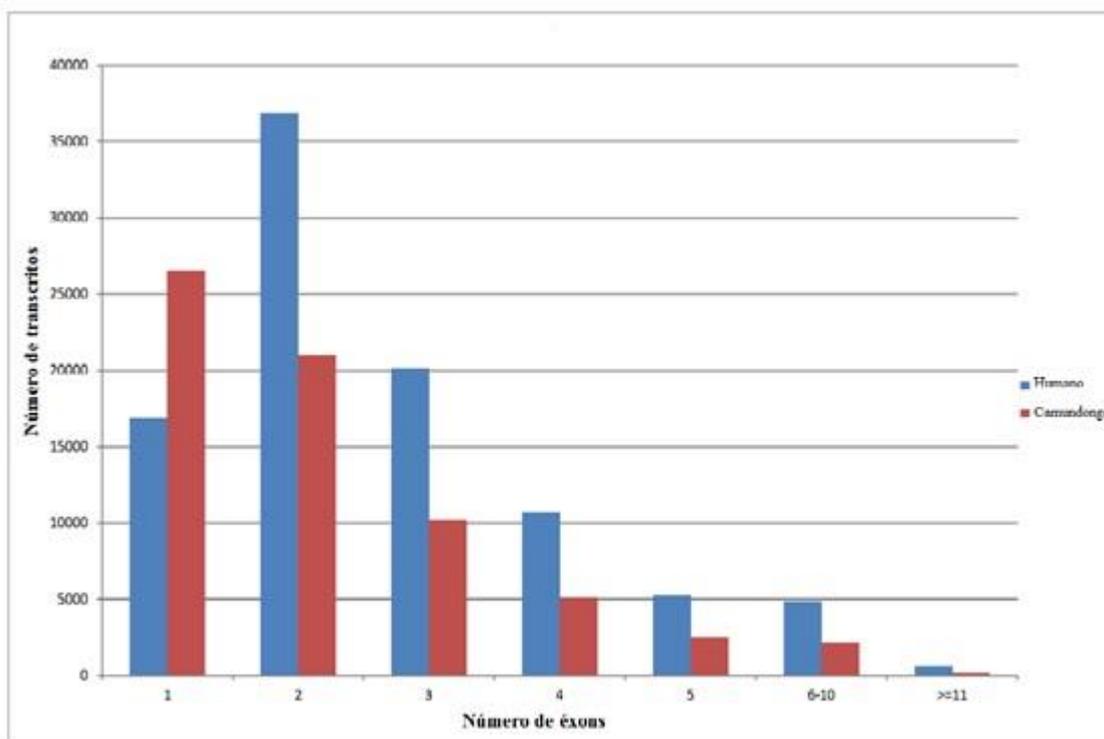
Atualmente não há um consenso quanto à conservação e evolução dos lncRNAs. Sabe-se que lncRNAs são pouco conservados quando comparados com outros RNAs não-codificantes mais estudados, como miRNAs (micro RNAs de interferência) e snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares) normalmente são pouco expressos, tornando-os difíceis de distinguir de interferências transcricionais (MERCER et al, 2009; PANG et al, 2006).

Sugere-se que alguns lncRNAs são pouco conservados, mesmo entre espécies com fisiologia semelhante, como camundongos e humanos. Os dados reunidos por Xie et al (2014) demonstram que a maior parte dos transcritos lncRNAs, verificados até hoje em camundongos, são originados de apenas um éxon, enquanto que a maioria dos lncRNAs humanos provém de dois exons (Figura 2). Alguns autores sugerem que a funcionalidade dos lncRNAs está relacionada com suas estruturas secundárias e não exclusivamente às suas sequências (SUN; KRAUS, 2014).

No entanto, com certa contradição a Xie et al (2014), GUTTMAN et al (2009) demonstrou que há grande relação evolutiva entre cerca de 1.400 RNAs longos multi-exônicos não-codificantes, e quatro tipos de células de camundongos.

Mais ainda, regiões de dezenas a centenas de nucleotídeos extremamente conservadas foram encontradas em regiões não codificantes no genoma de todas as espécies pertencentes ao reino *Metazoa* (HARMSTON; BAREŠIĆ; LENHARD, 2013).

Figura 2 - Número de distribuição de éxons presentes nos transcritos lncRNAs.



Fonte: Adaptado de: ZHANG et al, 2014.

Levando essas informações em consideração, é possível que a conservação estrutural e posicional se mostrem mais importantes que a conservação das sequências em si (WASHIETL; KELLIS; GARBER, 2014).

BIOSSÍNTESE E ORIGEM DE LNCRNAs

A biogênese dos lncRNAs é similar a dos RNAs codificantes de proteínas. lncRNAs são transcritos principalmente pela RNA Polimerase II e alguns são transcritos pela RNA Polimerase III, portanto, a maioria dessas moléculas são poliadeniladas, possuem a estrutura CAP 5' e sofrem *splicing* (DU TOIT, 2013; CARNINCI et al, 2005; KAPRANOV et al, 2007).

A presença da cauda poliA ajuda a estabilizar o transcrito e preservar sua funcionalidade. Mais ainda, CARNINCI et al (2005) demonstrou que lncRNAs podem sofrer *splicing* alternativo e mesclar éxons de diversos genes codificantes de proteínas, e assim integrando diferentes estruturas gênicas e originando transcritos ambíguos.

Essas moléculas ainda exibem atividade de ativação transcricional similar a dos RNAs mensageiros (DERRIEN et al, 2012), no entanto quantitativamente diferente. Foi demonstrado que na ausência de Dicer houve diminuição na transcrição de centenas de lncRNAs. Dicer está envolvida na biossíntese de microRNAs controlada por uma via regular Dgcr8-Dicer, esta via suporta uma iniciação de transcrição e alongação robusta (ZHENG et al, 2014).

lncRNAs também apresentam modificações de histonas que indicam transcrição gênica ativa, apresentam o promotor marcado com tri-metilação da lisina 4 da histona H3 [H3K4me3] e a região transcrita marcada com tri-metilação da lisina 36 da histona H3 [H3K36me3] (GUTTMAN et al, 2009).

De acordo com PONTING et al (2009) lncRNAs podem ter origem de: (a) transcrição de gene codificante de proteína em que houve quebra de leitura; (b) recombinação cromossômica facilitada ao longo da fase de leitura; (c) transcrição de fatores como retrotransposons e (d) transcrição de sequências repetidas em *tandem*.

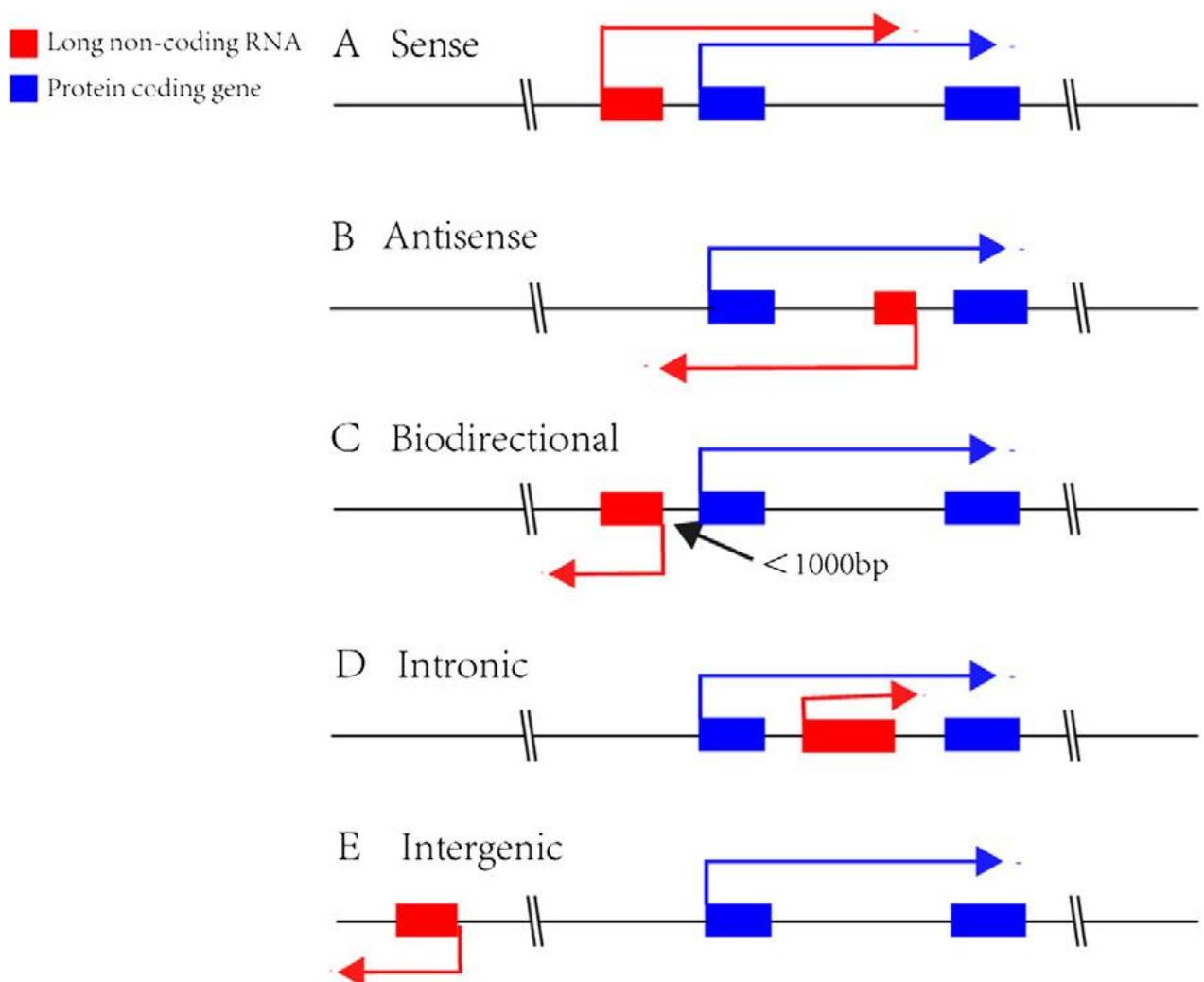
A inserção de elementos transponíveis, como retrotransposons, em uma nova região codificadora pode gerar novas formas de *splicing* alternativo e com isso gerando novos transcritos. Essas alterações podem ser por retenção de íntrons ou, pela doação ou ganho de sítios de *splicing*. Acredita-se que *splicing* alternativo derivado de elementos transponíveis tenha participação na evolução de primatas e radiação humana, e portanto pode se mostrar umas das principais fontes de lncRNAs (AYARPADIKANNAN et al, 2015).

CLASSIFICAÇÃO

Para facilitar a troca de informações entre pesquisadores, é importante estabelecer um sistema de classificação. Pensando nisso, PONTING; OLIVER; REIK (2009) sugeriram um sistema de classificação que leva em consideração a posição do lncRNA relativa à posição de regiões codificadoras de proteínas, e que

vem sendo usado desde então. Portanto, lncRNAs podem ser classificados em: (a) senso; (b) anti-senso: lncRNAs que estão localizados na mesma fita ou na fita oposta aos genes codificantes de proteínas mais próximos; (c) bidirecional: lncRNAs que estão localizados na fita oposta a um gene codificante de proteínas, cujo a transcrição é iniciada a menos de 1000 nucleotídeos de distância; (d) intrônico: lncRNAs que se localizam dentro de íntrons de um gene codificante de proteína; e (e) intergênico: lncRNAs que se localizam na região entre dois genes codificantes de proteínas (Figura 3).

Figura 3 – Classificação de lncRNAs em relação a região codificadora de proteínas. (A) lncRNA senso. (B) lncRNA anti-senso. (C) lncRNA bidirecional. (D) lncRNA intrônico. (E) lncRNA intergênico.



Fonte: ZHANG et al, 2014.

MECANISMOS FUNCIONAIS

LncRNAs podem atuar de diversas formas, até o momento estas moléculas foram descritas agindo como: (a) guia; (b) modificadoras de estruturas da cromatina, por interação com proteínas associadas com DNA; (c) reguladoras transcricionais, afetando interações da RNA polimerase e fatores de transcrição; (d) *scaffolds*, recrutando múltiplas proteínas formando complexos ribonucleo-protéicos; e (e) *decoy* (artefato), ligando-se a alvos e impedindo que estes se liguem ao alvo original. Um lncRNA pode agir utilizando mais de um mecanismo (PONTING; OLIVER; REIK, 2009).

CIS-LNCRNAS E TRANS-LNCRNAS

Estes lncRNAs são ditos funcionais em *trans* quando regulando genes distantes ou alvos moleculares distantes, e são ditos funcionais em *cis* quando regulam genes próximos de onde esse lncRNA é transcrito (PONTING; OLIVER; REIK, 2009).

É plausível que *cis*-lncRNAs exerçam função através de interferência transcricional ou modificações na cromatina. Quanto à regulação transcricional, lncRNAs podem influenciar a atividade transcricional de genes-alvo através da ligação ao promotor, impedindo a formação do complexo de pré-iniciação, ou por ligação a complexos de transcrição. Estes lncRNAs podem ser transcritos das regiões promotoras dos genes aos quais exercem regulação. Como por exemplo, os transcritos da região *upstream* do gene *DFHR*. LncRNAs da região promotora de *DFHR*, de aproximadamente 0,8-7,3 kb de comprimento, podem formar estruturas tríplex estáveis com o promotor de *DFHR* e interagir com TFIIB (fator de transcrição presente no complexo de iniciação da RNA polimerase II), que eficientemente desassocia o complexo de pré-iniciação (MARTIANOV et al, 2007).

Cis-lncRNAs que exercem função através da modificação de cromatina geralmente recrutam complexos modificadores de cromatina, como por exemplo,

complexo repressivo *polycomb* (PRC) ou pequenos complexos de desacetilação de histonas Rpd3 (Rpd3S HDAC). O complexo de modificação de cromatina mais estudado é o PRC e um exemplo bem conhecido é *Xist* (Transcrito inativo-específico de X), um lncRNA de 19 kb em humanos, o qual interage com PRC2 para induzir a modificação H3K27m3, o que leva ao silenciamento transcricional de genes do cromossomo X (MAENNER et al, 2010).

Embora possa ser mais fácil para um lncRNA influenciar genes mais próximos, provavelmente baseada na complementariedade de sequência ao *locus* do qual eles são transcritos, lncRNAs também podem exercer sua regulação em *trans* em genes-alvo distantes.

Um exemplo de um lncRNA agindo em *trans* é o lncRNA *HOTAIR* (RNA intergênico anti-senso do tipo HOX) de aproximadamente 2,2 kb, transcrito do *locus HOXC* (*cluster homeobox C*) no cromossomo 12. *HOTAIR* pode ser transportado pela proteína Suz-Twelve para regular regiões homólogas no *locus HOXD* (*cluster homeobox D*) no cromossomo 2 (RINN et al, 2007). *HOTAIR* pode se ligar a diversos outros *loci* que tendem a ter um motivos de DNA específicos e influenciar expressão gênica recrutando complexos modificadores de cromatina (CHU et al, 2011).

MECANISMOS DE REGULAÇÃO

Embora apenas um pequeno número de lncRNAs são bem documentados, estudos realizados até os dias atuais sugerem que lncRNAs podem estar relacionados a quase todos as fases da regulação de expressão gênica, transcricional, pós-transcricional e traducional. Acredita-se que lncRNAs estão envolvidos em uma variedade de funções moleculares e celulares (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009).

REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL

A transcrição é um processo muito bem regulado em eucariotos, e é sugerido que lncRNAs tornam esse processo ainda mais coeso. LncRNAs podem regular a transcrição gênica por modificações na cromatina ou interferências na transcrição.

1. MODIFICAÇÃO DE CROMATINA

A regulação epigenética ocorre por modificações estruturais da cromatina, alterando assim a função do genoma. Tais modificações controlam expressão gênica que contribui para o estabelecimento, manutenção e mudanças dinâmicas nas propriedades celulares. Apesar do recente enfoque dado aos lncRNAs, o envolvimento dessas moléculas com *imprinting* gênico foi descrito há mais de uma década.

Xist (Transcrito inativo-específico X) foi o primeiro lncRNA descoberto estar envolvido na regulação epigenética (CLEMSON et al, 1996). *Xist* é o regulador-mestre da inativação do cromossomo X em mamíferos, é transcrito exclusivamente do cromossomo X inativo, e é responsável por iniciar e manter a inativação do cromossomo X.

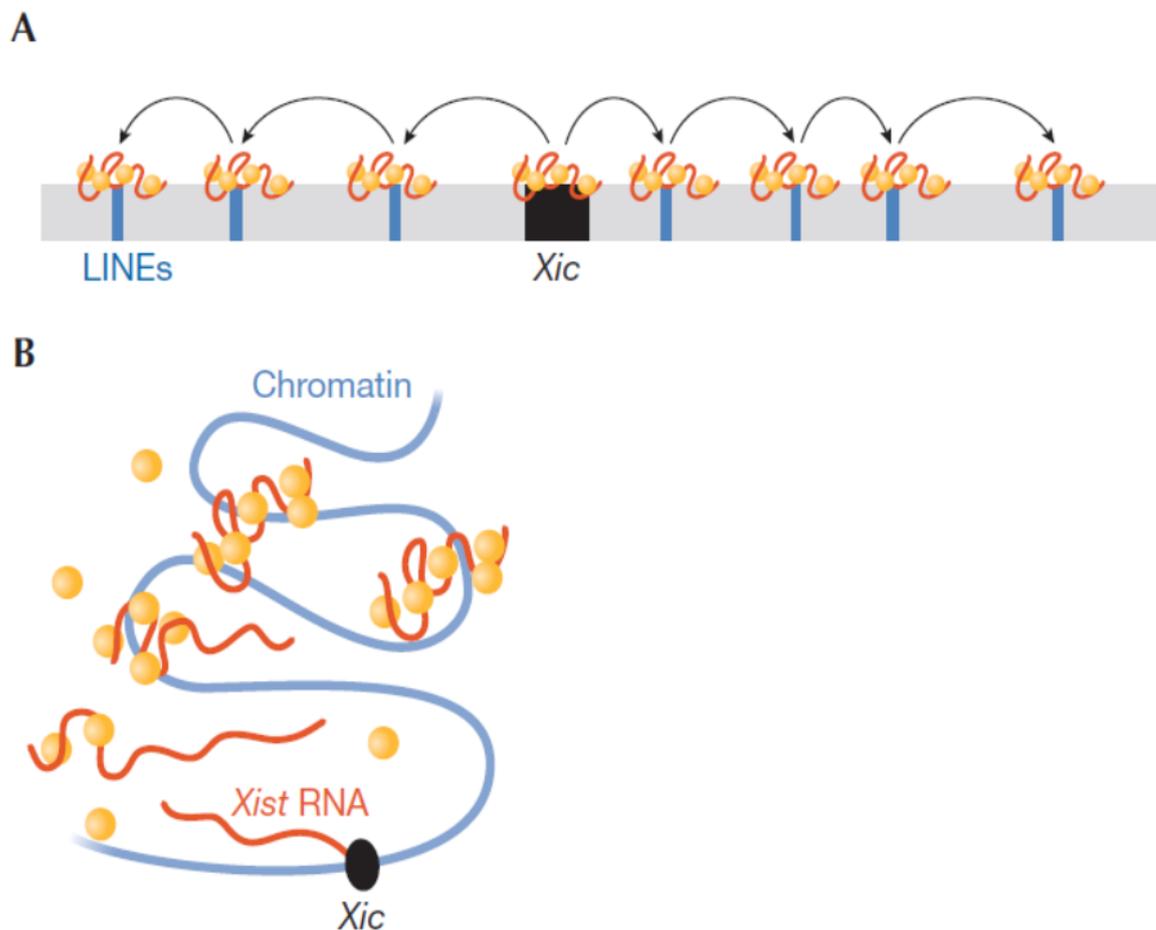
A inativação do cromossomo X representa um mecanismo modelo para o entendimento das funções dos lncRNAs. Além disso, foi descrito que *Xist* interage com diversos outros lncRNAs durante a inativação de X, o que pode demonstrar o grande potencial regulatório dos lncRNAs. O ncRNA *Tsix* é transcrito do cromossomo X ativo e regula negativamente a expressão de *Xist*. O lncRNA *Jpx* é transcrito do centro de inativação de X (*Xic*) e liga-se a região promotora de *Xist* regulando o positivamente (PONTIER; GRIBNAU, 2011). *Xist* foi o primeiro lncRNA identificado a interagir com proteínas do grupo *Polycomb*, do tipo PRC2 (complexo *polycomb* repressor 2), o que incentivou maiores pesquisas na regulação epigenética da expressão gênica mediada por lncRNAs (MARCHESE; HUARTE, 2014).

Ng et al (2007) sugere dois modelos principais para demonstrar como *Xist* propaga a inativação do cromossomo X (Figura 4). Baseando-se na observação de que a propagação e manutenção do silenciamento de X promovida por *Xist* é menos eficiente fora do cromossomo X, foi sugerido haver “estações” ao longo de X para impulsionar o silenciamento. Devido à alta concentração de elementos nucleares intercalados longos (LINEs), um grupo de retrotransposons, no cromossomo X, essas regiões foram propostas como candidatas a impulsores do silenciamento

propagado por *Xist*. No entanto o mecanismo destes elementos impulsores ainda necessitam mais esclarecimentos.

Outro modelo sugerido é que a propagação de *Xist* é baseada na presença de sequências redundantes ao longo do cromossomo X. O modelo sugere que estas sequências consistem em diversos sítios de ligação fracos que facilitam a ligação de diversos fatores a cromatina de forma coordenada. A ligação de um fator facilita a ligação de outro fator, e resultando em complexo estável (Figura 4B). Essa interação coordenada promove a propagação de *Xist* do seu sítio de transcrição, onde uma alta concentração de *Xist* é prevista promover nucleação por ligação de cromatina (Ng et al, 2007).

Figura 4 - Modelos de ação do lncRNA *Xist* sobre o cromossomo X. *Xist* em vermelho, fatores proteicos que foram sugeridos interagir com *Xist* em laranja, Centro de inativação de X (*Xic*), Elemento Nuclear Intercalado Longo (LINE). (A) Propagação de *Xist* pelo cromossomo a ser inativado impulsionada por “boosters”. (B) Propagação de *Xist* baseado em um mecanismo de ligação associativa. *Xist* se propaga do seu sítio de transcrição, onde a alta concentração de RNA foi predita nuclear ligações de cromatina



Fonte: Adaptado de: Ng et al, 2007.

HOTAIR (RNA intergênico anti-senso do tipo HOX) é outro importante lncRNA envolvido na modificação de cromatina como forma de regulação gênica, (Figura 5.A). Ele está envolvido em processos de desenvolvimento e interage com complexos modificadores de cromatina PRC2 para promover silenciamento gênico. PRC2 é provavelmente o complexo modificador de cromatina envolvido com lncRNAs mais estudado.

HOTAIR regula o silenciamento transcricional dos genes do *locus HOXD* e outros *loci* gênicos através da ligação do região terminal 5' a PRC e deslocamento de PRC ao *locus* específico aonde ocorre a metilação e silenciamento epigenético da expressão gênica.

Mais ainda, *HOTAIR* interage com outro complexo modificador de cromatina, demetilase lisina-específica1 (LSD1) - complexo *CoREST*, que media a remoção da mono- e di-metilação de H3K4 nos nucleossomos. A mono- e di-metilação de H3K4 nos nucleossomos é um marcador associado com ativação gênica (CHU et al, 2011). Portanto, é aparente que *HOTAIR* é capaz de funcionar não somente como um lncRNA guia, mas também como um *scaffold*, já que demonstrou habilidade de ligar e aproximar dois complexos que cooperam em estabelecer um estado de repressão na cromatina.

2. INTERFERÊNCIA NA TRANSCRIÇÃO

Uma grande variedade de lncRNAs foram reportados exercer seu papel na regulação gênica através de interferências na transcrição. LncRNAs participando na regulação da transcrição podem: ligar-se ao DNA, impedindo a ligação de fatores de transcrição; regular a expressão de fatores de transcrição; ou atuando como co-ativador/repressor.

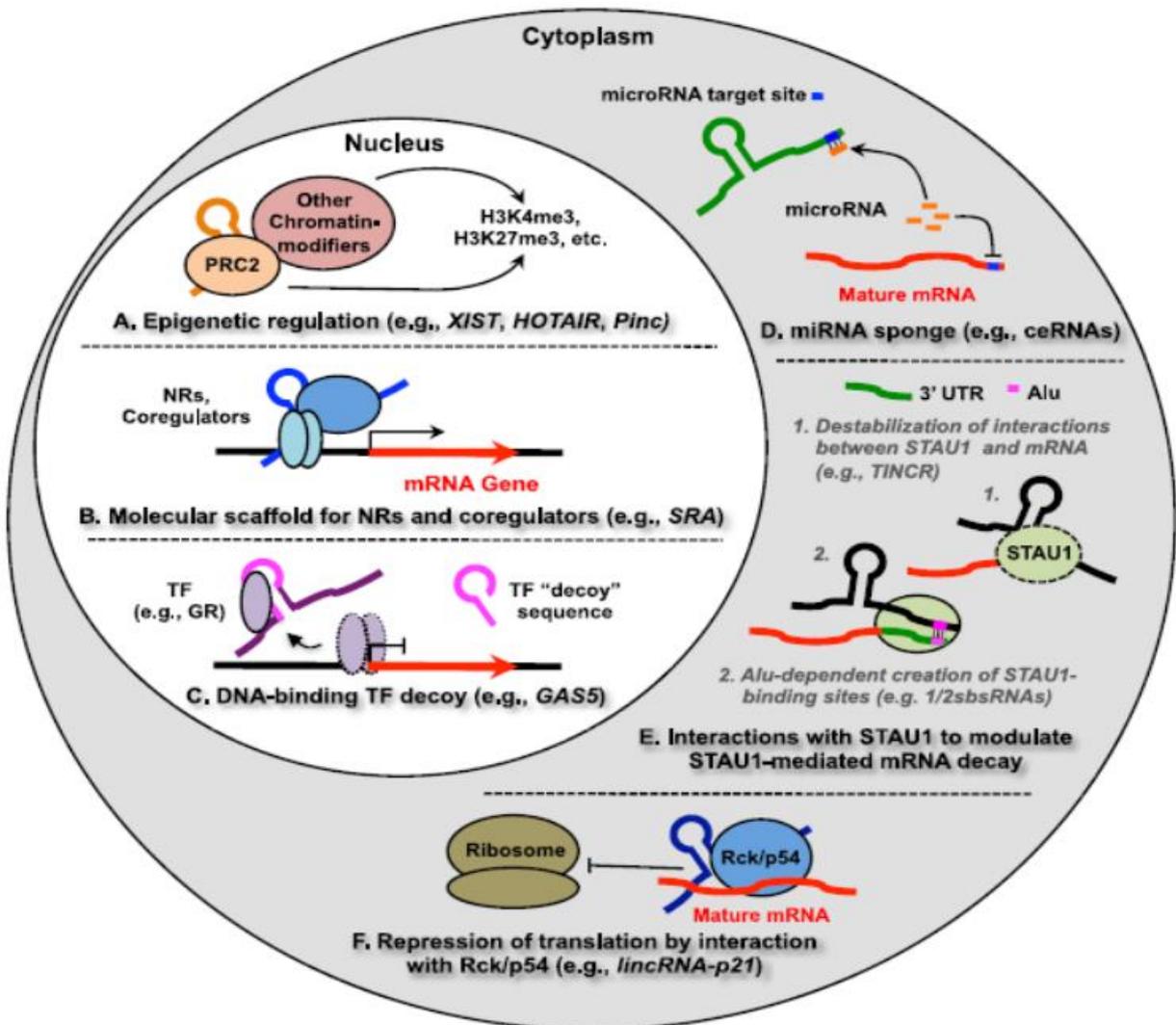
O lncRNA *SRA*, citado anteriormente, é um exemplo de um lncRNA interagindo com fatores de transcrição (Figura 5.B). *SRA* foi inicialmente descrito como um transcrito expresso especificamente em tecidos-alvo de hormônios esteroides, funcionando como um receptor esteroideal co-ativador. *SRA* interage com receptores esteroidais co-ativadores 1 e 2 (SRC-1 e SRC-2) e facilita trans-ativação dependente de ligantes.

Foi demonstrado que essa ação de *SRA* ocorre independentemente da tradução de produtos proteicos (LANZ et al, 1999). Atualmente já se tem conhecimento da interação de outros fatores envolvendo co-ativadores, como por exemplo, p68, p72, PUS1p e PUS3p, e componentes do Complexo RISC, demonstrando o escopo de funções de *SRA*.

O lncRNA *GAS5* foi localizado tanto no citoplasma quanto no núcleo, no entanto a presença no núcleo foi mais proeminente. Na presença de dexametasona, *GAS5* se liga ao sítio de ligação de DNA do receptor de glicocorticoide (GR) agindo como um “decoy” (Figura 5.C). Portanto, impedindo transcrição de genes endógenos responsivos-glicocorticóide induzida por GR (ZHANG et al, 2014).

Foi descrito que a super expressão de *GAS5* em linhagens celulares aderentes humanas suprime crescimento e promove apoptose. Mais ainda, foi registrado baixos níveis de *GAS5* em câncer de mama, o que pode sugerir *GAS5* como supressor tumoral (SUN; KRAUS, 2014).

Figura 5 - Mecanismos Funcionais dos lncRNAs. lncRNAs podem exercer regulação gênica no citoplasma e núcleo através de: (A) Interações com complexos modificadores de cromatina alterando modificações epigenéticas. (B) Interações com fatores de transcrição e correguladores transcripcionais alterando a atividade regulatória destes fatores. (C) Interações com fatores de transcrição impedindo os de interagir com sequências de DNA. (D) “Absorve” microRNAs diminuindo interações de microRNAs com RNAs mensageiros alvos. (E) Interações com STAU1 modulando o decaimento de RNAs mensageiros. (F) Interações com proteínas RNA-ligantes e regulando a tradução de RNAs mensageiros alvos.



REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL

A habilidade de ncRNAs de reconhecer sequências complementares também permite interações altamente específicas, são responsáveis por regular diversas etapas no processamento pós-transcricional de mRNAs. Há uma tendência em acreditar que lncRNAs está na maioria das vezes envolvido na regulação transcricional. No entanto, mesmo que inicialmente uma grande parte do lncRNAs exerciam tal papel, alguns lncRNAs estão ou localizados exclusivamente no citoplasma, ou em maior quantidade (SUN; KRAUS, 2014).

Um número considerável de lncRNAs foram demonstrados exercer função como RNAs competidores endógenos (ceRNAs), os quais funcionam em diversos modelos celulares como “esponjas”, que podem se ligar e reduzir os efeitos causados microRNAs em mRNAs (Figura 5.D).

Um exemplo de tal mecanismo é o ceRNA *linc-MD1*, o qual “absorve” os microRNAs *miR-133* e *miR-135* no intuito de controlar a transcrição de fatores de transcrição MAML e MEF2C. Estes fatores de transcrição ativam a expressão de um programa gênico muscular específico, o qual é responsável pela manutenção da identidade tecidual (MERCER et al, 2009).

Outro mecanismo de regulação pós-transcricional é o controle do decaimento de mRNAs (Figura 5.E). Como citado anteriormente, lncRNAs foram encontrados associados a diversas proteínas no citoplasma. Um exemplo são os *half-STAU1-binding site* RNAs, os quais foram demonstrados *trans*-ativar a ligação da proteína STAU1 ao mRNA alvo para facilitar o decaimento do mRNA. STAU1 está associada ao retículo endoplasmático rugoso, e utiliza a rede de microtubulos no transporte de mRNAs (PONTING; OLIVER; REIK, 2009).

Entretanto, *TINCR*, outro lncRNA que também se liga a STAU1, exhibe funcionalidade ao estabilizar diferenciação de mRNAs de forma STAU1-dependente (SUN; KRAUS, 2014).

Foi demonstrado que HuR, uma proteína ligante de RNA citoplasmática, é enriquecida no citoplasma juntamente com o lncRNA *lincRNA-p21* e que essa interação acelera a degradação de *lincRNA-p21*. Com a degradação do lncRNA um conjunto de mRNAs tiveram a expressão diminuída. Na ausência de Hur, *lincRNA-p21* é estável, acumula-se e associa-se a helicase DEAD box Rck/p54 (Figura 5.F).

Rck/p54 promove a associação de lincRNA-p21 com os mRNAs de CTNNB1 e JUNB, reprimindo a tradução destes através de um mecanismo que inclui tramanho do polissomo reduzido, sugerindo um papel adicional do *lincRNA-p21* citoplasmático como um inibidor pós-transcricional da tradução (ZHANG et al, 2014; MERCER; DINGER; MATTICK, 2009).

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa do número de publicações foi realizada utilizando-se da ferramenta pesquisa avançada do PubMed. Para verificar o número de artigos publicados, seguintes termos foram utilizados: “lncRNA”, “long noncoding RNA”, “lncRNAs”, e por fim “long noncoding RNAs”. Os termos foram separados por “OR” (OU), e a presença destes termos restrita ao título ou resumo dos artigos. A pesquisa gerou um total de 1593 publicações, e demonstra que o termo “long noncoding RNA” (RNA longo não codificante) foi utilizado pela primeira vez em 2006.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O advento do sequenciamento total de transcriptomas e o projetos de mapeamento de transcritos em larga escala, têm mudado as perspectivas de funcionalidade, variedade e quantidade de lncRNAs. Estudos caracterizando lncRNAs mostram que estas moléculas exercem papel principal em diversos aspectos da fisiologia, e patologias. Mesmo com os avanços e crescente interesse na área, por parte dos pesquisadores, ainda resta muito a ser desvendado. No entanto novas tecnologias de sequenciamento e ensaios de co-localização devem ser aprimorados, bem como os métodos de anotação e análises de sequências.

5 REFERÊNCIAS

AMARAL, P. P.; CLARK, M. B.; GASCOIGNE, D. K.; et al. **lncRNAdb**: a reference database for long noncoding RNAs. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1138>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

AYARPADIKANNAN, S.; LEE, H. E.; HAN, K.; et al. **Transposable Element-Driven Transcript Diversification and Its Relevance to Genetic Disorders**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.039>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2015.

BERNSTEIN, H. D.; ZOPF, D.; FREYMAN, D. M.; WALTER, P. **Functional substitution of the signal recognition particle 54-kDa subunit by its Escherichia coli homolog**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.11.5229>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

BROWN, C. J.; HENDRICH, B. D.; RUPERT, J. L.; et al. **The human XIST gene**: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90520-M](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90520-M)>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

CARNINCI, P.; KASUKAWA, T.; KATAYAMA, S.; et al. **The transcriptional landscape of the mammalian genome**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141072>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

CHOONIEDASS-KOTHARI, S.; EMBERLEY, E.; HAMEDANI, M. K.; et al. **The steroid receptor RNA activator is the first functional RNA encoding a protein**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15147866>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

CHU, C.; QU, K.; ZHONG, F. L.; et al. **Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.027>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

CLEMSON, C. M.; McNEIL, J. A.; WILLARD, H. F.; et al. **XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase**: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.132.3.259>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

DERRIEN, T.; JOHNSON, R.; BUSSOTTI, G.; et al. **The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gr.132159.111>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

DERRIEN, T.; JOHNSON, R.; BUSSOTTI G, et al. **The GENCODEv7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression.** *Genome Res.* 2012;22(9):1775–1789.

DINGER, M. E.; PANG, K. C.; MERCER, T. R.; MATTICK, J. S. **Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities.** Disponível em: <<http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000176#pcbi-1000176-g001>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

DU TOIT, A. **Non-coding RNA: RNA stability control by Pol II.** Disponível em: <<http://www.nature.com/nrm/journal/v14/n3/full/nrm3521.html>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

ENCODE, Project Consortium. **Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project.** Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v447/n7146/abs/nature05874.html>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

FRANCESCO, P.; MARCHESE & MAITE, Huarte. **Long non-coding RNAs and chromatin modifiers.** Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/epi.27472#.VLdHOXv0_hg>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

GUTTMAN, M.; AMIT, I.; GARBER, M.; FRENCH, C.; et al. **Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature07672>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

GUTTMAN, M.; RUSSELL, P.; INGOLIA, N. T.; et al. **Ribosome Profiling Provides Evidence that Large Noncoding RNAs Do Not Encode Proteins.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413007113>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

HARMSTON, N.; BAREŠIĆ, A.; LENHARD, B. **The mystery of extreme non-coding conservation.** Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/368/1632/20130021>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

HOUSELEY, J.; RUBBI, L.; GRUNSTEIN, M.; et al. **A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.027>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

INGOLIA, N. T.; LAREAU, L. F.; WEISSMAN, J. S. **Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes.** Disponível em:

<<http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674%2811%2901192-5>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

KAPRANOV, P.; CHENG, J.; DIKE, S.; et al. **RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription.** Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/316/5830/1484.short>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

KONDO, T.; et al. **Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486114>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

LANZ, R. B.; McKENNA, N. J.; ONATE, S. A.; et al. **A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10199399>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

LIN, R.; MAEDA, S.; LIU, C.; et al. **A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16878148>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

LOURO, R.; EL-JUNDI, T.; NAKAYA, H. I.; et al. **Conserved tissue expression signatures of intronic noncoding RNAs transcribed from human and mouse loci.** Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754308000827>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

MAENNER, S.; BLAUD, M.; FOUILLEN, L.; et al. **2-D structure of the A region of Xist RNA and its implication for PRC2 association.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000276>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

MARTIANOV, I.; RAMADASS, A.; SERRA, Barros A.; et al. **Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature05519>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. **Long non-coding RNAs: insights into functions.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2521>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

SUN, M.; KRAUS, W. L. **From Discovery to Function: The Expanding Roles of Long Non-Coding RNAs in Physiology and Disease.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25426780>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

MITUYAMA T, YAMADA K, HATTORI E, et al. **The Functional RNA Database 3.0**: databases to support mining and annotation of functional RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(Database issue):D89 –92.

NG, K.; PULLIRSCH, D.; LEEB, M.; et al. **Xist and the order of silencing**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038%2Fsj.embor.7400871>. Acesso em 24 de janeiro de 2015

PANG, K. C.; FRITH, M. C.; MATTICK, J. S. **Rapid evolution of noncoding RNAs**: lack of conservation does not mean lack of function. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2005.10.003>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

PONTIER, D. B.; GRIBNAU, J. **Xist regulation and function explored**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-011-1008-7>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

PONTING, C. P.; BELGARD, T. G. **Transcribed dark matter: meaning or myth?** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798109>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

PUBMED. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

REEVES, M. B.; DAVIES, A. A.; McSHARRY, B. P.; et al. **Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1142984>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

RINN, J. L.; KERTESZ, M.; WANG, J. K.; et al. **Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

SWIEZEWSKI, S.; LIU, F.; MAGUSIN, A.; DEAN, C. **Cold induced silencing by long antisense transcripts of an Arabidopsis Polycomb target**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08618>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

VAN HEESCH, S.; VAN ITERSON, M.; JACOBI, J.; et al. **Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono- and polyribosomal complexes**. Disponível em: <http://genomebiology.com/2014/15/1/R6>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

VICTORIA, A.; MORAN, V. A.; RANJAN, J.; et al. **Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs**. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/content/40/14/6391.short>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

VOLDERS PJ, HELSENS K, WANG X.; et al. **LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures.** Nucleic Acids Res. 2013.

WASHIETL, S.; KELLIS, M.; GARBER, M. **Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals.** Disponível em: <<http://genome.cshlp.org/content/24/4/616.short>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

WILUSZ, J. E.; SUNWOO, H.; SPECTOR DL. **Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/gad.1800909>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

ZHANG, K. et al. **The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene>>. Acesso em 13 de Janeiro de 2014.

ZHENG, G. X.; DO, B. T.; WEBSTER, D. E. **Dicer-microRNA-Myc circuit promotes transcription of hundreds of long noncoding RNAs.** Disponível em: <<http://www.nature.com/nsmb/journal/v21/n7/full/nsmb.2842.html>>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

.