

PROMOVE FACULDADE DE TECNOLOGIA

LUDMILA MAMELUQUE CAIRES

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO RNAs REGULATÓRIOS DE GENES ENVOLVIDOS  
NA DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL**

BELO HORIZONTE  
2017

LUDMILA MAMELUQUE CAIRES

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRO RNAs REGULATÓRIOS DE GENES ENVOLVIDOS  
NA DEGENERAÇÃO DO DISCO INTERVERTEBRAL**

Dissertação apresentada no programa de Pós Graduação da Faculdade Promove como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia da Informação Aplicada à Biologia Computacional.

**Orientadora:** Dra.: Fabiana Alves

BELO HORIZONTE  
2017

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me deu sabedoria, saúde e coragem para enfrentar grandes desafios.

A minha filha (Júlia Mameluque) que mesmo tão pequenina soube entender minha ausência.

A minha mãe Ivone Mameluque que sempre me apoia e incentiva.

As minhas irmãs Luciana e Fabíula, companheiras e parceiras.

A todos os familiares.

A professora Fabiana Alves que me fez admirar ainda mais a Biologia.

A Faculdade Promove que me proporcionou a realização de um sonho.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Esta pesquisa tem como objetivo analisar os principais microRNAs regulatórios de genes envolvidos na degeneração do disco intervertebral. O disco intervertebral é uma estrutura complexa que estabiliza os corpos vertebrais, permitindo movimentos articulares, absorção e dissipação de impactos mecânicos impostos à coluna vertebral. A degeneração do disco intervertebral está relacionada ao envelhecimento, mas tem etiologia multifatorial como efeitos ambientais, traumas, hábitos de vida, tabagismo, consumo de álcool e fatores genéticos. Estudos recentes têm demonstrado a participação de alguns genes nesta patologia e a relação de microRNAs na regulação destes genes. Trata-se de uma pesquisa do tipo aplicada. Como técnica utilizou-se a pesquisa bibliográfica para identificar os principais genes relacionados à degeneração do disco intervertebral no período de 1985 a 2015. Utilizou-se os programas Target Scan e microRNA.org selecionou-se os microRNAs relacionados à regulação dos genes identificados. Obteve-se as sequências dos mesmos no mirbase-Targets. A identidade dos microRNAs e seus alvos foi verificada após o alinhamento global realizado no Clustal Omega. Foram selecionados microRNAs com identidade maior ou igual a 50% e as regiões alvos destes nos seus respectivos mRNAs foram verificadas nos gráficos disponibilizados pelo NCBI nucleotide. Sobressai-se do estudo que Os principais genes identificados no referencial teórico no período avaliado, envolvidos no processo degenerativo do disco intervertebral foram: *ACAN* (AGRECAN), *VDR* (receptor da vitamina D), *COL9A2* (colágeno tipo IX alfa 2) e *COL9A3* (colágeno tipo IX alfa 3), que codificam o colágeno tipo IX, *IL1A* (interleucina-1 alfa), *IL1B* (interleucina 1 beta) e *MMP-3* (estromelina-1) e os principais microRNAs relacionados à regulação dos mesmos, foi possível identificar *in silico* os microRNAs reguladores dos genes responsáveis pela degeneração do disco intervertebral e serão necessários estudos laboratoriais para validação dos mesmos.

**Palavras-chave:** Disco intervertebral. Degeneração. Fisioterapia. Diagnóstico.

## ABSTRACT

The intervertebral disc is a complex structure that stabilizes the vertebral bodies, allowing joint movements, absorption and dissipation of mechanical impacts on the vertebral column. Degeneration of the intervertebral disc is related to aging, but has multifactorial etiology such as environmental events, traumas, life habits, smoking, alcohol consumption and genetic factors. Recent studies have shown a participation of some genes in this pathology and a relation of microRNAs in the regulation of these genes. The aim of the study was identified by the major regulatory microRNAs involved in degeneration of the intervertebral disc. A literature review was conducted to identify the main genes related to degeneration of the intervertebral disc between 1985 and 2015. Using the programs Target Scan and microRNA.org, the microRNAs related to the regulation of the identified genes were selected. Were obtained the sequences in the mirbase-Targets. The identity of the microRNAs and their targets was verified after the global alignment performed on Clustal Omega. MicroRNAs with 50% or greater identity were selected and the regions in our respective mRNAs were verified in the graphs provided by nucleotide NCBI. The main genes identified in literature in the period evaluated was: *ACAN* (AGRECAN), *VDR* (vitamin D receptor), *COL9A2* (type IX alpha 2 collagen) and *COL9A3* (type IX alpha 3 collagen), which encode type IX collagen; *IL1A* (interleukin-1 alpha), *IL1B* (interleukin 1 beta) and *MMP-3* (stromelysin-1). For *ACAN* gene the microRNAs identified were: hsa-mir-92b (57.61%), hsa-mir-149 (59.55%), hsa-mir-425 (55.81%), hsa-miR-339 -5p (52.17%) and hsa-miR-24-3p (54.55%); *VDR*: hsa-miR-125b-5p (54.55%), hsa-miR-125a-5p (54.55%), hsa-mir-223 (56.07%); hSA-miR-493-3p (59.09%), hsa-mir-874-3p (61.90%), hsa-mir-874 (53.25%), hsa-miR-491-5p ( 58.33); *IL-1B*: hsa-miR-590-5p (50.00%), hsa-mir-185 (51.99%); and *MMP3*: hsa-mir-372 (50.75%). Has not been identified microRNAs with identity equal or to greater than 50% for the *COL9A3* and *IL-1A* genes. It has been observed that hsa-mir-92b and hsa-mir-149 aligned in the coding region of the Aggrecan protein; hsa-miR-125a-5p and hsa-miR-125b-5p in the coding region of the vitamin D receptor; hsa-mi-493-3p, hsa-mir-874-3p, hsa-mir-874, hsa-miR-491-5p in the coding region of the alpha-2 (IX) collagen protein; and hsa-miR-590-5p and hsa-mir-185 in the IL-1B protein coding region. The microRNA identified for MMP3 did not line up in a protein coding region. However, it was possible to identify in silico the microRNAs regulators of the degeneration of the intervertebral disc and laboratory studies will be necessary to validate them.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	7
<b>2 EMBASAMENTO TEÓRICO</b>	10
2.1 Disco Intervertebral	10
2.1.2 Anatomia e composição bioquímica	12
2.1.3 Propriedades mecânicas dos discos intervertebrais	13
2.1.4 Degeração do disco intervertebral	16
2.1.4.1 Epidemiologia	17
2.1.4.2 Etiologia	17
2.1.4.3 Diagnóstico e tratamento	20
2.1.4.3.1 Diagnóstico	20
2.1.4.3.2 Tratamento	23
<b>3 RESULTADOS</b>	25
3.1 Genes selecionados na literatura	25
3.2 MicroRNA regulatório dos genes selecionados	26
<b>4 DISCUSSÃO</b>	33
<b>5 CONCLUSÃO</b>	39
<b>REFERÊNCIAS</b>	40
<b>ANEXOS</b>	50
Anexo 1 Matriz de alinhamento global do gene ACAN	50
Anexo 2 Matriz de alinhamento global do gene VDR	53
Anexo 3 Matriz de alinhamento global do gene COL9A	56
Anexo 4 Matriz de alinhamento global do gene COL9A	58
Anexo 5 Matriz de alinhamento global do gene IL1A	59
Anexo 6 Matriz de alinhamento global do gene IL1	64
Anexo 7 Matriz de alinhamento global do gene MMP3	66

vi

vii

**ÍNDICIE DE FIGURAS**

<b>Figura 1 Segmento da coluna intervertebral.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2A e 2B .....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3 .....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 4 .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 5 .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 6A e 6B .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 7A e 7B .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 8 .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 9 .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 10 .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 11 .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 12 .....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 13 .....</b>	<b>32</b>



**ÍNDICE DE TABELAS**

**Tabela 1** .....35  
**Tabela 2** .....36

**ÍNDICE DE QUADROS**

**Quadro 1 .....31**  
**Quadro 2 .....32**

## 1 INTRODUÇÃO

A degeneração do disco intervertebral (DI) tem sido atribuída a fatores como acúmulo de efeitos ambientais, primariamente agressões e traumas, hábitos de vida, tabagismo, consumo de álcool, ocupação, aterosclerose, somadas às mudanças que ocorrem com o envelhecimento. Pesquisas recentes, no entanto, demonstram que esses efeitos influenciam modestamente a degeneração discal intervertebral, o que reforça a importância da participação dos fatores genéticos nesse processo (VIDEMAN *et al.*, 1998; BATTIÉ *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2013).

Os genes podem indicar suscetibilidade e predisposição a doenças ou podem atuar como reguladores, modulando o tamanho e intensidade do processo patogênico e a resposta do tratamento medicamentoso (MAIMONE, 2001).

Foram identificados alguns genes responsáveis pela codificação de moléculas relacionada com as propriedades da matriz extracelular, podendo influenciar na degeneração do DI (HADJIPAVLOU *et al.*, 2008).

Os principais genes descritos na literatura envolvidos no processo degenerativo do DI são: AGRECAN (ACAN) ((FROES *et al.*, 2006), o gene receptor da vitamina D (VDR) (JONES *et al.*, 1998), colágeno tipo IX alfa 2 (COL9A2) e colágeno tipo IX alfa 3 (COL9A3), que codificam o colágeno tipo IX (BOYD *et al.*, 2008; FROES *et al.*, 2005; TILKERIDIS *et al.*, 2005; JILL *et al.*, 2003), o gene Interleucina-1 alfa (IL1A) ( SOLOVIEVA *et al.*, 2004), Interleucina 1 beta (IL1B) ( DINARELLO, 1994) e o gene Estromelina-1 (MMP-3) (TAKAHASHI *et al.*, 2001). As mais importantes associações foram alcançadas no estudo de mutações do gene VDR (KALICHMAN *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 1998; HADJIPAVLOU *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm associado um novo fator que pode estar envolvido na degeneração do DI, os microRNAs. Estes são uma classe de mRNAs não codificantes, compostos por 21 a 25 nucleotídeos, que podem se ligar a sequências específicas de RNAs codificadores de proteínas (HE *et al.*, 2004). Aproximadamente um terço de todos RNAs mensageiros de mamíferos parecem estar sob regulação dos microRNAs sugerindo um papel essencial na regulação da expressão gênica (XIN *et al.*, 2013).

Os microRNAs atuam como reguladores endógenos da expressão do gene, reprimindo a tradução de proteínas e / ou induzindo a degradação de mRNA através de emparelhamento de bases com regiões não traduzidas (3'UTR) dos seus mRNAs alvos específicos (MIYAKY *et al.*, 2010). Resultados de pesquisas recentes evidenciam a

participação dos microRNAs em muitos processos celulares, incluindo a proliferação celular, apoptose, e a liberação de citocinas (YU *et al.*, 2013).

Trabalhos realizados têm mostrado a utilização de microRNAs em diagnósticos médicos, bem como no tratamento de patologias genéticas. Esta é uma possibilidade terapêutica explicada pelo fato de que microRNAs podem afetar a expressão de seus genes alvo e interferir no desenvolvimento dessas doenças (SMYTH, 2003).

O estudo das terapias genéticas têm sido possível com o auxílio da bioinformática, uma ferramenta aliada nos estudos dos genes e micro RNAs, possibilitando a identificação dos mesmos (HE *et al.*, 2004).

Torna-se claro que as mutações em diversas classes de genes provocam alterações na morfologia da matriz e na função bioquímica do disco intervertebral e estudos que visem melhor elucidação do controle gênico na degeneração do DI tornam-se necessários (URBAN e ROBERTS, 2003).

Assim, a pergunta norteadora do estudo foi no sentido de investigar a existência de microRNAs reguladores dos genes relacionados à degeneração do DI como ferramenta para futuros estudos relacionados à terapias e melhora de prognósticos. Formulou-se como hipótese básica orientadora da pesquisa que existem microRNAs responsáveis por regular, inibir ou ativar determinados genes envolvidos na degeneração do DI.

O objetivo geral é identificar os principais microRNAs regulatórios de genes envolvidos na degeneração do disco intervertebral.

São objetivos específicos: a) verificar na base teórica específica os genes mais relevantes envolvidos na degeneração do disco intervertebral; b) analisar *in silico*, micro RNAs que possuem interação com os genes relacionados à degeneração discal.

Justifica-se este estudo tendo em vista, que há poucos estudos que abordam os genes envolvidos na degeneração do disco intervertebral principalmente que abordam seus microRNAs regulatórios.

Os resultados obtidos poderão auxiliar no melhor entendimento dessa relação. A identificação dos microRNAs responsáveis por atuar na degeneração do disco intervertebral, possibilitará o direcionamento da seleção dos microRNAs para estudos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* gerando ferramentas para estudos relacionados à medidas de prevenção, tratamento que assegurem um melhor controle da doença e melhora na qualidade de vida do paciente. Quanto a metodologia utilizada, trata-se de uma pesquisa do tipo aplicada. Teve-se como técnica a documentação indireta, por meio da pesquisa bibliográfica.

Para verificação dos principais genes relacionados à degeneração do DI foi realizado uma revisão teórica através de consultas às bases bibliográficas Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (PUBMED), *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO) e Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS).

Avaliou-se artigos científicos publicados em revistas, em português e inglês, no período de 1985 à 2015, utilizando como descritores: degeneração do disco intervertebral, fatores genéticos da degeneração discal e microRNAs envolvidos na degeneração discal, de modo a selecionar publicações com informações sobre disco intervertebral e genes envolvidos na degeneração do disco intervertebral.

Artigos que não apresentavam genes correlacionados à degeneração discal foram descartados.

Após a seleção dos principais genes relacionados à degeneração do DI, foi realizado uma análise dos microRNAs relacionados a eles.

Para pesquisa dos microRNAs, foram utilizados os programas: TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) e [microRNA.org/Miranda](http://www.microrna.org/Miranda)(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>).

A sequência dos microRNAs encontrados foram obtidas a partir do mirbase-Targets (<http://mirbase.org/>).

Análise *in silico* da relação microRNAs e os genes selecionados, após a identificação dos microRNAs relacionados a cada gene envolvido na degeneração do DI, foi realizado o alinhamento global entre eles, utilizando o programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Em seguida, foram selecionados os microRNAs com identidade maior ou igual a 50% e avaliou-se a região de alinhamento ao gene alvo. Utilizando o NCBI nucleotídeo (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) identificou-se as regiões alvo dos microRNAs ao mRNA nos respectivos gráficos de cada gene.

Sabendo as regiões de interação, foi avaliado na fundamentação teórica a função destas regiões para definição da função do microRNA no gene alvo.

## 2 EMBASAMENTO TEÓRICO

### 2.1 Disco Intervertebral

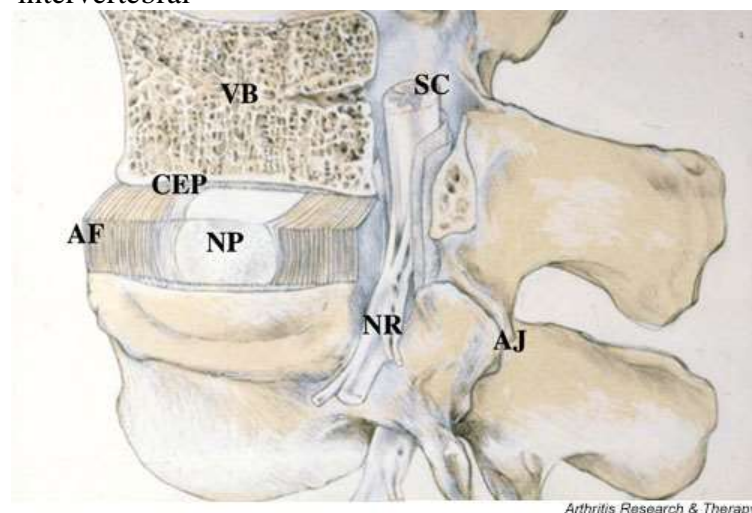
O disco intervertebral é uma estrutura da coluna vertebral complexa e especializada, está presente entre os corpos vertebrais e tem funções de fornecer estabilidade, garantir movimentos articulares à coluna, absorver e dissipar uniformemente as cargas mecânicas (CASSAR-PULLICINO, 1998).

No disco intervertebral normal, deve haver um equilíbrio entre a síntese e a degradação de elementos da matriz extracelular (água, colágeno, proteoglicanos e outros) (BIBBY *et al.*, 2001; ROUGHLEY *et al.*, 2001). Esse equilíbrio determina a integridade da matriz do disco e também é pré-requisito para as adaptações e/ou alterações das propriedades de matriz frente às mudanças das condições ambientais (BOOS *et al.*, 2008).

#### 2.1.2 Anatomia e composição bioquímica

A coluna vertebral é composta por 23 discos intervertebrais, representando cerca de 25% do seu comprimento total (GRABINER,1991). Segundo o mesmo autor cada disco intervertebral pode ser dividido em três regiões interdependentes: placa terminal, ânulo fibroso e núcleo pulposo (Figura 1).

**Figura 1** – Segmento da coluna vertebral e o disco intervertebral



A figura representa um segmento da coluna vertebral e o disco intervertebral. Mostra a organização do disco com o núcleo pulposo representado pelas siglas (NP)

cercado por lamelas do ânulo fibroso (AF) e separado dos corpos vertebrais (VB) até o final da placa cartilaginosa (CEP).

**Fonte:** Urban PG e Sally Roberts, p.122, 2003.

As placas terminais são responsáveis pela troca de fluidos dos discos intervertebrais (WATKINS, 2001). Estão localizadas na superfície superior e inferior dos discos intervertebrais e são constituídas basicamente por cartilagens hialinas permeáveis do tipo sínfises (GRABINER, 1991).

O ânulo fibroso é constituído por 20 anéis fibrocartilagosos dispostos concentricamente, que envolvem e limitam o núcleo pulposo (WHITING *et al.*, 1998; BOOS *et al.*, 2008). As fibras de colágeno do ânulo fibroso estão dispostas de modo que o disco suporte diferentes tipos de cargas, na mesma direção e alternadas em cada anel adjacente (WATKINS, 2001). As fibras do ânulo fibroso têm a capacidade de se deformar elasticamente aumentando até 1,04 vezes seu comprimento inicial (COX, 2002).

Subdivide-se o ânulo fibroso duas porções: ânulo fibroso externo e interno. O ânulo fibroso externo é constituído por lamelas concêntricas de colágeno (predominantemente do tipo I) organizadas e orientadas em um ângulo de aproximadamente 30° com relação ao eixo longitudinal da coluna vertebral. A população celular do ânulo fibroso interno é caracterizada pela presença de fibroblastos (PRESCHER, 1998).

No ânulo fibroso interno possui uma alta concentração de proteoglicanos, contém menor quantidade de colágeno e um menor nível de organização de suas lamelas comparadas ao ânulo fibroso externo, é mais largo e fibrocartilaginoso constituído principalmente pelo colágeno tipo II. As células mais abundantes no ânulo fibroso interno são os fibroblastos e condrócitos (PRESCHER, 1998).

O núcleo pulposo está centralizado no disco intervertebral, composto por uma matriz amorfa de mucopolissacarídeo, constituída de uma rede de colágeno e uma grande concentração de proteoglicanos (KAPANDJI, 2000).

A matriz do núcleo pulposo apresenta uma grande quantidade de água, mais abundante em um recém-nascido, aproximadamente 88%, e os proteoglicanos constituídos por condroitino-4-sulfato, condroitino-6-sulfato, sulfato de queratina e ácido hialurônico (PRESCHER, 1998; KAPANDJI, 2000; ADAM *et al.*, 1995). Acredita-se que o disco intervertebral tem a capacidade de absorver até nove vezes o seu volume de fluido. Apresenta pressão osmótica negativa no núcleo pulposo proporcionando ao disco a capacidade em resistir às forças de compressão (KAPANDJI, 2000; WATKINS, 2001). Esta pressão

osmótica inerente ao núcleo pulposo exerce o importante papel de controlar o catabolismo e anabolismo de elementos da matriz do disco intervertebral (HANDA *et al.*, 1997).

Há uma fina camada fibrosa que delimita o ânulo fibroso interno do núcleo pulposo denominada zona de transição (PRESCHER, 1998). Conforme o mesmo autor o núcleo pulposo apresenta predominantemente fibras de colágeno tipo II.

O mecanismo de nutrição do disco intervertebral é realizado através das placas terminais. Por não conter vascularização o fornecimento de nutrientes para as células do disco e remoção de resíduos metabólicos são realizados principalmente por difusão ou para os leitos capilares das vértebras adjacentes e pequenos capilares na parte mais externa do anel fibroso (BOOS *et al.*, 2008; SOBAJIMA *et al.*, 2004). Contudo, com o aumento da idade este se torna gradativamente avascularizado (MOORE *et al.*, 1999).

Em estudo *in vitro* foram verificados indicativos de que a placa terminal é vascularizada até os sete anos, o ânulo fibroso até os 20 anos de idade, contudo em nenhuma idade o núcleo pulposo apresentou suporte vascular (RUDERT *et al.*, 1993). A hipótese mais provável é que a nutrição do disco intervertebral seja realizada através da difusão (HERRERO, 2012).

Através das placas terminais é realizada a difusão dos solutos contendo glicose e oxigênio ocorre e os sulfatos que constituem os glicosaminoglicanos, entram através dos anéis fibrosos (WATKINS, 2001).

Quanto à inervação do disco intervertebral, acredita-se que este é desprovido de fibras nervosas, fato este que se deve a grande pressão exercida sobre o núcleo pulposo e ânulo fibroso (McCATHY *et al.*, 1991). Contudo, Cox (2002) sugere um duplo suprimento nervoso: sendo a porção anterior do disco inervada por fibras simpáticas e a porção posterior inervada pelo nervo sinovertebral.

### **2.1.3 Propriedades mecânicas dos discos intervertebrais**

A coluna vertebral está constantemente submetida a forças compressivas resultantes da ação da gravidade e cargas internas e externas (BROBERG, 1993). Estas forças compressivas são eficientemente distribuídas ao longo da coluna vertebral através de um sistema biomecânico, constituído pelo somatório das unidades funcionais (NORDIN *et al.*, 2001).

Essas cargas provocam um aumento uniforme na pressão interna no núcleo pulposo (NACHEMSON, 1976), transformando parcialmente as forças verticais em horizontais



(KAPANDJI, 2000). Estas forças horizontais causam uma rápida deformação radial do ânulo fibroso, principalmente em sua porção externa (ADAMS *et al.*, 1995).

Conjuntamente, ocorre uma saída gradual de fluido contido no interior do núcleo pulposo e no ânulo fibroso (ADAMS *et al.*, 1983) e uma entrada de eletrólitos (ex: sódio e potássio) para o interior dos discos intervertebrais, evitando assim uma perda excessiva de fluido dos discos e aumentando a pressão osmótica negativa (COX, 2002).

Deste modo, o ânulo fibroso interno e o núcleo pulposo se comportam como um fluido pressurizado, enquanto que o ânulo fibroso externo atua como uma camada elástica, fato que garante as características viscoelásticas dos discos intervertebrais (ADAMS *et al.*, 1995).

Os discos intervertebrais deformam ao serem submetidos a forças compressivas (capacidade viscoelástica), causando uma diminuição no comprimento da coluna vertebral, fator este que pode ser utilizado como índice de estresse sobre a coluna vertebral (EKLUND *et al.*, 1984; RODACKI *et al.*, 2001).

Nesse sentido, estudos têm descrito que o tamanho das deformações dos discos intervertebrais são proporcionais às cargas impostas sobre a coluna vertebral (TYRRELL *et al.*, 1985; REILLY *et al.*, 1985).

Quando as cargas sobre a coluna vertebral são minimizadas, ocorre um imediato retorno elástico dos tecidos deformados dos discos e ocorre um influxo gradativo de fluido para o interior do núcleo pulposo e ânulo fibroso, ocasionando uma recuperação na altura dos discos (ADAMS *et al.*, 1995; KAPANDJI, 2000).

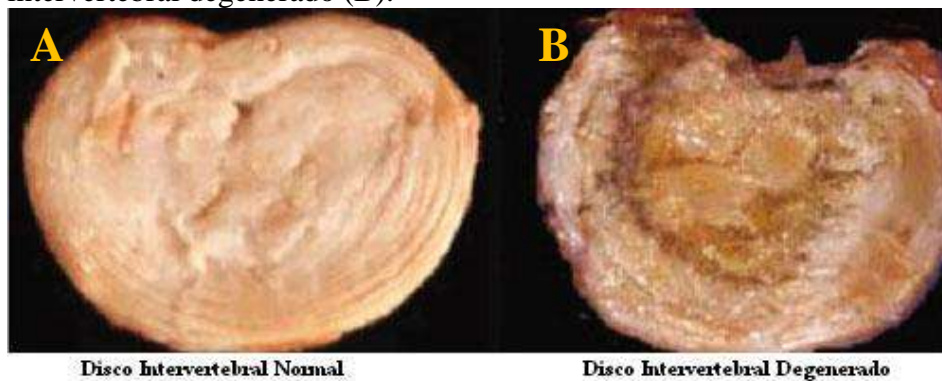
#### **2.1.4 Degeneração do disco intervertebral**

O DI tem atraído muitas investigações para desvendar seu mecanismo de degeneração e melhorar a compreensão da sua biologia molecular (BOSS *et al.*, 2008).

A degeneração do DI é oriunda de alterações à nível celular, bioquímico e estrutural acarretando em diminuição no número de células e dos constituintes da matriz extracelular do disco intervertebral (OLIVEIRA *et al.* 2013). É resultante da degradação, ao longo da vida, combinada com a remodelação sincronizada do disco incluindo adaptação simultânea das estruturas disciais as mudanças de peso corpóreo e cicatrização das lesões ocasionais, com formação de tecido cicatricial (BATTIÉ *et al.* 2004).

Com o aumento da idade o núcleo se torna mais fibrótico, ou seja, menos semelhante ao gel, mudando a sua morfologia e tornando-se mais desorganizado (Figura 2A e 2B) (JILL *et al.*, 2003).

**Figura 2A, 2B:** A diferença entre o disco intervertebral normal (A) e disco intervertebral degenerado (B).

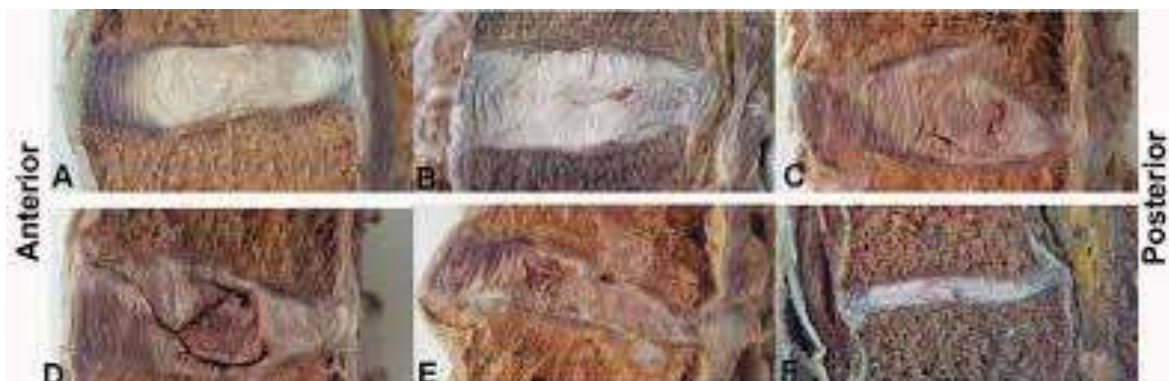


Fonte: URBAN PG E SALLY ROBERTS, p.122, 2003.

Sabe-se que a quantidade de proteoglicanos diminui ao longo da vida, diminuindo a pressão osmótica do disco intervertebral ele perde a capacidade em se manter hidratado levando a instabilidade progressiva e afetando a capacidade do disco de suportar cargas mecânicas predispondo-se a lesões (GOLDENBERG, 2012).

Estudos levaram a sistemas de classificação que permitem a avaliação dos estágios de degeneração do DI (Figura 3). O sistema original de classificação foi refinada por Thompson em 1990. Os cinco estágios descritos pelo sistema de classificação de Thompson descrevem a degeneração do disco intervertebral relacionada à idade, de discos jovens saudáveis até a fase mais avançada de degeneração (BAPTISTA *et al.*, 2015; BOOS *et al.*, 2008).

**Figura 3:** Os cinco estágios da degeneração do disco intervertebral.



Discos intervertebrais lombares fixados em formalina 4% e seccionados sagitalmente: Observar os diferentes aspectos macroscópicos encontrados no processo de envelhecimento e degeneração avaliados segundo a escala macroscópica de degeneração de Thompson. Espécimes do acervo do laboratório de Anatomia Humana da UFES. (A) Thompson I: núcleo pulposo de aspecto gelatinoso e ânulo fibroso com lamelas organizadas; (B) Thompson II: núcleo pulposo com tecido fibroso esbranquiçado e material mucinoso entre as lamelas do ânulo fibroso, notar pequena fissura no núcleo pulposo; (C) Thompson III: Perda da distinção ânulo fibroso / núcleo pulposo, defeitos focais na PV, verificar a desidratação de Núcleo Pulposo e fissura longitudinal e vertical; (D) Thompson IV: fissuras no núcleo pulposo e paralelas à placa vertebral, com presença de esclerose focal; (E) Thompson V: esclerose difusa e nódulos de Schmorl; (F) Thompson 5: esclerose total e achatamento do disco.

**Fonte:** BAPTISTA *et al.*, p. 144-148, 2015.

Uma das principais características do fenômeno degenerativo é desorganização da matriz extracelular. Estudos celulares têm demonstrado um aumento da produção de Metaloproteinases (MMP) nas células discais em processo de degeneração ativa (SILVA *et al.*, 2009).

Segundo Rannou *et al.* (2001), algumas células inflamatórias bem como macrófagos invadem os discos e produzem citocinas e proteases nos discos intervertebrais degenerados ou herniados, podendo aumentar a severidade da degeneração do DI. Estas modificações degenerativas advindas do processo de envelhecimento associadas com cargas mecânicas podem ocasionar vários problemas na coluna vertebral tais como protusão ou prolapso discal (WATKINS, 2001).

Como consequência do processo de envelhecimento e degeneração ocorre a diminuição do espaço intervertebral (WATKINS, 2001) e aumento da concavidade dos corpos vertebrais, devido processo de perda óssea (SHAO *et al.*, 2002). A redução da altura dos discos intervertebrais provoca um aumento das cargas em outras estruturas da coluna vertebral que não são próprias para a sustentação e transmissão de cargas favorecendo a ocorrência de osteoporose (WATKINS, 2001).

A degeneração do disco intervertebral é comumente associada a diversas patologias, como lombalgia, estenose do canal vertebral e hérnia de disco (WATKINS, 2001).

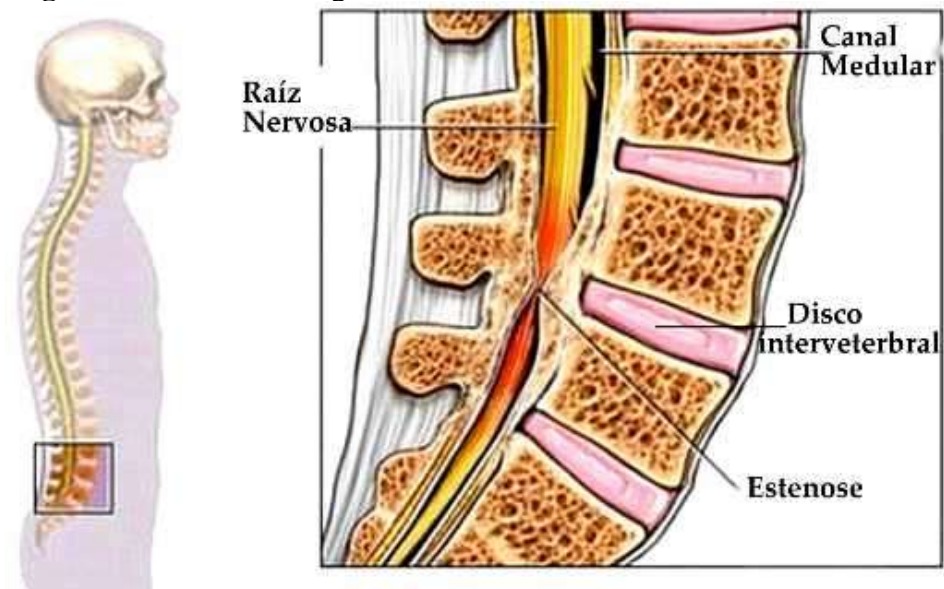
Nos discos intervertebrais degenerados observa-se: ocorrência de osteófitos, edema do núcleo pulposo, achatamento discal, protusão discal com ruptura parcial ou total das fibras do anel fibroso, osteoartrite, espondilólise, espondilolistese e nódulo de Schmorl, hérnia de disco e estenose espinhal (WATKINS, 2001).

Quando a degeneração do núcleo pulposo é acompanhada da erosão do ânulo fibroso, ocorre ruptura interna do disco com fissura radial do ânulo fibroso, sendo assim núcleo

pulposo degenerado pode migrar-se para dentro do canal vertebral formando a hérnia discal (HENNEMANN *et al.*, 1994).

Goldenberg (2012) afirma que com o envelhecimento o ligamento tende a sofrer processo de hipertrofia em direção ao interior do canal vertebral provocando um confinamento das estruturas neurais levando à estenose espinhal (Figura 4). A estenose do canal vertebral é resultante da diminuição do diâmetro de canal no sentido anteroposterior, transversal ou combinados, secundária à perda da altura do disco, lesão do ânulo fibroso, formação de osteófitos e hipertrofia das facetas e do ligamento amarelo (GENEVAY; 2010).

**Figura 4:** Estenose na região lombar.



**Fonte:** GOLDENBERG, 2012.

#### 2.1.4.1 Epidemiologia

As doenças que afetam o sistema músculo-esquelético acometem centenas de milhões de pessoas no mundo e estão entre as causas mais comuns de invalidez e sofrimento crônico. São as principais responsáveis pela liderança no número de incapacidade em pessoas com menos de 45 anos (FROES *et al.*, 2005).

Apesar da existência de inúmeras causas de dor lombar, está provada uma forte associação com a degeneração do DI (SOBAJIMA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2009). Estima-se que até 80% da população venha a experimentar alguma forma de lombalgia ao longo da sua vida, e que aproximadamente 10% destes indivíduos se tornem permanentemente

incapacitados devido à dor lombar, o que representa um enorme fardo económico nos sistemas de saúde (YU *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009).

#### 2.1.4.2 Etiologia

A degeneração do disco intervertebral tem sido atribuída a vários fatores etiológicos incluindo acúmulo de efeitos ambientais (agressões e traumas) hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool, ocupação), aterosclerose, acrescidas das mudanças inerentes ao envelhecimento. Achados recentes, no entanto, demonstram que esses efeitos têm pouca influência na degeneração discal, o que reforça a importância da influência genética nesse processo (VIDEMAN *et al.*, 1998; BATTIÉ *et al.*, 2004; XIN *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstram que uma classe de mRNAs não codificantes (21 a 25 nucleotídeos), chamados microRNAs participam ativamente da regulação gênica de diversas patologias (He *et al.*, 2004).

#### 2.1.4.3 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são um grupo recém descoberto de pequenos RNAs, não codificantes, que representam uma das áreas mais estimulantes da ciência médica moderna por modularem uma enorme e complexa rede regulatória da expressão dos genes (CARVALHO *et al.*, 2012). São pequenas moléculas de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos incapazes de codificar proteínas e que apresentam função na regulação pós-transcricional da expressão gênica, seja pela degradação ou pelo bloqueio na tradução de RNAs mensageiros (mRNAs).

Surgiu em 1993, o primeiro relato sobre esse tipo de RNA, a partir da identificação de uma pequena região não-codificadora (lin-4), específica do nematoda *Caenorhabditis elegans*, que atua na regulação negativa dos níveis da proteína Lin-14, característica do desenvolvimento larval dessa espécie (LEE *et al.*, 1993). Acreditava-se que esse era um mecanismo de regulação específico do *C. elegans*. Entretanto, posteriormente, a descoberta do let-7 - outro microRNA envolvido com o tempo de desenvolvimento do *C. elegans*, porém conservado em uma grande variedade de organismos multicelulares - demonstrou que a regulação da expressão gênica pelos miRNAs não é restrita aos nematoides, sendo um mecanismo presente em muitos animais (PASQUINELLI *et al.*, 2000; REINHART *et al.*, 2000).

OS microRNAs estão posicionados geralmente, em regiões não codificadoras (intergênicas) do genoma e são transcritos pela DNA polimerase II como unidades mono ou policistrônicas independentes (TANZER, STADLER, 2004). Assim como os mRNAs, os precursores de miRNAs (pri-miRNAs) sofrem um processamento no qual recebem as terminações cap 5' e cauda poliA (BRACHT et al., 2004; CAI; RAGEDORN; CULLEN, 2004).

Os pré-miRNAs clivados são transportados ao citoplasma pelas enzimas *Exporting-5* via um mecanismo dependente de *Ran-GTP* (YI et al., 2003; BOHSACK; CZAPLINSKI; GORLICH, 2004; LUND et al., 2004). Uma vez no citoplasma, ocorre uma segunda clivagem, resultando em fragmentos de RNA fita dupla com complementaridade imperfeita, correspondendo ao miRNA e sua fita complementar (miRNA:miRNA\*) (HUTVAGNER et al., 2001; KETTING et al., 2001; GRISHOK et al., 2001). A responsável por esta segunda clivagem é a enzima *Dicer*, cuja estrutura contém domínios de helicase, um domínio PAZ, dois domínios RNase-III e um domínio de ligação a fita dupla (BERNSTEIN et al., 2001). O domínio PAZ parece interagir com o RNA exatamente no local onde houve a clivagem pela enzima *Drosha* (DOSTIE et al., 2003; LINGEL et al., 2003; SONG et al., 2003).

Após os pri-miRNAs serem transcritos organizam-se em uma conformação característica conhecida como grampo (*hairpin*). A conformação em grampo é reconhecida pela endonuclease *Drosha* RNase-III, ainda dentro do núcleo celular. Esta enzima contém um domínio de ligação à fita dupla (dsRNA - do inglês *double* – strand RNA), uma sequência amino terminal e dois domínios RNase-III (LEE et al., 2003; ZENG; CULLEN, 2003).

Somente uma das fitas geralmente, é selecionada para atuar como miRNA, enquanto a fita complementar é degradada (FILIPOWICS et al., 2005; RANA, 2007). Contudo, as vezes ambas geram miRNAs maduros (BUSHATI; COHEN, 2007; RANA, 2007). O miRNA maduro é então incorporado a um complexo ribonucleoprotéico (miRNP), às vezes referido como complexo de silenciamento gênico induzido por miRNA (miRISC - do inglês *miRNA-induced gene silencing complex*), responsável pela repressão da tradução (SCHWARZ; ZAMORES, 2002; TANG, 2005).

A melhor caracterização da família de proteínas deste complexo corresponde às proteínas Argonautas. Em mamíferos, *Ago2* é a principal componente do complexo miRISC (LIU et al., 2004), mediando a transferência do miRNA maduro para dentro do complexo de silenciamento (HAMMOND et al., 2001), o pareamento entre miRNA:RNAm (PILLAI, 2005) e atuando na clivagem do RNAm alvo (RUBY, JAN, BARTEL, 2007). O mecanismo exato pelo qual o complexo *Ago/* miRNA reprime a tradução ou promove a degradação do

RNAm ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que envolve o recrutamento de proteínas adicionais, como por exemplo as *GW182* (JACKSON; STANDART, 2007).

Estes pequenos RNAs podem se ligar ao RNA mensageiro de doenças genéticas e afetar a expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento dessas doenças. Deste modo, estudos têm mostrado a utilização de microRNAs em diagnósticos médicos, bem como no tratamento de patologias genéticas (SMYTH, 2003).

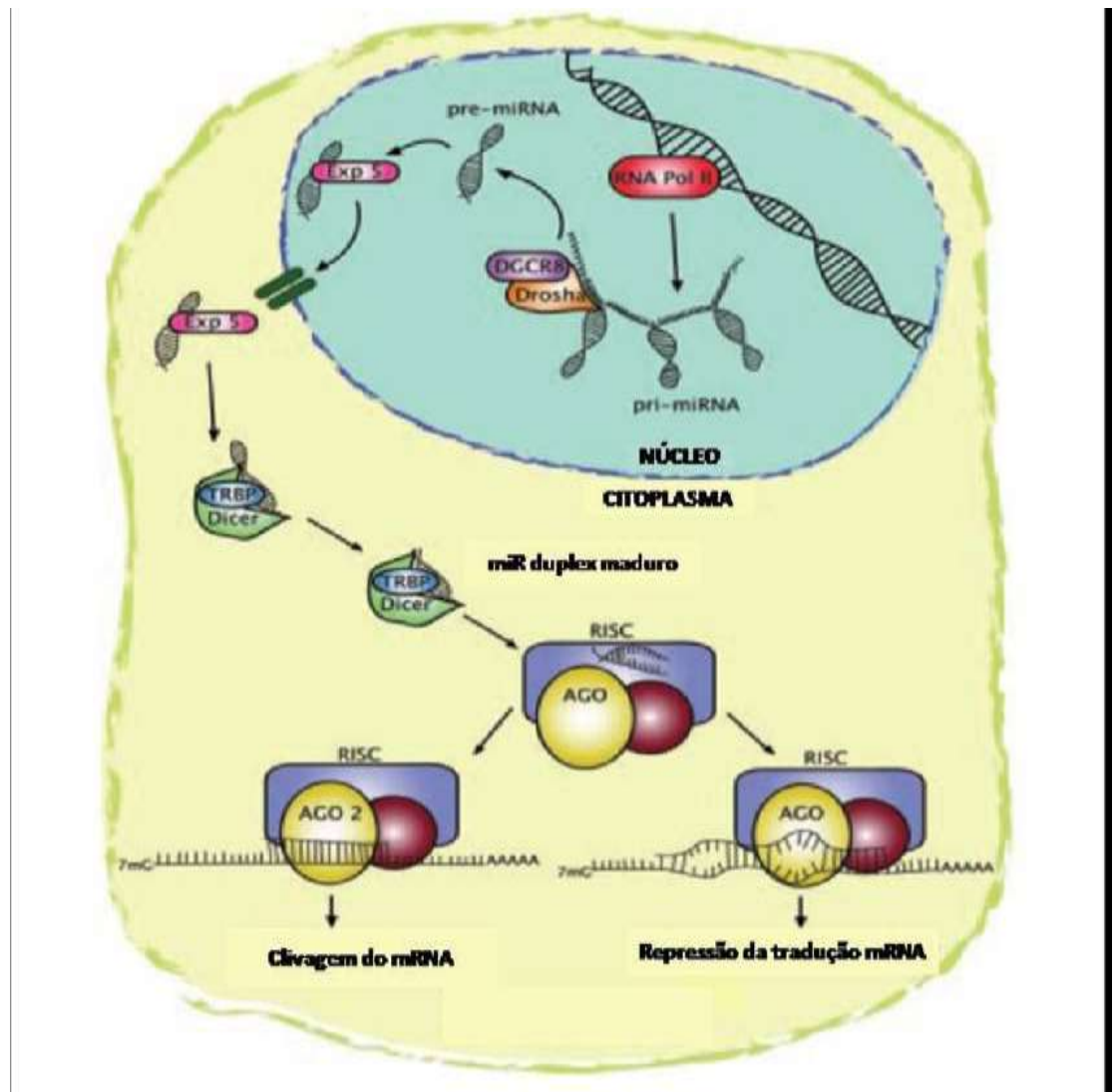
Xin et al. (2013), relatam que há microRNAs envolvidos na regulação da proliferação celular em vários estados patológicos. Dado o fato de que a degeneração do DI é caracterizada por proliferação anormal no núcleo pulposo é provável existam microRNAs reguladores positivos na degeneração do DI.

Abouheif *et al.*, 2010, demonstraram que o silenciamento de alguns microRNAs pode reduzir eficazmente a apoptose induzida por IL-1 $\beta$  em condrócitos de rato. Enquanto, Zhao *et al.* (2013), relataram microRNAs regulando negativamente a degeneração do núcleo pulposo do disco intervertebral. Bo zhao *et al.* (2013), também demonstraram que há microRNAs reguladores da osteoartrite, que apresenta alterações patológicas às encontradas na DI.

O estudo da interação dos genes e microRNAs, têm sido possível com o auxílio da bioinformática (HE *et al.*, 2004; URBAN e ROBERTS, 2003).

Milhares de miRNAs diferentes já foram identificados, tecido específicos ou não, muitos deles evolutivamente conservados. Acredita-se que o número de miRNAs presente no genoma de vertebrados seja muito superior ao conhecido atualmente e que participem da regulação de 20 a 30% dos genes (LEWIS et al., 2005; REN et al., 2009; WIENHOLDS et al., 2005). O envolvimento dos miRNAs no controle regulatório da expressão gênica e a associação a diferentes funções tornam evidente que os miRNAs podem alterar a progressão de diversas doenças (Figura 5) (CARVALHO *et al.*, 2012).

**Figura 5.** Biogênese do microRNA e suas vias regulatórias: (1) degradação e (2) repressão da tradução do RNAm alvo.



Fonte: Modificado de Olena e Patton, 2010.

## 2.1.5 Diagnóstico e Tratamento

### 2.1.5.1 Diagnóstico

Para diagnóstico de degeneração do DI faz-se necessária uma avaliação clínica associada a exames de imagem para mais precisão do nível envolvido (ORTIZ *et al*, 2000; GRACITELLI *et al*, 2006).

O diagnóstico da discopatia é feito através de presença de alterações degenerativas do disco intervertebral, enquanto no diagnóstico de osteocondrose o processo degenerativo envolve principalmente o organismo vertebral e as estruturas que limitam o disco



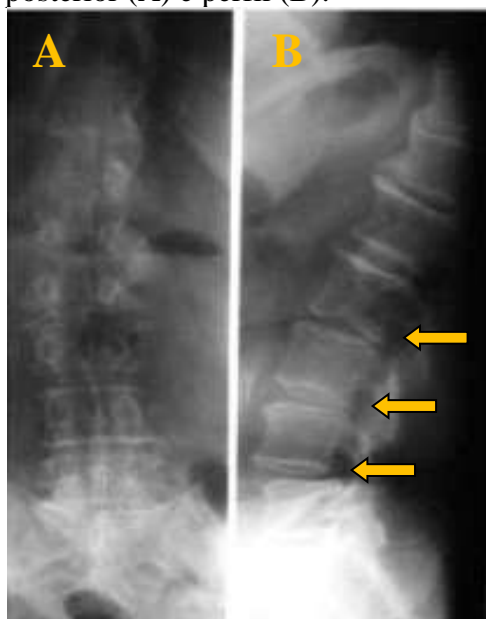
intervertebral (estreitamento do disco, esclerose subcondral, osteófitos e nó Schmorl) (WATKINS, 2001).

O diagnóstico da hérnia de disco se dá quando há protrusão de disco intervertebral além das margens posteriores dos corpos vertebrais adjacentes (HERZOG, 1996).

As manifestações clínicas de dor, irradiadas ou não para o membro correspondente (lombociatalgia), acompanhada de sinal de Lasègue positivo e/ou Lasègue contralateral, paresia do membro afetado, comprometimento de reflexos e as alterações de sensibilidade são variantes, mudando de caso para caso. Deve-se atentar ao fato de que toda esta evolução poderá ocorrer de forma sintomática ou assintomática, indivíduos podem apresentar hérnia de disco, mesmo que volumosa, sem ter tido nenhum episódio de dor (HENNEMANN e SCHUMACHER, 1994).

Quanto aos exames de imagem a radiografia é um método limitado para diagnóstico por não poder avaliar adequadamente o disco intervertebral, possibilita apenas visualizar a diminuição do espaço discal intervertebral e as alterações degenerativas ósseas (Figura 6A e 6B). Já a imagem de ressonância magnética com contraste é considerada a técnica mais sensível para examinar o grau de degeneração do disco intervertebral bem como o seu grau de hidratação. (Figuras 7A, 7B e 8) (MODIC *et al.*, 1998).

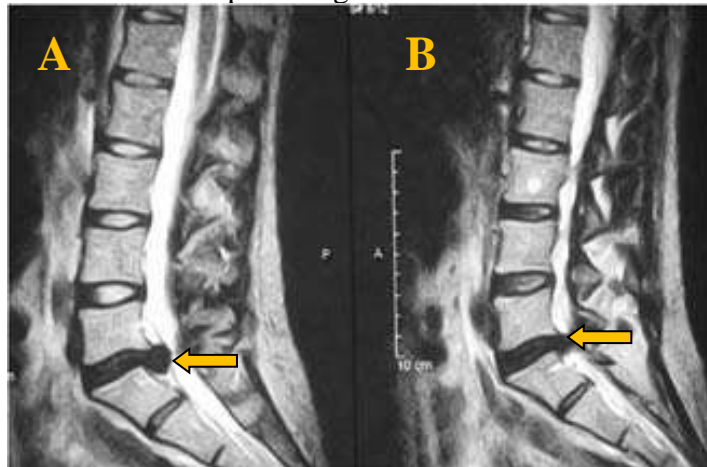
**Figura 6A e 6B:** Radiografia de coluna lombo-sacra em plano ântero-posterior (A) e perfil (B).



Setas amarelas indicam a estenose do canal vertebral em múltiplos níveis em paciente de 76 anos.

**Fonte:** NOVAES *et al.*, 2009.

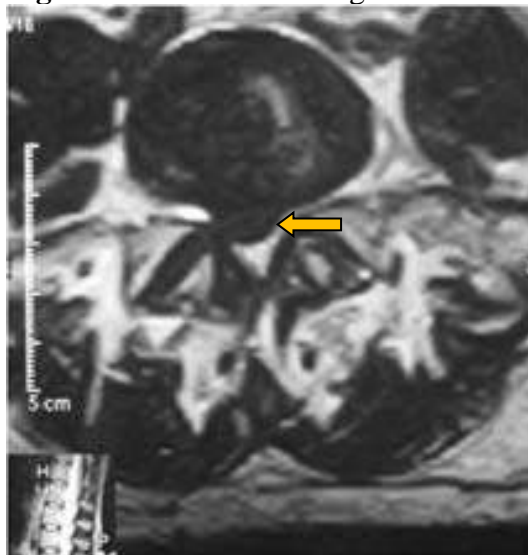
**Figura 7Ae 7B:** Ressonância magnética de coluna lombo-sacra em plano sagital.



Presença de discopatia com instabilidade vertebral. Seta amarela indica hérnia de disco no nível de L5 - S1, em um paciente de 32 anos.

**Fonte:** NOVAES *et al.*, 2009.

**Figura 8:** Ressonância magnética axial



Seta amarela indica a hérnia de disco extrusa (com extravasamento do núcleo pulposo para o canal vertebral) em paciente de 37 anos.

**Fonte:** NOVAES *et al.*, 2009.

A discografia também pode ser realizada para avaliar o disco intervertebral. Consiste em uma técnica onde é injetado um contraste por via percutânea para o interior do núcleo pulposo apenas no disco comprometido. Esse dado nos permite avaliar o comprometimento distal junto com a imagem anormal da degeneração distal, nas suas diferentes fases. A

discografia apresenta resultado positivo quando a imagem da ruptura está associada à dor durante a injeção do contraste (HENNEMANN e SCHUMACHER, 1994).

### 2.1.5.2 Tratamento

As estratégias de tratamento atualmente disponíveis se limitam em reduzir a dor, são conservadores e paliativos não reparando o disco degenerado, com o uso de drogas (relaxantes musculares, injeção de anti-inflamatórios esteroidais, anestésicos locais), terapias de manipulação, eletroterapia e se necessário intervenção cirúrgica (SILVA *et al.* 2009; URBAN e ROBERT, 2003).

Os exercícios aeróbicos e de fortalecimento da musculatura paravertebral são comprovadamente eficazes (BRASIL *et al.*, 2004).

O tratamento cirúrgico da hérnia de disco está indicado nos casos com déficit neurológico grave, com ou sem dor; na lombociatalgia hiperálgica para os pacientes que não melhoram após 90 dias de adequado tratamento clínico; emergencialmente em casos de síndrome da cauda equina (quando ocorre alteração de controle de esfíncter, disfunção sexual e paresia dos membros inferiores); nos casos de espondilolise, com espondilolistese, e espondilolistese degenerativa, com dor lombar que não melhora com tratamento clínico, lombociatalgia e claudicação neurogênica devido a estreitamento do canal e que não responderam ao protocolo de tratamento conservador (BRASIL *et al.*, 2004).

Como forma de intervenção cirúrgica a artroplastia é um dos recursos utilizados. Trata-se de um procedimento cirúrgico realizado em uma articulação, para lhe restituir, na medida do possível, a mobilidade e a função. Na artroplastia do disco intervertebral, os principais objetivos são diminuir a dor na coluna à nível do disco, restaurar a altura do disco protegendo assim os elementos neurais e preservar o movimento de modo a prevenir artropatias ou outras doenças associadas a essa (GAMRADT *et al.* 2005).

Segundo Vadapalli *et al.* (2006), a artrodese também pode ser realizada. Consiste em fundir duas ou mais vértebras com inserção de parafusos para garantir restrição no movimento do processo articular vertebral. Após a cirurgia o paciente necessita de um repouso relativo para que ocorra a fusão completa da articulação que normalmente necessita de três meses. Na maioria dos casos não é necessário remoção dos parafusos.

Pacientes que apresentam sintomas dolorosos associados à degeneração articular facetária e/ou à presença de estenose espinhal são bons candidatos a artrodese lombar (VADAPALLI *et al.*, 2006).

Os fatores para um bom prognóstico ainda não estão bem identificados. Acredita-se que um alto índice de massa corporal está associado a mal prognóstico e, normalmente, os pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico apresentaram melhores resultados (ZYLBERSZTEJN *et al.*, 2012).

A degeneração do DI ainda é irreversível sem tratamento eficaz disponível. Apesar disto, recentes avanços na compreensão dos processos de reparação tecidual, terapia genética e biologia das células tronco levaram à identificação de novas estratégias terapêuticas que se baseiam na engenharia tecidual objetivando a reparação, reversão e regeneração do DI degenerado e que possivelmente poderão ser usadas como forma de tratamento (SILVA *et al.* 2009).

Segundo o mesmo autor já foram descritas quatro estratégias potenciais: fornecimento direto intradiscal de um fator ativo protetor (onde prende-se reprogramar as células discais remanescentes para aumentarem a produção de proteoglicanos, a fim de recuperar as propriedades biomecânicas interdiscais normais), terapia genética direta modificando a expressão celular nas células do disco intervertebral, implantação autóloga de células discais previamente removidas, cultivadas, processadas e modificadas *in vitro* e implantação de células estaminais. Todas estas técnicas têm como objetivo aumentar o fornecimento ao disco de fatores biológicos ativos a fim de favorecer a regeneração discal ou pelo menos suspender o processo degenerativo.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1. Genes selecionados na literatura

Verificou-se que os principais genes descritos na literatura relacionados à degeneração do DI são: ACAN, VDR, COL9A2 e COL9A3, IL-1A, IL-1B e MMP3 (Quadro 1).

Quadro1. Principais Genes relacionados à degeneração do DI descritos na literatura.

<b>Gene (SIGLA)</b>	<b>Gene (Nome)</b>	<b>Função</b>	<b>Autores</b>
ACAN	Agrecan	Reter água no disco intervertebral, mantê-lo hidratado.	FROES <i>et al.</i> , 2006
VDR	Vitamina D (1,25 dihidroxi vitamina D3)	Densidade óssea	JONES <i>et al.</i> , 1998
COL9A2	Colágeno tipo IX	Suporte mecânico dos tecidos	FROES <i>et al.</i> , 2005
COL9A3	Colágeno tipo IX	Suporte mecânico dos tecidos	FROES <i>et al.</i> , 2005
IL-1 <sup>a</sup>	Interleucina-1Alfa	Induz atividades de enzimas que destroem proteoglicanos, abaulamento discal	SOLOVIEVA <i>et al.</i> , 2004
IL-1B	Interleucina-1Beta	Atua na regulação da resposta imune e inflamatória e induz a apoptose celular	DINARELLO, 1994
MMP3	Estromelisin-1	Codifica uma enzima potente na degradação dos componentes da matriz do DI	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2001; LIANG <i>et al.</i> , 2013

Fonte: FROES *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 1998; FROES *et al.*, 2005; SOLOVIEVA *et al.*, 2004; DINARELLO, 1994; TAKAHASHI *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2013.

### 3.2. MicroRNAs regulatórios dos genes selecionados

Após selecionar os principais genes relacionados à degeneração do DI, foi possível identificar os microRNAs regulatórios (Quadro 2).

Quadro 2. MicroRNAs regulatórios encontrados utilizando os programas TargetScan e MicroRNA.org/Miranda.

GENE	Pré-microRNA	MicroRNA maduro
ACAN		miR-24-3p miR-374b miR-374a miR-299-3p miR-363 miR-32 miR-367 miR-92a-1 miR-92a-2 miR-92b miR-25 miR-24-1 miR-24-2 miR-506 miR-124-1 miR-124-2 miR-124-3 miR-181-c miR-181-d miR-181a-2 miR-181a-1 miR-181b-1 miR-181b-2 miR-339-5p miR149 miR-873 miR-494 miR-425
VDR		miR-4319 miR-125b-5p miR-125a-5p miR-330-5p miR-326 miR-302e miR-372 miR-520a-3p miR-520d-3p miR-520e miR-302a miR-302b miR-302c miR-302d miR-520b miR-520c-3p miR-373 miR-374a miR-374b miR-10b miR-485-5p miR-10a miR-214 miR-544a miR-544b miR-223 miR-136

		miR-145 miR-129-5p
COL9A2		miR-760 miR-493-3p miR-874-3p miR-876-5p miR-3167 miR-665 miR-873 miR-200b miR-200c miR-429 miR-143 miR-18a miR-18b miR-874 miR491-5p miR-194-1 miR-194-2 miR-133a-1 miR-133a-2 miR-133b
COL9A3	mir-4500 mir-4458	miR-98-5p miR-30a miR-30b miR-30c-2 miR-30c-1 miR-30d miR-30e miR-185 miR-362-3p miR329-1 miR-329-2 miR-129-5p
IL-1 <sup>a</sup>		miR-24-3p miR-374a miR-590-3p miR-543 miR-203a miR-203b miR-365a miR-365b miR-181a-1 miR-181a-2 miR-181c miR-24-1 miR-24-2 miR-374b miR-30b miR-30c-2 miR-30c-1 miR-30d miR-30a miR-30e miR-653 miR-181b-1 miR-181b-2 miR-181d miR-494 miR-149 miR-448 miR-874 miR-141 miR-200a miR-150 miR-136 miR-340 miR-505 miR410 miR-194-1 miR-194-2 miR-132 miR-212 miR-205 miR-140-5p miR-125a-3p
IL-1B		miR-495 miR-21 miR-590-5p miR-299-3p miR-144

		miR-185 miR-326 miR-330-5p miR-212 miR-132 miR-488 miR-149 miR-204 miR-211 miR-328 miR-340
MMP3	mir-365a mir-365b mir-16-1 mir-16-2	miR-365b-3p miR-365a-3p miR-519d miR-106a miR-106b miR-17 miR-20a miR-20b miR-93 miR-874 miR-31 miR-18a miR-18b miR-497 miR-15a miR-15b miR-195 miR-424 miR-134 miR-302e miR-520a-3p miR-520d-3p miR-520e miR-373 miR-520b miR-250c-3p miR-302a miR-302b miR-302c miR-302d miR-372

Fonte: [http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/) <http://www.microrna.org/microrna/home.do>, 2017

A posição de alinhamento dos microRNAs (Tabela 1) com identidade igual ou maior à 50% de identidade (Figura 1) aos genes alvos (Quadro 2) foi verificada e avaliada utilizando a ferramenta de gráficos do NCBI.

Utilizando a matriz obtida no alinhamento do Clustal (Anexos 1 à 7) realizou-se a seleção dos microRNAs com identidade igual ou superior à 50% para cada gene (Tabelas 1 e 2).



**Tabela 1.** Matriz utilizada para seleção dos microRNAs com identidade maior, ou igual à 50% no alinhamento global.

26:	BC036445.1		32.82	30.84	31.40	28.97	31.78	32.71	38.54
	35.80	35.85	24.29	27.14	45.95	43.22	42.86	32.00	25.00
	57.61	59.55	40.00	40.28	32.35	55.81	42.31	45.45	52.17
	100.00	39.73	54.55	41.18					
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-021334-0015-47083473-oy/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-021334-0015-47083473-oy/pim</a>									
31:	J03258.1		32.05	30.77	34.72	30.88	35.82	34.33	27.78
	29.85	40.00	36.05	36.36	40.91	36.36	26.37	22.73	32.05
	27.27	30.56	26.39	35.29	42.05	40.91	40.91	54.55	54.55
	56.07	44.04	42.55	38.10	45.45	100.00	45.45		
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-022224-0306-44656933-pg/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-022224-0306-44656933-pg/pim</a>									
10:	NM_001852.3		41.18	44.12	48.68	49.06	36.47	37.37	39.19
	46.49	59.09	100.00	61.90	53.25	24.62	11.11	27.42	46.15
	28.81	36.76	37.14	58.33					
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-030247-0589-5703286-oy/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-030247-0589-5703286-oy/pim</a>									
5:	NM_001853.3		40.28	30.00	30.95	40.91	100.00	40.91	39.47
	26.09	28.57	30.77	29.89	29.58	25.00	33.02	35.38	13.33
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-031814-0594-20506856-pg/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-031814-0594-20506856-pg/pim</a>									
42:	M28983.1		34.51	21.95	22.73	33.33	30.59	26.32	30.88
	30.59	29.07	28.74	18.18	29.85	37.89	32.32	37.70	34.57
	27.54	29.09	31.82	30.00	38.32	34.94	34.09	35.00	40.00
	32.63	36.36	40.00	39.47	31.75	40.62	30.59	34.57	32.31
	32.93	33.75	30.77	34.57	37.50	37.50	37.84	100.00	33.33
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-033352-0384-72120116-oy/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-033352-0384-72120116-oy/pim</a>									
16:	NM_000576.2		45.19	43.66	40.00	38.37	36.84	39.29	47.89
	37.61	44.95	31.71	40.48	31.58	51.90	37.50	40.91	100.00
	50.00								
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-033807-0620-48931718-pg/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-033807-0620-48931718-pg/pim</a>									
3:	NM_002422.4		45.21	50.75	100.00	42.31	45.45	45.45	40.51
	25.33	26.97	33.33	37.14	27.50	26.76	34.83	24.19	25.81
	26.15	22.95	28.00	24.68	37.27	33.85	36.07	35.00	36.67
	32.86	25.35	28.77	33.33	32.20	37.74	36.71	31.82	22.73
	34.18	22.73							
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-034212-0564-7487398-oy/pim">http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170904-034212-0564-7487398-oy/pim</a>									

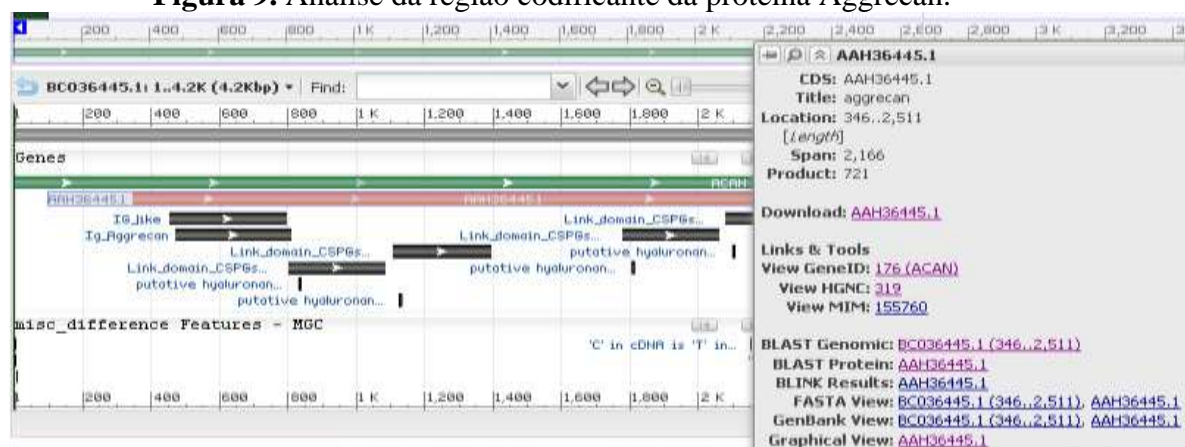
**Legenda:** 26:ACAN, 31:VDR, 10:COL9A2, 5:COL9A3, 42:IL-1A, 16:IL-1B, 3:MMP3

Tabela 2. Análise dos microRNAs com identidade igual ou superior à 50% identificados no alinhamento global

GENE	MicroRNAs identidade $\geq$ 50%	Posição do alinhamento
ACAN	hsa-mir-92b	57.61
	hsa-mir-149	59.55
	hsa-mir-425	55.81
	hsa-miR-339-5p	52.17
	hsa-miR-24-3p	54.55
VDR	hsa-miR-125b-5p	54.55
	hsa-miR-125a-5p	54.55
	hsa-mir-223	56.07
COL9A2	hsa-miR-493-3p	59.09
	hsa-mir-874-3p	61.90
	hsa-mir-874	53.25
	hsa-miR-491-5p	58.33
COL9A3	-	-
IL-1 <sup>a</sup>	-	-
IL-1B	hsa-miR-590-5p	50.00
	hsa-mir-185	51.99
MMP3	hsa-mir-372	50.75

Observou-se que a proteína Aggrecan é localizada na posição 346-2,511 (Figura 9) e que os microRNAs hsa-mir-92b e hsa-mir-149 alinham-se na região codificante da proteína contribuindo provavelmente na regulação da tradução da mesma.

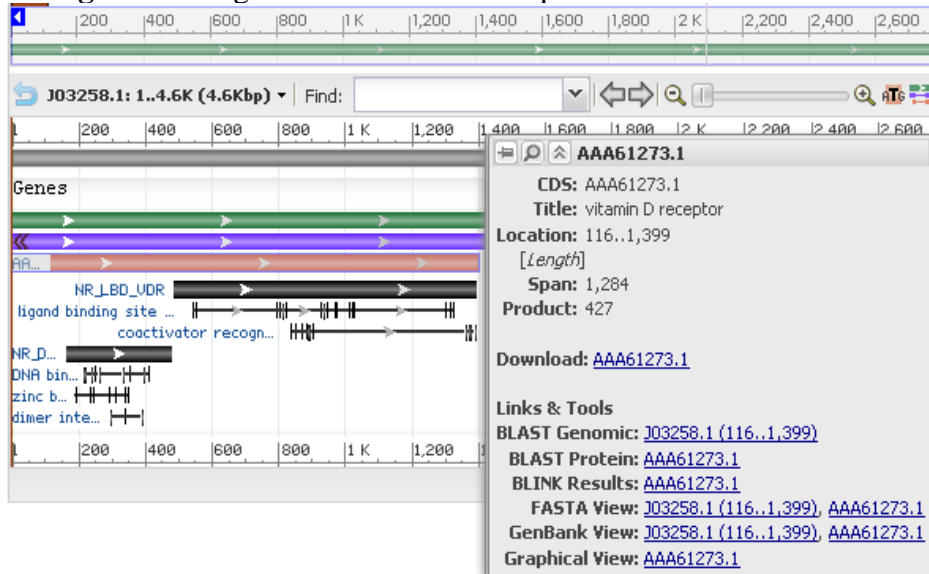
Figura 9. Análise da região codificante da proteína Aggrecan.



Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/BC036445.1?report=graph>.

O receptor de vitamina D é codificado na região 116-1,399 (Figura 10), os microRNAs o hsa-miR-125a-5p e hsa-miR-125b-5p alinha na região codificante da proteína contribuindo provavelmente na regulação da tradução da mesma.

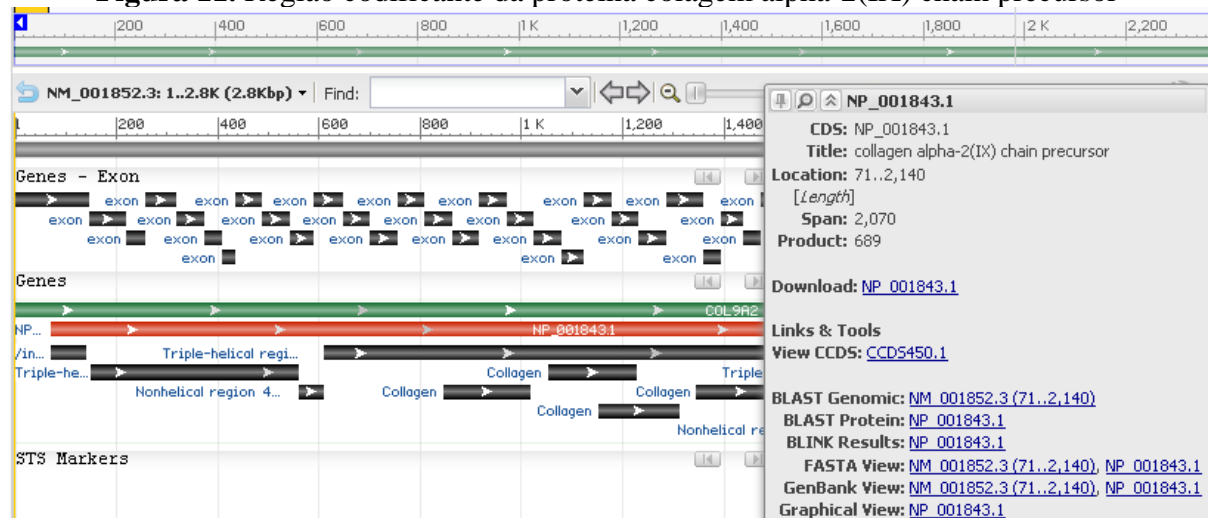
**Figura 10.** Região codificante do receptor da vitamina D.



Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J03258.1?report=graph>

A proteína colagen alpha-2(IX) chain precursor é codificado na região 71-2,140 (Figura 11) e todos os microRNAs listados na Tabela 2 alinham na região codificante da proteína contribuindo provavelmente na regulação da tradução da mesma.

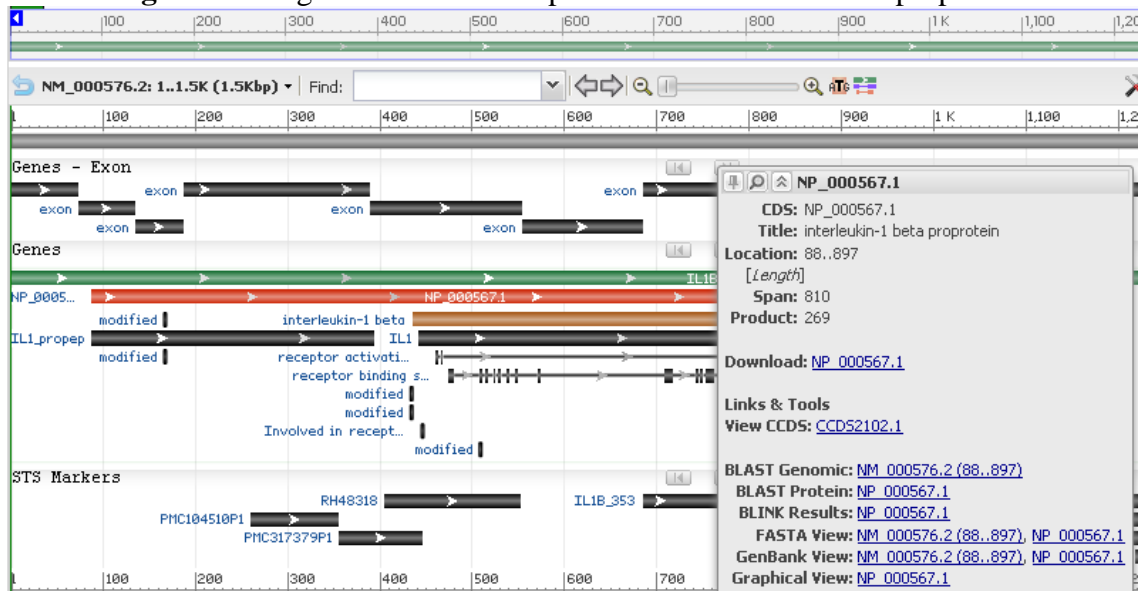
**Figura 11.** Região codificante da proteína colagem alpha-2(IX) chain precursor



Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001852.3?report=graph](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001852.3?report=graph)

A proteína interleukin-1 beta proprotein é codificado na região 88-897 (Figura 12) e o hsa-miR-590-5p e hsa-mir-185 alinham-se na região codificante da proteína contribuindo provavelmente na regulação da tradução da mesma.

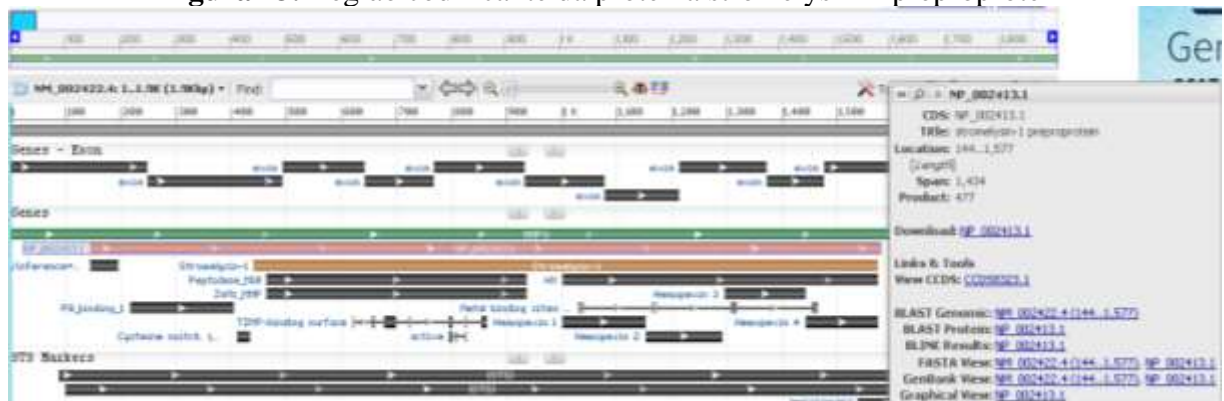
**Figura 12.** Região codificante da proteína interleukin-1 beta proprotein



Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_000576.2?report=graph](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000576.2?report=graph)

A proteína stromelysin-1 preproprotein é codificado na região 144-1,577(Figura 13) e não foi identificado nenhum hsa-mir na região codificante da proteína contribuindo provavelmente não age na regulação da tradução da mesma.

**Figura 13.** Região codificante da proteína stromelysin-1 preproprotein



Fonte: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_002422.4?report=graph](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_002422.4?report=graph)

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que os principais genes descritos na literatura relacionados à degeneração do DI são: *ACAN*, *VDR*, *COL9A2*, *COL9A3*, *IL-1A*, *IL-1 $\beta$*  e *MMP3*.

Kalichaman et al. (2008); Jones et al. (1998) e Hadjipavlou et al. (2008), relataram que as associações mais importantes à DI estão relacionadas à mutações do gene *VDR*. Em que determinados alelos para o polimorfismo *TaqI* do gene e *Fok I VDR* têm sido implicados na degeneração discal em vários estudos.

Boyd et al. (2008); Froes et al. (2005); Tilkeridis et al. (2005) e Jill et al. (2003), também relacionaram os genes *COL9A2* e *COL9A3*, codificantes do colágeno tipo IX à degeneração discal, assim como *MMP-3* por Takahashi et al. (2001) e o gene *agrecan* por Froes et al. (2006).

O gene *ACAN* codifica a proteína *agrecan* e encontra-se presente no cromossomo 15q26.1 (NCBI – National Center for Biothecnology Information). A proteína codificada é composta por dois tipos de elementos estruturais, um núcleo central expandindo de três domínios globulares, flanqueadores. Considerado o maior gene estrutural da cartilagem e encontrado somente nesse tecido, em altos níveis (FROES et al., 2005).

O *agrecan* é um proteoglicano de alto peso molecular, presentes em maior quantidade no núcleo pulposo. São moléculas formadas por uma proteína central ligados a cadeias laterais com os glicosaminoglicanos (GAG), tais como a condroitina e sulfato de *queratan*; Os proteoglicanos ligam-se a outras proteínas e ao hialuronato, formando grandes agregados hidrofílicos capazes de reter água no disco intervertebral, absorvendo a maior parte das forças compressivas que se exercem sobre a coluna vertebral assegurando resistência à compressão do disco durante os movimentos (FROES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013).

Froes et al. (2006), explica o mecanismo pelo qual o gene *ACAN* está relacionado ao aparecimento precoce da degeneração do disco intervertebral, uma vez que o núcleo da proteína *agrecan* está modificado com cadeias glicosaminoglicanos, incluindo o sulfato de *queratan* e de condroitina. Essas cadeias têm natureza polieletrólítica atribuindo ao *agrecan* uma alta pressão osmótica. Sendo assim o encurtamento dessas cadeias diminui a capacidade do disco em conter a água antecipando o processo degenerativo.

O receptor da vitamina D (*VDR*) media a ação da vitamina D e está presente no cromossomo 12q13.11 (NCBI – National Center for Biothecnology Information). A forma hormonal da vitamina D (1,25 dihidroxi vitamina D3) é fundamental para o processo de

mineralização do osso, absorção de cálcio no intestino, controle de cálcio, homeostase de fósforo e regulação do hormônio paratireóideo (FROES *et al.*, 2005).

O gene *VDR* contém muitos polimorfismos intrangênicos associados com a densidade óssea e a formação de osteófitos (FROES *et al.*, 2005). A variação alélica do gene *VDR* foi associada com a gravidade de osteófitos e presença de estreitamento no disco, mas não com a gravidade do estreitamento (JONES *et al.*, 1998).

Os polimorfismos *Taq I* e *Fok I* do gene receptor da vitamina D têm sido associados à degeneração do disco intervertebral. *Taq I* aumenta em 30% a decadência do RNA mensageiro que sinaliza a eficiência da vitamina D, a prevalência do t-alelo de *Taq I*, portanto, aumenta o risco de degeneração discal (HADJIPAVLOU *et al.*, 2008).

Os genes *COL9A2* e *COL9A3* codificam para uma das cadeias polipeptídicas do colágeno IX, expresso no disco intervertebral. Estão localizados no cromossomo 1p33-p32 e no cromossomo 20q13.3, respectivamente (NCBI). O colágeno tipo IX é encontrado nas placas vertebrais terminais e no núcleo e anel fibroso do núcleo. Este tipo de colágeno é responsável pelo suporte mecânico dos tecidos, agindo como ponte entre as moléculas (FROES *et al.*, 2005). Variações na sequência da cadeia [alfa]-2 do colágeno IX, identificadas como alelo *Trp2* e alelo *Trp3* foram associados com a herança autossômica dominante da doença lombar do disco intervertebral. Estes alelos, *Trp2* e *Trp3* alelos resultam na substituição por triptofano dos aminoácidos no colágeno tipo IX. Pacientes que apresentam estas variantes de colágeno tipo IX têm maior propensão de desenvolver doenças no disco intervertebral (FROES *et al.*, 2005; HADJIPAVLOU *et al.*, 2008; HIGASHINO *et al.*, 2006). O gene triptofano possivelmente produz uma instável tripla hélice que eleva a suscetibilidade de lesão mecânica discal (TILKERIDIS *et al.*, 2000).

As citocinas inflamatórias têm sido reconhecidas no processo discogênico, em particular a interleucina-1, por induzir a atividade de enzimas que destroem os proteoglicanos e estar envolvido no processo da dor (SOLOVIEVA *et al.*, 2004).

A interleucina-1 (*IL-1 $\beta$* ) encontra-se no cromossomo 2q14 (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*). Atua na regulação da resposta imune e inflamatória e induzir a apoptose celular. Dessa forma, estas têm como função: aumento da temperatura corporal, aumento da expressão de fatores de adesão das células endoteliais, permitir migração leucocitária e regulação da hematopoiese (DINARELLO, 1994). Acredita-se estar envolvido na patogênese da degeneração do disco por aumentar a produção de enzimas de degradação da matriz extracelular e inibindo sua síntese (CERVIN *et al.*, 2004).

Estudos apontam que os alelos (*IL-1 $\alpha$ T889* e *IL-1 $\beta$ T3954*) pertencentes aos genes que codificam a (*IL-1 $\beta$* ), estão associados com abaulamento discal, o que sugere que o fator genético pode provocar alterações na função de mediadores pró-inflamatórios influenciando na degeneração do disco (SOLOVIEVA *et al.*, 2004).

*MMP-3* (*estromelisina-1*) codifica uma enzima potente na degradação dos componentes da matriz do DI, tais como proteoglicanos, fibronectina, gelatinas, e colagênio. Localiza-se no cromossoma 11 - NC\_000011.10 (NCBI – *National Center for Biothechnology Information*). Também afeta indiretamente a degradação do matriz extracelular por activação de outros *MMPs*. A sua produção é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como factor de necrose tumoral (*TNF- $\alpha$* ). A degradação da matriz do disco é um importante passo na sua degeneração (TAKAHASHI *et al.*, 2001; LIANG *et all.*, 2013).

Um polimorfismo comum na região do promotor do gene *MMP-3* humano tem sido identificadas em que um alelo tem uma série de seis adenosinas (6A) e as outras cinco (5A). Este polimorfismo pode está envolvido na regulação da *MMP-3* do gene expressão com o alelo 5A tendo o dobro da atividade promotorar o alelo 6<sup>a</sup>. Os efeitos cumulativos resultantes de diferenças na expressão da *MMP-3* na comparação dos genótipos podem resultar em degeneração do disco intervertebral (TAKAHASHI *et all.*, 2001).

Estudos recentes têm associado um novo fator que pode estar envolvido na degeneração do DI, afetando a expressão gênica, os microRNAs. Estes são uma classe de mRNAs não codificantes, compostos por 21 a 25 nucleotídeos, que podem se ligar a sequências específicas de RNAs codificadores de proteínas (HE *et al.*, 2004). Aproximadamente um terço de todos RNAs mensageiros de mamíferos parecem estar sob regulação dos microRNAs sugerindo um papel essencial na regulação da expressão gênica (YU *et al.*, 2013).

Neste estudo verificou-se os principais microRNAs para os genes alvos (Quadro 2), assim como a posição do alinhamento e possível interação com regiões importantes na tradução das proteínas relacionadas à DI. Segundo Miyaky *et al.* (2010), os microRNAs atuam como reguladores endógenos da expressão do gene, reprimindo a tradução de proteínas e / ou induzindo a degradação de mRNA através de emparelhamento de bases com regiões não traduzidas (3'UTR) dos seus mRNAs alvos específicos. E Yu *et al.* (2013), relataram a participação dos microRNAs em muitos processos celulares, incluindo a proliferação celular, apoptose, e a libertação de citoquinas.

A matriz obtida dos alinhamentos realizados (Tabela 1) proporcionou uma melhor análise de identidade entre os microRNAs e seus alvos, possibilitando uma seleção dos

microRNAs como maior interação em regiões do mRNA com informações gênicas para codificação das proteínas relacionadas à DI (Tabela 2).

Observou-se que os microRNAs ( hsa-miR-92b, hsa-miR-149, hsa-miR-425, hsa-miR-339-5p e hsa-miR-24-3p), regulam a expressão do gene ACAN. Segundo FROES *et al* (2005), este gene está associado ao aparecimento precoce da degeneração do disco intervertebral, uma vez que o núcleo da proteína agrecan está modificado com cadeias glicosaminoglicanos, incluindo o sulfato de queratan e condroitina.

Sendo assim o encurtamento dessas cadeias diminui a capacidade do disco em conter água antecipando o processo degenerativo. Segundo WZB *et al.* (2013), o miR-92b promove a proliferação de células e ZHUANG *et al.* (2016) regula positivamente o tecido promovendo a proliferação celular o que vai aumentar a expressão da proteína acan diminuindo o processo de degeneração do disco intervertebral.

YING *et al.* (2012), relatam que o miR-149 regula negativamente, inibindo a proliferação celular, o que diminuiria a expressão do gene aumentando assim o processo de degeneração do disco intervertebral. O miR-425, segundo LEVA *et al.* (2013), reduziu a expressão e proliferação, alterando a tumorigênese e a metástase aumentando a expressão de marcadores epiteliais em células agressivas de câncer de mama e fornece evidências convincentes para a regulação transcricional para seus determinantes biológicos específicos do contexto nos cânceres de mama.

ZHOU, *et al* (2013), demonstraram que o miR-339-5p desempenha um papel na inibição do crescimento e metástase celular, com o aumento da sua expressão funciona como um supressor de tumores. Segundo XU *et al* (2012), o miR-24-3p pode regular a proliferação celular em diferentes tipos de células, como glioma e atua como supressor de tumor hepatocelular, inibindo a proliferação de células de carcinoma hepatocelular ( CHEN *et al* ,2016).

Os microRNAs hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p e hsa-miR-223, regulam a expressão do gene VDR, receptor da vitamina D, fundamental para o processo de mineralização do osso e absorção de cálcio no intestino. Segundo SEBASTIANI *et al.* (2017), o aumento do miR125a-5p resulta em uma expressão reduzida das células, o que pode resultar na diminuição da expressão do gene VDR, com isto o aparecimento de osteófitos contribuindo assim para a progressão da DDI. A expressão do miR-125b-5p, de acordo com NINOMIYA, *et al.* (2016), está relacionada à etiologia da infecção crônica por hepatite b, podendo baixar a expressão do gene; e desempenha papel importante em regulação de células cancerosas, podendo servir como um importante regulador positivo.



O miR-223 é desregulado em muitas inflamações, podendo influenciar a produção de IL1B. É sobreexpressa nas células T sinoviais e periféricas de pacientes com artrite reumatóide, osteoartrite. O silenciamento pode suprimir a artrite induzida por colágeno. Os níveis mais altos de miR-223 resultam em aumento da inflamação (HANEKLAUS et al, 2013). Mostrando que também há uma regulação entre os genes relacionados.

O gene COL9A2 tem sua expressão regulada pelos microRNAs hsa-miR-493-3p, hsa-miR- 874-3p, hsa-miR-874 e hsa-miR-491-5p, e contem informações para a codificação de colágeno responsável pelo suporte mecânico dos tecidos, agindo como ponte entre as moléculas (FROES *et al.*, 2005). Segundo MAHESH *et al* ( 2016), o excesso do miR-493-3p resultou em resistência das células cancerosas aos medicamentos com microtúbulos e redução da sobrevivência de pacientes com tumores agressivos de mama e ovário, sugerindo sua importância no diagnóstico e na eficácia do tratamento da quimioterapia. Sendo assim, o aumento do miR-493-3p aumenta a expressão do gene COL9A2 diminuindo a suscetibilidade de lesão mecânica discal.

KUSHWAHA et al (2016), relatam que durante a gravidez e lactação ocorre uma transferência de cálcio da mãe para o filho e que no período de desmame ocorre aumento da expressão do miR- 874-3p, período este, que ocorre uma recuperação da perda óssea, induzindo a mineralização dos osteoblastos. Podendo se tornar um alvo terapêutico para condições de perda óssea. Segundo WANG et al (2013), foi regulada positivamente, indicando que a diminuição de miR-874 resulta em uma redução na necrose miocárdica, diminuição nas células positivas de miosina necrótica. A expressão forçada de miR-491-5p inibe significativamente a proliferação e a formação de colônias e promove a apoptose em células do câncer gástrico atuando como anti-oncogene ( SUN, et al., 2017).

Os microRNAs hsa-miR-590-5p e hsa-mir-185, regulam a expressão do gene IL-1B; CERVIN *et al* (2014), demonstraram que o gene IL-1B está envolvida na patogênese da degeneração do disco por aumentar a produção de enzimas de degradação da matriz extracelular. Atua na regulação da resposta imune e inflamatória e induz a apoptose celular (DINARELLO,1994). De acordo com QINYXIN, *et al* (2016), o miR-590-5p inibe a angiogênese e a metástase celular , destacando seu potencial como alvo para terapias. O mir-185 pode inibir vírus, como o da hepatite C viral e outros através da regulação de vias imunometabólicas (RAGUNATH *et al.*, 2015). Os dois microRNAs regulam o gene IL-1B diminuindo sua expressão, com isso, diminui o processo inflamatório que causa dor, a apoptose celular e o abaulamento discal, retardando assim a DDI.

O microRNA hsa-mir-372, regula a expressão do gene *MMP3* (estromelina-1) que tem informações para a codificação de uma enzima potente na degradação dos componentes da matriz do DI, (TAKAHASHI et al., 2001; LIANG et al., 2013). Segundo WU, et al (2015), o mir-372 expresso em níveis mais baixos em linhagens de câncer de cólio de útero (HCC) e estava relacionado a metástase tumorais e prognóstico ruim, ao controlar negativamente seu gene alvo *ATAD2* (*ATPase family AAA domain-containing protein 2*). Contudo, o hsa-mir-372 não alinha na região codificante da proteína estromelina-1 e são necessários mais estudos para verificar se realmente há interação do mesmo no *MMP3*.

## 5 CONCLUSÃO

Verificou-se que os principais genes envolvidos no processo degenerativo do disco intervertebral são: *ACAN* (AGRECAN), *VDR* (receptor da vitamina D), *COL9A2* (colágeno tipo IX alfa 2) e *COL9A3* (colágeno tipo IX alfa 3), que codificam o colágeno tipo IX, *IL1A* (interleucina-1 alfa), *IL1B* (interleucina 1 beta) e *MMP-3* (estromelisin-1).

Também identificou-se os principais microRNAs relacionados à regulação dos mesmos: *ACAN* - hsa-mir-92b e hsa-mir-149; *VDR* - hsa-miR-125a-5p e hsa-miR-125b-5p; *COL9A2* - hsa-miR-493-3p, hsa-mir-874-3p, hsa-mir-874, hsa-miR-491-5p; e *IL1B* - hsa-miR-590-5p e hsa-mir-185. Não houve identificação de microRNAs para a região codificante da proteína MMP3.

Portanto, foi possível identificar *in silico* os microRNAs reguladores dos genes responsáveis pela degeneração do disco intervertebral e serão necessários estudos laboratoriais para validação dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- ABOUHEIF MM, NAKASA T, SHIBUYA H, NIIMOTO T, KONGCHAROENSOMBAT W e OCHI M. **Silencing microRNA-34a inhibits chondrocyte apoptosis in a rat osteoarthritis model in vitro**. *Rheumatology*, v.49, p.2054-2060, 2010. Disponível em:<<https://rheumatology.oxfordjournals.org/content/early/2010/07/29/rheumatology.keq247.full>>. Acesso em: 2016-02-11.
- ADAMS M, DOLAN P. **Recent advances in lumbar spinal mechanics and their clinical significance**. *Clinical Biomechanics*, v. 10, n. 1, p. 3-19, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11415526>>. Acesso em: 2015-08-16.
- AMARAL AB; NONAKA WFC; FREITAS AR; SOUZA BL E PINTO PL. **MicroRNAs – Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral**. *Odontol.Clín – Cient., Recife*, 9 (2) 105 – 109, abr./jun, 2010. Disponível em:< <http://www.cro-pe.org.br>>. Acesso em 2017-07-01.
- ANNUNEN S, PAASSILTA P, LOHINIVA J, PERÄLÄ M, PIHLAJAMAA T, KARPPINEN J, et al. **An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease**. *Science*. v.285; n.5426; p.409-412; 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411504>>. Acesso em: 2015-12-17
- BAPTISTA JS, FONTES RBV, LIBERTI EA. **Envelhecimento e degeneração do disco intervertebral: Revisão Da Ciência Básica**; *Coluna/Columna*; v.14; n.2; p.144-148; 2015. Disponível em: <[http://static.revistacoluna.com/pdf/volume14/coluna\\_v14n2\\_p144-148.pdf](http://static.revistacoluna.com/pdf/volume14/coluna_v14n2_p144-148.pdf)>. Acesso em: 2015-08-16.
- BATTIÉ MC, VIDEMAN T, PARENT E. **Lumbar disc degeneration epidemiology and genetic influences**. *Spine*, v. 29, n. 23, p.2679-2690, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595435>>. Acesso em: 2015-07-07.
- BARBOSA MHN; **Diretrizes III E IV Diagnóstico complementar**. *Bras Reumatol*, v. 48, supl. 1, p. 2-25, mar/abr, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbr/v48s1/05.pdf>>. Acesso em: 2016-01-11.
- BIBBY S, JONES DA, LEE RB, JING U, URBAN J. **The pathophysiology of the intervertebral disc**. *Joint Bone Spine*, v. 68, p. 537-542, 2001.
- BOOS N, AEBI M. **Spinal Disorders Fundamentals of Diagnosis and Treatment**; Springer -Verlag Berlin Heidelberg New York; 2008.
- BOOS N, NERLICH AG, WIEST I, MARK K, AEBI M. **Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration**. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 108, p. 471–480, 1997. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s004180050187#page-1>>. Acesso em:
- BRAZIL AV, XIMENES AC, RADU AS, FERNADES AR, APPEL C, MAÇANEIRO CH, RIBEIRO CH, GOMES C, MEIRELLES ES, PUERTAS EB et al. **Diagnóstico e tratamento**

**das lombalgias e lombociatalgias.** Rev. Bras. Reumatol. vol.44, no.6, São Paulo, Nov./Dec. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbr/v44n6/05.pdf>>. Acesso em: **2015-07-07**.

BROBERG K. **Slow deformation of intervertebral discs.** Journal of Biomechanics; v.26; p.501–512; April/May. 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021929093900124>>. Acesso em: 2016-02-11.

BO ZHAO, QIANG YU, HAOPENG LI, XIONG GUO and XIJING HE. **Characterization of microRNA expression profiles in patients with intervertebral disc degeneration,** Int J Mol Med. Jan; 33(1): 43–50; 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868557/>>. Acesso em: 2015-12-16.

BOYD LM, RICHARDSON WJ, ALLEN KD, FLAHIFF C, JING L, LI Y, et al. **Early-onset degeneration of the intervertebral disc and vertebral end plate in mice deficient in type IX collagen.** Arthritis Rheum. v.58, n.1, p.164-71, 2008;. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163498>>. Acesso em: 2016-02-11.

CARVALHO OV; CARVALHO OV; SILVA MM; GUIMARÃES VG E BACCHI AE. MicroRNAs: um novo paradigma no tratamento e diagnóstico da insuficiência cardíaca? **Arq. Bras. Cardiol. Vol.98 no.4 São Paulo Apr.2012.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2012000400011>>. Acesso em: 2017- 07-01.

CASSAR-PULLICINO VN. **MRI of the ageing and herniating intervertebral disc.** European Journal of Radiology, v. 27, p. 214–2, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0720048X97001691>>. Acesso em:

CERVIN SS, GONZÁLEZ DV, AGUILAR-MEDINA M, et al. **Polimorfismos genéticos de interleucina-1 alfa e receptor da vitamina D no México Mestizo Pacientes com Intervertebral Disc Degeneration.** *Internacional Journal of Genomics.* p.302.568, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4258367/>>. Acesso em: 2015-08-16.

CEPPI M, PEREIRA P M, DUNAND-SAUTHIER I, BARRAS E et al. **MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells.** Journal ListProc Natl Acad Sci U S Av.106(8); 2009 Feb 24PMC2650335. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2650335>>. Acesso em: 2017-09-14.

CHEN J, LUO H L, WU F X , LIU J J et al. **Original Article miR-24-3p suppresses cellular proliferation in hepatocellular CARCINOMA** Int J Clin Exp Med 2016;9(11):21672-21680 [www.ijcem.com](http://www.ijcem.com) /ISSN:1940-5901/IJCEM0029369. Disponível em <: Int J Clin Exp Med 2016;9(11):21672-21680 [www.ijcem.com](http://www.ijcem.com) /ISSN:1940-5901/IJCEM0029369> . Acesso em: 2017-09-13

COX MJ. **Dor Lombar: mecanismo, diagnóstico e tratamento.** 6ª ed. Brasil: Manole, 2002.

DEZAN VH, RODACKI ALF, RODACKI CLN, SANTOS AM, OKAZAKI VHA, SARRAF TA. **Comparação dos efeitos compressivos do disco intervertebral nas condições de**

**levantamento de peso nas posições sentada e em pé.** Revista Brasileira de Biomecânica, n. 7, p. 41-49, 2003.

DINARELLO CA. **The interleukin-1 family: 10 years of discovery.** FASEB J v.8; n.15; p. 1314-1325; 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001745>>. Acesso em: 2016-01-05.

EKLUND JA, CORLETT NE. **Shrinkage as a measure of the effect of load on the spine.** Spine, v. 9, n. 2, p. 189-194, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6539504>>. Acesso em:

FERMINO R, GARGANTA R, SEABRA A, MAIA JAR. Efeitos genéticos e ambientais nos indicadores da composição corporal. **Uma revisão centrada em estudos de agregação familiar.** Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum. v.9: p.414- 23, 2007.

FROES NDTC, NUNES FTB, NEGRELLI WF; **Influência Genética na degeneração do disco Intervertebral;** acta ortop bras 13(5); p 255-257- 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/aob/v13n5/en\\_a10v13n5.pdf](http://www.scielo.br/pdf/aob/v13n5/en_a10v13n5.pdf)>. Acesso em: 2015-09-16.

GARFIN SR. **The intervertebral disc disease – does it exist?.** In: Weinstein JN, Wiesel SW (eds). The Lumbar Spine. W.B. Saunders: Philadelphia, 1990, pp 369–380.

GENEVAY S, **Lumbar spinal stenosis.** Atlas SJ. Best Pract Res Clin Rheumatol.; v. 24; n.2; p.253-255; 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2841052/>>. Acesso em: 2015-10-19.

GRABINER MD. **A coluna vertebral.** In: RASCH, F. Cinesiologia e Anatomia Aplicada. Rio de Janeiro: Guanabara, 1991.

GAMRADT SC, WANG JW. **“Lumbar disc arthroplasty”.** ELSEVIER, The spine Journal 5, p.95-103, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930927>>. Acesso em: 16 abr. 2015.

HADJIPAVLOU AG, TZERMIADIANOS MN, BOGDUK N, ZINDRICK M.R. **The pathophysiology of disc degeneration.** The journal of bone and joint surgery, vol. 90-B, n° 10, Outubro 2008. Disponível em: < <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/90-B/10/1261.short>>. Acesso em: 2015-07-07.

HANDA T, ISHIHARA H, OHSHIMA H, OSADA R, TSUJI H, OBATA K. **Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in human lumbar intervertebral disc.** Spine, v. 22, n. 10, p. 1085-1091,1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160466>>. Acesso em: 16 abr. 2015.

HANEKLAUS M, GERLIC M, L. A. J. O’NEILL L A J & MASTERS S L. **miR-223: infection, inflammation and cancer.** Journal of Internal Medicine. Volume 274, Issue 3, Version of Record online: 25 JUN 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joim.12099/pdf>> Acesso em: 2017-09-13.



**Expression.** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 291, NO. 8, pp. 3959–3966, February 19, 2016 © 2016 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/291/8/3959.full.pdf>>. Acesso em: 2017-09-13.

LEVA G, PIOVAN C, GASPARINI P, NGANKEU A, et al. **Estrogen Mediated-Activation of miR-191/425 Cluster Modulates Tumorigenicity of Breast Cancer Cells Depending on Estrogen Receptor Status.** 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1003311>>. Acesso em 2017-09-13.

McCATHY PW, CARRUTHERS B, MARTIN D, PETTS P. **Immunohistochemical demonstration of sensory nerve fibres and endings in lumbar intervertebral disc of the rat.** Spine, v. 16, n. 6, p. 653-659, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913007/>>. Acesso em: 2015-11-02.

MIYAKI S, NAKASA T, OTSUKI S, GROGAN SP, HIGASHIYAMA R, INOUE A, KATO Y, SATO T; LOTZ, MK and ASAHARA H. **MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses.** *Arthritis Rheum.* Author manuscript; September 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806094/>>. Acesso em: 2016-01-12.

MODIC MT, MASARYK TJ, ROSS JS, CARTER JR. **Imaging of degenerative disk disease.** Radiology;168:177-86; 1988. Disponível em: <<http://pubs.rsna.org/doi/abs/10.1148/radiology.168.1.3289089?journalCode=radiology>>. Acesso em: 2016-01-05.

MOORE K, DALLEY A. **Clinical Oriented Anatomy.** United States of America: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

NACHEMSON AL. **The lumbar spine, an orthopaedic challenge.** The Spine Spine, v.1, n.1, p.59-71, 1976. Disponível em: <[http://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/1976/03000/The\\_Lumbar\\_Spine\\_An\\_Orthopaedic\\_Challenge\\_.9.aspx](http://journals.lww.com/spinejournal/Abstract/1976/03000/The_Lumbar_Spine_An_Orthopaedic_Challenge_.9.aspx)>. Acesso em: 2015-08-16.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 2016-02-22.

NINOMIYA M, KONDO Y, KIMURA O, FUNAYAMA R et al. **The expression of miR-125b-5p is increased in the serum of patients with chronic hepatitis B infection and inhibits the detection of hepatitis B virus surface antigen.** J Viral Hepat. 2016 May;23(5):330-9. doi: 10.1111/jvh.12522. Epub 2016 Feb 29. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26924666>>. Acesso em: 2017-09-13.

NORDIN MF, FRANKEL V.H. **Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System.** Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

NOVAES LFP, NETO MIR, VEIGA IG, PASQUALINI W, CAVALI PTM, LANDIM E. **Variação de conduta cirúrgica em doença degenerativa da coluna lombar**



COLUNA/COLUMNA, v.8, n.1, p:13-18, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/coluna/v8n1/04.pdf>>. Acesso em: 2015-09-22.

OLIVEIRA CP, RODRIGUES LMR, FREGNI MVV, GOTFRYD A, MADE AM, PINHAL MAS. **Remodelamento da matriz extracelular em degeneração experimental do disco intervertebral**. Acta Ortop Bras. v.21,n.3,p.144-149, 2013. Disponível em: <http://docplayer.com.br/14923697-Remodelamento-da-matriz-extracelular-em-degeneracao-experimental-do-disco-intervertebral.html>>. Acesso em: 2015-07-12

ORTIZ J, ABREU AD. **Tratamento cirúrgico da hérnias discais lombares em regime ambulatorial**. Revista Ortopédica Brasileira v35 ns.11/12 p.440-446 nov./dez. 2000. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=283046&indexSearch=ID>>. Acesso em: 2015-12-01.

PERSIKOV AV, RAMSHAW JA, BRODSKY B. **Collagen model peptides: sequence dependence of triple-helix stability**. Biopolymers; v.55, n.6:p.436-450, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304671>>. Acesso em: 2015-12-29.

PRESCHER A. **Anatomy and pathology of the aging spine**. European Journal of Radiology, v. 27, p. 181-195, 1998. Disponível em: <[http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/56/49\\_Anatomy\\_and\\_pathology\\_of\\_the\\_aging\\_spine.pdf](http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/56/49_Anatomy_and_pathology_of_the_aging_spine.pdf)>. Acesso em: 2015-12-17.

RANNOU F, CORVOL M, REVEL M, POIRAUDEAU S. **Disk degeneration and herniation: the contribution of mechanical stress**. Joint Bone Spine, v. 68, p. 543-546, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11808996>>. Acesso em: 2015-12-29.

REILLY T, TYRREL A, TROUP JDG. **Orcadian variation in human stature**. Chronobiology International, v. 1, p. 121-126, 1984. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07420528409059129?journalCode=icbi20>>. Acesso em: 2015-11-22.

RODACKI C, RODACKI A, FOWLER N, BIRCH K. **Measurement variability in determining stature in sitting and standing postures**. Ergonomics, v. 44, n. 12, p. 1076-1085, 2001. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00140130110099407>>. Acesso em: 2015-10-08.

ROUGHLEY PJ. **Age-associated changes in cartilage matrix**. Clinical Orthopaedics and Related Research, n. 391, p. S153-S160, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11603700>>. Acesso em: 2016-02-22.

RUDERT M, TILLMANN B. **Lymph and blood supply of the human intervertebral disc: cadaver study of correlations to discitis**. Acta Orthopedics Scandinavia, v. 64, n. 1, p. 37-40, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8451943>>. Acesso em: 2015-10-08.

SEBASTIANI G, VENTRIGLIA G, STABILINI A, SOCCI C et al. **Regulatory T-cells from pancreatic lymphnodes of patients with type-1 diabetes express increased levels of microRNA miR-125a-5p that limits CCR2 expression**. *Scientific Reports* 7, Article number: 6897, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5537269>>. Acesso em 2017-09-13

SEKI S, KAWAGUCHI Y, MORI M, MIO F, CHIBA K, MIKAMI Y, et al. **Association study of COL9A2 with lumbar disc disease in the Japanese population**. *J Hum Genet.*; v. 51, n. 12, p.1063-1067, 2006. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Yoshiharu\\_Kawaguchi/publication/6771370\\_Association\\_study\\_of\\_COL9A2\\_with\\_lumbar\\_disc\\_disease\\_in\\_the\\_Japanese\\_population/links/54e237930cf2966637961872.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Yoshiharu_Kawaguchi/publication/6771370_Association_study_of_COL9A2_with_lumbar_disc_disease_in_the_Japanese_population/links/54e237930cf2966637961872.pdf)>. Acesso em: 2015-11-18.

SILVA MR, DOMINGUES CJ, PINTO RP, NEVES N, MATOS RM, TULHA JM, CABRA AT; **Novas perspectivas no tratamento da doença degenerativa discal**. *Acta Reumatol Port.* V.34; p.327-335; 2009. Disponível em: <[file:///C:/Users/Ruas/Downloads/436\\_novas\\_perspectivas\\_no\\_tratamento\\_da\\_doen\\_a\\_degenerativa\\_disc\\_327\\_335\\_file.pdf](file:///C:/Users/Ruas/Downloads/436_novas_perspectivas_no_tratamento_da_doen_a_degenerativa_disc_327_335_file.pdf)>. Acesso em: 2015-11-18.

SIMMONS EDJr, GUNTUPALLO M, KOWALSKI JM, BRAUN F, SEIDEL T. **Familial predisposition for degenerative disc disease: a case-control study**. *Spine*; 21: 1527-9; 1996. Disponível em: <<http://www.ssorthospine.com/lit8.html>>. Acesso em: 2015-09-18.

SINGARAVELU R, O'HARA S, Daniel M JONES D M, CHEN R, **MicroRNAs regulate the immunometabolic response to viral infection in the liver**. *Nature Chemical Biology* 11, 988–993(2015)doi:10.1038/nchembio.1940. Disponível em: <<http://www.nature.com/nchembio/journal/v11/n12/abs/nchembio.1940.html>>. Acesso em: 2017-09-13.

SHAO Z, ROMPE G, SCHILTENWOLF M. **Radiographic changes in the lumbar intervertebral disc and lumbar vertebrae age**. *Spine*, v. 27, n. 3, p. 263-268, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805689>>. Acesso em: 2015-11-19.

SOBAJIMA S, KIM JS, GILBERTSON LG, KANG JD. **Gene therapy for degenerative disc disease**. *Gene Therapy*, v.11, p.390–401, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/gt/journal/v11/n4/pdf/3302200a.pdf>>. Acesso em: 2015-07-18.

SOLOVIEVA S, KOUHIA S, LEINOARJAS P, et al. **Interleukin 1 polymorphisms and intervertebral disc degeneration**. *Epidemiology*; v.15, n.8, p. 626-633, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308963>>. Acesso em: 2015-12-17.

SUN R, LIU Z, TONG D, YANG Y et al. **miR-491-5p, mediated by Foxi1, functions as a tumor suppressor by targeting Wnt3a/β-catenin signaling in the development of gastric cancer**. *Cell Death Dis.* 2017 Mar 30;8(3):e2714. doi: 10.1038/cddis.2017.134. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28358374>> . Acesso em 2017-09-13.

TAKAHASHI M, HARO H, WAKABAYASHI Y, KAWA-UCHI T, KOMORI H, SHINOMIYA K. **The association of degeneration of the intervertebral disc with 5a/6a polymorphism in the promoter of the human matrix metalloproteinase-3 gene.** J Bone Joint Surg Br. v. 83, n.4, p. 491-495, maio 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380116>>. Acesso em: 2016-01-12.

TAMBE M, PRUIKKONEN S, MÄKI-JOUPPIA J, CHEN P et al. **Novel Mad2-targeting miR-493-3p controls mitotic fidelity and cancer cells' sensitivity to paclitaxel.** Oncotarget. 2016; 7:12267-12285. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7860>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943585>> . Acesso em: 2017-09-13

THOMPSON JP, PEARCE RH, SCHECHTER MT, ADAMS ME, TSANG IK, BISHOP PB. **Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of human intervertebral disc.** Spine.;15:411-5; 1990. Disponível em: <<http://www.orthochina.com/uploadimage/20090529140246.pdf>>. Acesso em: 2015-11-05.

TILKERIDIS C, BEI T, GARANTZIOTIS S, STRATAKIS CA. **Association of a COL1A1 polymorphism with lumbar disc disease in young military recruits.** J Med Genet. v.42, n.7, e. 44, 2005. Disponível em: <<http://jmg.bmj.com/content/42/7/e44.full.html>>. Acesso em: 2016-01-05

TYRRELL AR, REILLY T, TROUP JDG. **Circadian variation in stature and the effects of spinal loading.** Spine, v. 10, n. 2, p. 159-164, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4002039>>. Acesso em: 2016-02-05.

URBAN JPG; ROBERTS, S. **Degeneration of the intervertebral disc.** Arthritis Research & Therapy. vol 5, n. 3, p. 120-30, Biomed Central, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC165040/>>. Acesso em: 2016-01-11.

VADAPALLI S, ROBON M, BIYANI A, SAIRYO K, KHANDHA A, GOEL VK., **“Effect of Lumbar Interbody Cage Geometry on Construct Stability: A Cadaveric Study”.** Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Spine Volume 31, Number 19, pp. 2189-2194, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946652>>. Acesso em: 2016-01-17.

VIDEMAN T, LEPPAVUORI J, BATTIÈ M, KOSKENVUO M. **Intragenic polymorphisms of the vitamin D receptor gene associated with intervertebral disc degeneration,** Spine 1998; 23: 2477-85.

XIN Y, ZHENG L, JIANXIONG S, WILLIAM W, JINQIAN , XISHENG W and GUIXING Q. **MicroRNA-10b Promotes Nucleus Pulposus Cell Proliferation through RhoC-Akt Pathway by Targeting HOXD10 in Intervetebral Disc Degeneration;** v. 8, n.12, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3869743/>>. Acesso em: 2016-01-12.

WANG K, LIU F, ZHOU L Y,DING S L et al. **miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8.** Journal ListCell Death Disv.4(7); 2013 JulPMC3730407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3730407>> . Acesso em: 2017-09-14.

WANG Y , ZHENG X , ZHANG Z , ZHOU J et al . **MicroRNA-149 Inhibits Proliferation and Cell Cycle Progression through the Targeting of ZBTB2 in Human Gastric Cancer.** Journal ListPLoS Onev.7(10); 2012PMC3483266. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041693>> . Acesso em 2017-09-13

WATKINS, J. **Estrutura e Função do Sistema Musculoesquelético.** Porto Alegre: Artmed, 2001.

WATTERS WC; BONO CM; GILBERT TJ, KREINER DS, MAZANEC DJ, et al. **An evidence-based clinical guideline for the diagnosis and treatment of degenerative lumbar spondylolisthesis.** The Spine Journal, v. 9, ed. 7, p. 609–614, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19447684>>. Acesso em: 2016-01-05.

WHITING W, ZERNICKE R. **Biomechanics of Musculoskeletal Injury.** United States of America: Human Kinetics, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1320593/pdf/jathtrain00012-0084b.pdf>>. Acesso em: 2016-01-23.

WU G, WANG Y, LU X, HE H, et al. **Low mir-372 expression correlates with poor prognosis and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma.** Journal ListBMC Cancerv.15; 2015PMC4379970. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4379970>> . Acesso em 2017-09-13.

XU W, LIU M, PENG X, ZHOU P et al. **miR-24-3p and miR-27a-3p promote cell proliferation in glioma cells via cooperative regulation of MXI1 .** Published online on: December 17, 2012 <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1742>. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2012.1742>. Acesso em: 2017-09-13.

YU X, LI Z, SHEN J, WU WKK, LIANGJ. et al. **MicroRNA-10b Promotes Nucleus Pulposus Cell Proliferation through RhoC-Akt Pathway by Targeting HOXD10 in Intervetebral Disc Degeneration.** v.8, n.12, 2013. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0083080>>. Acesso em: 2016-01-12.

ZHUANG L K, YANG Y T MA X, HAN B et al. **MicroRNA-92b promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting Smad7 and is mediated by long non-coding RNA XIST.** Journal ListCell Death Disv.7(4); 2016 AprPMC4855645. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855645>> . Acesso em: 2017-09-13.

ZHOU C , LIU G ,WANG L, LU Y et al. **MiR-339-5p Regulates the Growth, Colony Formation and Metastasis of Colorectal Cancer Cells by Targeting PRL-1.** Published: May 16, 2013 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063142>. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063142>>. Acesso em: 2017-09-13.

ZHOU O, ZHU Y ,WEI X, ZHOU J et al. **MiR-590-5p inhibits colorectal cancer angiogenesis and metastasis by regulating nuclear factor 90/vascular endothelial growth factor A axis.** Journal ListPLoS Onev.7(10); 2012PMC3483266. Disponível em:

<<http://www.nature.com/cddis/journal/v7/n10/abs/cddis2016306a.html>>. Acesso em: 2017-09-13.

ZYLBERSZTEJN S, SPINELLI LF, RODRIGUES NR, WERLANG PM, KISAKI Y, RIOS ARM, BELLO CD. **Estenose degenerative da coluna lombar**. Rev. Bras. Ortop.. vol 47 no3 São Paulo 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-36162012000300002>>



12:	hsa-mir-873	36.07	34.48	45.61	36.07	43.86	45.16		
42.62	42.86	40.68	50.00	57.14	100.00	-nan	31.58	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	70.59	-nan	-nan	50.00	-nan	-nan
45.95	-nan	-nan	-nan						
13:	hsa-mir-506	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	57.14	-nan	-nan
-nan	-nan	46.67	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
43.22	41.18	-nan	46.15						
14:	hsa-mir-32	45.45	36.36	36.36	40.00	36.36	36.36		
33.33	33.33	33.33	37.50	50.00	31.58	57.14	100.00	20.00	
20.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	42.86	-nan	-nan	-nan					
15:	hsa-mir-92a-1	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	25.53	27.08	-nan	-nan	20.00	100.00	69.86
33.33	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
32.00	-nan	-nan	-nan						
16:	hsa-mir-92a-2	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	28.57	34.00	-nan	-nan	20.00	69.86	100.00
0.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
25.00	-nan	-nan	-nan						
17:	hsa-mir-92b	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	33.33	0.00
100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
57.61	-nan	-nan	-nan						
18:	hsa-mir-149	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
59.55	-nan	-nan	-nan						
19:	hsa-mir-25	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	46.67	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
40.00	-nan	-nan	-nan						
20:	hsa-mir-363	34.21	44.74	50.00	41.38	38.46	46.15		
30.00	30.00	31.58	-nan	-nan	70.59	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	100.00	-nan	-nan	39.13	-nan	-nan
40.28	-nan	-nan	-nan						
21:	hsa-mir-367	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
33.33	28.57	28.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	-nan	-nan	-nan	-nan
32.35	-nan	-nan	-nan						
22:	hsa-mir-425	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	100.00	-nan	-nan	
55.81	-nan	-nan	-nan						
23:	hsa-mir-494	44.44	40.74	44.44	40.74	52.00	51.85		
38.71	38.71	40.00	-nan	-nan	50.00	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	39.13	-nan	100.00	100.00	-nan	-nan
42.31	-nan	-nan	-nan						
24:	hsa-miR-299-3p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	-nan	
45.45	-nan	-nan	-nan						
25:	hsa-miR-339-5p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	
52.17	-nan	-nan	-nan						
26:	BC036445.1	32.82	30.84	31.40	28.97	31.78	32.71		
38.54	35.80	35.85	24.29	27.14	45.95	43.22	42.86	32.00	
25.00	57.61	59.55	40.00	40.28	32.35	55.81	42.31	45.45	
52.17	100.00	39.73	54.55	41.18					

27: hsa-mir-24-2	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	41.18	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
39.73	100.00	100.00	77.61						
28: hsa-miR-24-3p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
54.55	100.00	100.00	100.00						
29: hsa-mir-24-1	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	46.15	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
41.18	77.61	100.00	100.00						



**Anexo 2. Matriz do alinhamento global do gene *VDR* e seus respectivos microRNAs realizado no programa Clustaw Omega**  
[\(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-165212-0577-37685915-oy/pim>\).](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-165212-0577-37685915-oy/pim)

```
#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
      1: hsa-mir-136      100.00  51.72  45.61  39.29  44.64  43.64
45.83  46.43  42.86  50.77  33.33  33.33  33.33  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  27.27  40.00  60.00  60.00  -nan  -nan
47.62  -nan  29.63  25.00  33.33  32.05  -nan
      2: hsa-mir-372      51.72  100.00  51.56  46.88  51.56  53.97
54.84  65.08  57.89  56.06  50.00  45.45  50.00  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
33.33  -nan  25.00  -nan  25.00  30.77  -nan
      3: hsa-mir-302b     45.61  51.56  100.00  71.64  73.13  78.79
65.62  57.14  69.64  59.72  59.09  54.55  59.09  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
41.67  -nan  42.86  -nan  60.00  34.72  -nan
      4: hsa-mir-302a     39.29  46.88  71.64  100.00  72.06  75.00
61.29  49.23  56.90  50.00  63.64  54.55  63.64  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
30.77  -nan  40.00  -nan  50.00  30.88  -nan
      5: hsa-mir-302c     44.64  51.56  73.13  72.06  100.00  82.09
67.74  53.12  61.40  56.72  59.09  54.55  54.55  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
52.00  -nan  35.00  -nan  25.00  35.82  -nan
      6: hsa-mir-302d     43.64  53.97  78.79  75.00  82.09  100.00
66.67  54.69  62.07  58.21  59.09  54.55  54.55  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
42.31  -nan  36.84  -nan  33.33  34.33  -nan
      7: hsa-mir-302e     45.83  54.84  65.62  61.29  67.74  66.67
100.00  67.86  50.00  56.41  59.09  54.55  54.55  -nan  -nan  -
nan  -nan  50.00  37.50  18.18  40.00  40.00  40.00  -nan  -nan
0.00  -nan  24.00  25.00  11.11  27.78  -nan
      8: hsa-mir-373      46.43  65.08  57.14  49.23  53.12  54.69
67.86  100.00  67.24  67.16  68.18  59.09  68.18  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
40.74  -nan  25.00  -nan  0.00  29.85  -nan
      9: hsa-mir-520b     42.86  57.89  69.64  56.90  61.40  62.07
50.00  67.24  100.00  88.52  100.00  80.95  80.95  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
42.86  -nan  46.67  -nan  -nan  40.00  -nan
     10: hsa-mir-520e     50.77  56.06  59.72  50.00  56.72  58.21
56.41  67.16  88.52  100.00  95.45  81.82  81.82  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  0.00  50.00  50.00  50.00  -nan  -nan
46.43  -nan  32.00  50.00  33.33  36.05  -nan
     11: hsa-miR-520c-3p  33.33  50.00  59.09  63.64  59.09  59.09
59.09  68.18  100.00  95.45  100.00  81.82  81.82  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  43.75  -nan  -nan  36.36  -nan
     12: hsa-miR-520a-3p  33.33  45.45  54.55  54.55  54.55  54.55
54.55  59.09  80.95  81.82  81.82  100.00  81.82  -nan  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  37.50  -nan  -nan  40.91  -nan
```

13:	hsa-miR-520d-3p	33.33	50.00	59.09	63.64	54.55	54.55			
54.55	68.18	80.95	81.82	81.82	81.82	100.00	-nan	-nan	-	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	31.25	-nan	-nan	36.36	-nan				
14:	hsa-mir-544a	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	100.00		
68.75	63.64	-nan	-nan	33.33	36.36	46.43	48.15	53.33		
46.67	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	26.37	-nan			
15:	hsa-miR-544a	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	100.00		
68.18	73.33	-nan	-nan	50.00	20.00	55.56	50.00	57.14		
42.86	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	22.73	-nan			
16:	hsa-mir-544b	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	68.75	68.18		
100.00	100.00	-nan	-nan	38.89	53.33	65.00	63.16	64.71		
58.82	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	32.05	-nan			
17:	hsa-miR-544b	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	63.64	73.33		
100.00	100.00	-nan	-nan	33.33	41.67	62.50	60.00	64.29		
57.14	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	27.27	-nan			
18:	hsa-mir-374a	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
50.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	100.00	76.06	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	30.56	-nan				
19:	hsa-mir-374b	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
37.50	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	76.06	100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	26.39	-nan				
20:	hsa-mir-4319	27.27	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
18.18	-nan	-nan	0.00	-nan	-nan	-nan	33.33	50.00		
38.89	33.33	-nan	-nan	100.00	53.12	47.44	44.87	52.38		
57.14	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	35.29	-nan			
21:	hsa-mir-145	40.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
40.00	-nan	-nan	50.00	-nan	-nan	-nan	36.36	20.00		
53.33	41.67	-nan	-nan	53.12	100.00	55.84	56.96	70.00		
70.00	-nan	50.00	50.00	100.00	0.00	42.05	-nan			
22:	hsa-mir-10a	60.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
40.00	-nan	-nan	50.00	-nan	-nan	-nan	46.43	55.56		
65.00	62.50	-nan	-nan	47.44	55.84	100.00	70.48	72.73		
68.18	-nan	50.00	75.00	0.00	0.00	40.91	-nan			
23:	hsa-mir-10b	60.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
40.00	-nan	-nan	50.00	-nan	-nan	-nan	48.15	50.00		
63.16	60.00	-nan	-nan	44.87	56.96	70.48	100.00	72.73		
68.18	-nan	50.00	50.00	100.00	0.00	40.91	-nan			
24:	hsa-miR-125b-5p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	53.33	57.14		
64.71	64.29	-nan	-nan	52.38	70.00	72.73	72.73	100.00		
95.45	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	54.55	-nan			
25:	hsa-miR-125a-5p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	46.67	42.86		
58.82	57.14	-nan	-nan	57.14	70.00	68.18	68.18	95.45		
100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	54.55	-nan			
26:	hsa-mir-223	47.62	33.33	41.67	30.77	52.00	42.31			
0.00	40.74	42.86	46.43	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	56.07	-nan				
27:	hsa-mir-214	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	50.00	50.00	50.00	-nan	-nan	-nan
-nan	100.00	-nan	-nan	-nan	44.04	-nan				

28: hsa-mir-326	29.63	25.00	42.86	40.00	35.00	36.84				
24.00	25.00	46.67	32.00	43.75	37.50	31.25	-nan	-nan	-	
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	50.00	75.00	50.00	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	100.00	50.00	46.15	42.55	-nan				
29: hsa-miR-129-5p	25.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
25.00	-nan	-nan	50.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	0.00	100.00	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	50.00	100.00	33.33	38.10	69.23				
30: hsa-miR-485-5p	33.33	25.00	60.00	50.00	25.00	33.33				
11.11	0.00	-nan	33.33	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	0.00	0.00	0.00	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	46.15	33.33	100.00	45.45	-nan				
31: J03258.1	32.05	30.77	34.72	30.88	35.82	34.33				
27.78	29.85	40.00	36.05	36.36	40.91	36.36	26.37	22.73		
32.05	27.27	30.56	26.39	35.29	42.05	40.91	40.91	54.55		
54.55	56.07	44.04	42.55	38.10	45.45	100.00	45.45			
32: hsa-miR-330-5p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	69.23	-nan	45.45	100.00				

**Anexo 3. Matriz do alinhamento global do gene COL9A2 e seus respectivos microRNAs realizado no programa Clustaw Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-165726-0872-56926104-oy/pim>).**

```

#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
      1: hsa-mir-18a      100.00  88.73  -nan  -nan  -nan  -nan
50.00  -nan  -nan  41.18  -nan  -nan  28.26  25.00  30.56
46.34  38.89  25.71  41.30  39.13  46.15
      2: hsa-mir-18b      88.73  100.00  -nan  -nan  -nan  -nan
56.00  -nan  -nan  44.12  -nan  -nan  28.26  37.50  41.67
53.66  47.22  34.29  45.65  43.48  53.85
      3: hsa-mir-760      -nan  -nan  100.00  0.00  37.14  40.00  -
nan  44.23  -nan  48.68  -nan  100.00  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  -nan  -nan  -nan
      4: hsa-mir-143      -nan  -nan  0.00  100.00  37.50  50.00  -
nan  68.75  -nan  49.06  -nan  54.17  -nan  -nan  -nan  70.00
100.00  40.00  -nan  66.67  -nan
      5: hsa-mir-133a-1  -nan  -nan  37.14  37.50  100.00  93.18
100.00  73.75  -nan  36.47  45.45  43.18  -nan  -nan  100.00  -
nan  -nan  -nan  100.00  -nan  -nan
      6: hsa-mir-133a-2  -nan  -nan  40.00  50.00  93.18  100.00
55.56  71.43  -nan  37.37  45.45  44.00  40.00  -nan  33.33  -
nan  -nan  -nan  50.00  -nan  -nan
      7: hsa-mir-194-1   50.00  56.00  -nan  -nan  100.00  55.56
100.00  -nan  -nan  39.19  -nan  -nan  38.24  57.89  44.44
47.83  43.24  36.96  72.22  40.91  50.00
      8: hsa-mir-133b    -nan  -nan  44.23  68.75  73.75  71.43  -
nan  100.00  -nan  46.49  50.00  60.38  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  -nan  -nan  -nan
      9: hsa-miR-493-3p  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -
nan  -nan  100.00  59.09  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  -nan  -nan  -nan
     10: NM_001852.3     41.18  44.12  48.68  49.06  36.47  37.37
39.19  46.49  59.09  100.00  61.90  53.25  24.62  11.11  27.42
46.15  37.74  28.81  36.76  37.14  58.33
     11: hsa-miR-874-3p  -nan  -nan  -nan  -nan  45.45  45.45  -
nan  50.00  -nan  61.90  100.00  100.00  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  -nan  -nan  -nan
     12: hsa-mir-874    -nan  -nan  100.00  54.17  43.18  44.00  -
nan  60.38  -nan  53.25  100.00  100.00  -nan  -nan  -nan  -nan
-nan  -nan  -nan  -nan
     13: hsa-mir-3167   28.26  28.26  -nan  -nan  -nan  40.00
38.24  -nan  -nan  24.62  -nan  -nan  100.00  54.55  55.71
44.64  36.96  39.13  46.48  46.94  45.45
     14: hsa-miR-876-5p  25.00  37.50  -nan  -nan  -nan  -nan
57.89  -nan  -nan  11.11  -nan  -nan  54.55  100.00  72.73
57.89  60.00  47.06  56.25  44.44  0.00
     15: hsa-mir-873    30.56  41.67  -nan  -nan  100.00  33.33
44.44  -nan  -nan  27.42  -nan  -nan  55.71  72.73  100.00
52.27  47.62  23.53  45.16  45.00  35.71
     16: hsa-mir-200b   46.34  53.66  -nan  70.00  -nan  -nan
47.83  -nan  -nan  46.15  -nan  -nan  44.64  57.89  52.27
100.00  73.85  46.03  45.65  64.79  52.94

```

17: hsa-mir-200c	38.89	47.22	-nan	100.00	-nan	-nan		
43.24	-nan	-nan	37.74	-nan	-nan	36.96	60.00	47.62
73.85	100.00	46.67	47.06	64.29	30.00			
18: hsa-mir-665	25.71	34.29	-nan	40.00	-nan	-nan		
36.96	-nan	-nan	28.81	-nan	-nan	39.13	47.06	23.53
46.03	46.67	100.00	50.00	50.79	47.06			
19: hsa-mir-194-2	41.30	45.65	-nan	-nan	100.00	50.00		
72.22	-nan	-nan	36.76	-nan	-nan	46.48	56.25	45.16
45.65	47.06	50.00	100.00	65.31	63.64			
20: hsa-mir-429	39.13	43.48	-nan	66.67	-nan	-nan		
40.91	-nan	-nan	37.14	-nan	-nan	46.94	44.44	45.00
64.79	64.29	50.79	65.31	100.00	59.09			
21: hsa-miR-491-5p	46.15	53.85	-nan	-nan	-nan	-nan		
50.00	-nan	-nan	58.33	-nan	-nan	45.45	0.00	35.71
52.94	30.00	47.06	63.64	59.09	100.00			

**Anexo 4.** Matriz do alinhamento global do gene *COL9A3* e seus respectivos microRNAs realizado no programa Clustaw Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-170247-0370-45575380-es/pim>).

```
#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
1: hsa-mir-4458      100.00  38.89  38.89  -nan  40.28  27.27
55.32  36.36  40.00  40.35  41.82  41.07  38.60  32.69  34.29
27.27
2: hsa-mir-329-1    38.89  100.00  98.75  100.00  30.00  52.38
57.14  40.00  35.00  25.00  39.29  47.62  46.43  17.65  14.29
9.09
3: hsa-mir-329-2    38.89  98.75  100.00  100.00  30.95  52.38
57.14  40.00  35.00  25.00  39.29  47.62  46.43  17.65  14.29
9.09
4: hsa-miR-362-3p   -nan  100.00  100.00  100.00  40.91  -nan  -
nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan
5: NM_001853.3      40.28  30.00  30.95  40.91  100.00  40.91
39.47  26.09  28.57  30.77  29.89  29.58  25.00  33.02  35.38
13.33
6: hsa-miR-98-5p    27.27  52.38  52.38  -nan  40.91  100.00
63.64  62.50  50.00  50.00  50.00  56.25  56.25  26.67  25.00
42.86
7: hsa-mir-4500     55.32  57.14  57.14  -nan  39.47  63.64
100.00  50.00  46.67  47.83  52.38  52.27  50.00  43.14  32.00
42.86
8: hsa-mir-30d      36.36  40.00  40.00  -nan  26.09  62.50
50.00  100.00  80.00  77.14  66.18  58.57  60.87  40.30  27.03
27.27
9: hsa-mir-30a      40.00  35.00  35.00  -nan  28.57  50.00
46.67  80.00  100.00  84.51  66.18  60.00  66.67  41.18  39.47
27.27
10: hsa-mir-30e     40.35  25.00  25.00  -nan  30.77  50.00
47.83  77.14  84.51  100.00  59.09  58.33  55.06  48.75  45.83
36.36
11: hsa-mir-30b     41.82  39.29  39.29  -nan  29.89  50.00
52.38  66.18  66.18  59.09  100.00  70.00  73.56  48.68  41.30
27.27
12: hsa-mir-30c-2   41.07  47.62  47.62  -nan  29.58  56.25
52.27  58.57  60.00  58.33  70.00  100.00  78.87  44.12  34.21
45.45
13: hsa-mir-30c-1   38.60  46.43  46.43  -nan  25.00  56.25
50.00  60.87  66.67  55.06  73.56  78.87  100.00  41.56  33.33
45.45
14: hsa-mir-202     32.69  17.65  17.65  -nan  33.02  26.67
43.14  40.30  41.18  48.75  48.68  44.12  41.56  100.00  59.57
30.00
15: hsa-mir-185     34.29  14.29  14.29  -nan  35.38  25.00
32.00  27.03  39.47  45.83  41.30  34.21  33.33  59.57  100.00
52.38
16: hsa-miR-129-5p  27.27  9.09  9.09  -nan  13.33  42.86
42.86  27.27  27.27  36.36  27.27  45.45  45.45  30.00  52.38
100.00
```

**Anexo 5. Matriz do alinhamento global do gene *IL1A* e seus respectivos microRNAs realizado no programa Clustaw Omega**  
[\(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-170807-0546-77503468-oy/pim>\)](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-170807-0546-77503468-oy/pim).

```
#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
      1: hsa-mir-181d      100.00   71.00   59.77   33.85   35.63   34.21
42.11   51.06   53.68   56.67   40.00   32.73   41.33   31.58   42.11
34.33   29.85   37.74   33.33   28.00   36.11   29.03   34.38   23.33
35.14   47.37   -nan    38.71   31.03   28.57   32.14   24.32   16.22
6.90    19.44   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    12.90   34.51   -
nan
      2: hsa-mir-181b-1   71.00   100.00   72.73   32.88   32.22   36.67
51.67   49.41   52.69   56.63   54.55   25.00   36.99   30.99   33.33
36.92   34.00   27.66   13.33   20.83   30.00   23.33   21.21   28.57
31.25   29.41   -nan    30.30   30.65   40.91   36.36   38.71   32.26
26.09   32.26   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    16.67   21.95   -
nan
      3: hsa-mir-181b-2   59.77   72.73   100.00   34.48   35.71   32.76
45.00   62.50   69.01   63.01   54.55   34.04   34.78   33.33   39.58
42.86   43.48   32.56   26.67   27.27   31.82   13.64   28.00   30.77
20.00   20.00   -nan    38.60   35.85   25.00   37.50   29.41   23.53
11.11   23.53   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    13.64   22.73   -
nan
      4: hsa-mir-365a     33.85   32.88   34.48   100.00   83.72   53.85
53.85   51.52   43.06   51.56   50.00   37.50   40.98   31.48   38.64
31.03   26.32   25.00   40.00   24.44   31.43   34.29   34.15   33.33
32.43   7.14    -nan    32.73   37.25   42.86   50.00   44.44   38.89
33.33   33.33   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    28.57   33.33   -
nan
      5: hsa-mir-365b     35.63   32.22   35.71   83.72   100.00   54.90
56.86   48.48   46.15   50.00   50.00   29.51   42.86   30.43   47.27
27.78   34.62   22.45   40.00   27.27   39.02   41.18   41.46   34.38
36.84   14.29   -nan    31.82   40.98   23.08   30.77   22.86   31.43
29.63   26.47   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    36.59   30.59   -
nan
      6: hsa-mir-194-1    34.21   36.67   32.76   53.85   54.90   100.00
65.28   36.51   39.29   44.26   40.91   41.18   45.10   29.63   37.93
18.75   40.00   42.31   35.71   33.33   35.71   28.57   12.50   21.43
15.38   25.00   -nan    29.03   29.63   33.33   33.33   26.67   53.33
28.57   60.00   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    0.00   26.32   -
nan
      7: hsa-mir-194-2    42.11   51.67   45.00   53.85   56.86   65.28
100.00   51.56   51.79   59.02   54.55   30.00   44.00   48.08   46.67
28.21   31.71   28.57   35.71   27.59   50.00   25.00   41.67   50.00
41.67   0.00    -nan    45.71   44.12   33.33   50.00   20.00   46.67
28.57   53.33   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    14.29   30.88   -
nan
      8: hsa-mir-181c     51.06   49.41   62.50   51.52   48.48   36.51
51.56   100.00   67.01   66.35   50.00   22.92   36.07   32.14   40.00
36.54   36.59   25.58   26.67   25.58   26.92   11.54   27.59   25.93
19.35   12.50   -nan    34.62   41.67   21.43   28.57   29.41   17.65
33.33   17.65   -nan    -nan    -nan    -nan    -nan    18.52   30.59   -
nan
```

9:	hsa-mir-181a-2	53.68	52.69	69.01	43.06	46.15	39.29		
51.79	67.01	100.00	72.63	54.55	26.00	35.00	25.86	47.73	
39.29	32.56	29.79	26.67	27.66	30.00	16.67	33.33	28.57	
25.00	17.65	-nan	39.29	42.31	32.00	44.00	32.14	25.00	
38.46	28.57	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	26.67	29.07	-
nan									
10:	hsa-mir-181a-1	56.67	56.63	63.01	51.56	50.00	44.26		
59.02	66.35	72.63	100.00	68.18	31.25	41.94	25.93	43.90	
44.00	34.15	32.56	26.67	30.23	20.83	12.50	33.33	25.00	
21.88	23.53	-nan	42.00	50.00	36.36	45.45	28.57	21.43	
33.33	21.43	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	24.00	28.74	-
nan									
11:	hsa-miR-140-5p	40.00	54.55	54.55	50.00	50.00	40.91		
54.55	50.00	54.55	68.18	100.00	-nan	0.00	37.50	33.33	
44.44	36.36	25.00	33.33	25.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	44.44	50.00	16.67	33.33	11.11	22.22	28.57
22.22	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	18.18	-nan	
12:	hsa-mir-136	32.73	25.00	34.04	37.50	29.51	41.18		
30.00	22.92	26.00	31.25	-nan	100.00	54.84	38.46	42.31	
47.37	42.22	40.74	58.33	41.67	42.22	35.90	30.56	33.33	
24.32	25.00	-nan	44.00	28.89	28.57	42.86	28.57	35.71	
35.71	53.85	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	35.90	29.85	-
nan									
13:	hsa-mir-205	41.33	36.99	34.78	40.98	42.86	45.10		
44.00	36.07	35.00	41.94	0.00	54.84	100.00	51.81	45.10	
52.38	37.04	45.10	73.33	46.15	40.00	42.22	37.93	53.33	
39.47	28.57	-nan	39.39	44.26	0.00	0.00	41.67	58.33	
25.00	66.67	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	37.14	37.89	-
nan									
14:	hsa-mir-212	31.58	30.99	33.33	31.48	30.43	29.63		
48.08	32.14	25.86	25.93	37.50	38.46	51.81	100.00	49.21	
38.46	46.27	54.69	54.55	44.07	37.78	34.21	43.33	28.57	
30.30	16.67	-nan	33.87	30.51	24.00	32.00	24.24	33.33	
28.00	31.25	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	50.00	32.32	-
nan									
15:	hsa-mir-874	42.11	33.33	39.58	38.64	47.27	37.93		
46.67	40.00	47.73	43.90	33.33	42.31	45.10	49.21	100.00	
45.95	40.00	47.69	56.25	51.67	37.84	33.33	38.24	31.03	
37.14	18.18	-nan	35.00	28.07	15.79	31.58	25.00	28.57	
20.00	33.33	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	33.33	37.70	-
nan									
16:	hsa-mir-653	34.33	36.92	42.86	31.03	27.78	18.75		
28.21	36.54	39.29	44.00	44.44	47.37	52.38	38.46	45.95	
100.00	48.48	53.62	54.55	57.81	30.95	26.47	35.71	29.03	
21.62	18.18	-nan	34.67	36.11	10.71	17.86	16.22	27.03	
20.69	27.78	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	26.19	34.57	-
nan									
17:	hsa-mir-505	29.85	34.00	43.48	26.32	34.62	40.00		
31.71	36.59	32.56	34.15	36.36	42.22	37.04	46.27	40.00	
48.48	100.00	49.18	59.09	54.39	32.00	15.79	29.17	12.50	
23.81	28.57	-nan	31.91	22.73	26.32	21.05	11.11	29.63	
31.58	26.92	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	28.57	27.54	-
nan									
18:	hsa-mir-24-2	37.74	27.66	32.56	25.00	22.45	42.31		
28.57	25.58	29.79	32.56	25.00	40.74	45.10	54.69	47.69	
53.62	49.18	100.00	100.00	77.61	23.53	14.81	29.03	16.00	
23.33	27.27	-nan	32.65	21.74	10.00	10.00	22.73	9.09	
10.00	9.52	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	23.08	29.09	-
nan									
19:	hsa-miR-24-3p	33.33	13.33	26.67	40.00	40.00	35.71		
35.71	26.67	26.67	26.67	33.33	58.33	73.33	54.55	56.25	



54.55	59.09	100.00	100.00	100.00	25.00	0.00	-nan	50.00	
33.33	33.33	-nan	55.56	44.44	16.67	0.00	0.00	0.00	
0.00	0.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	31.82	-
nan									
20:	hsa-mir-24-1		28.00	20.83	27.27	24.44	27.27	33.33	
27.59	25.58	27.66	30.23	25.00	41.67	46.15	44.07	51.67	
57.81	54.39	77.61	100.00	100.00	25.00	14.81	23.33	20.00	
14.29	36.36	-nan	29.17	23.91	7.14	7.14	17.65	17.65	
7.14	17.65	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	45.00	30.00	-
nan									
21:	hsa-mir-203a		36.11	30.00	31.82	31.43	39.02	35.71	
50.00	26.92	30.00	20.83	-nan	42.22	40.00	37.78	37.84	
30.95	32.00	23.53	25.00	25.00	100.00	70.93	51.22	42.11	
38.57	38.71	37.50	34.69	35.56	38.89	55.56	44.44	29.41	
50.00	41.18	25.00	50.00	62.50	-nan	-nan	37.78	38.32	-
nan									
22:	hsa-mir-203b		29.03	23.33	13.64	34.29	41.18	28.57	
25.00	11.54	16.67	12.50	-nan	35.90	42.22	34.21	33.33	
26.47	15.79	14.81	0.00	14.81	70.93	100.00	55.17	41.67	
40.32	30.61	27.27	32.61	33.33	28.57	42.86	42.86	42.86	
42.86	28.57	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	29.41	34.94	-
nan									
23:	hsa-mir-132		34.38	21.21	28.00	34.15	41.46	12.50	
41.67	27.59	33.33	33.33	-nan	30.56	37.93	43.33	38.24	
35.71	29.17	29.03	-nan	23.33	51.22	55.17	100.00	56.25	
62.22	52.94	75.00	56.82	53.66	18.18	18.18	18.18	18.18	
18.18	10.00	21.43	50.00	46.67	-nan	-nan	31.25	34.09	-
nan									
24:	hsa-mir-150		23.33	28.57	30.77	33.33	34.38	21.43	
50.00	25.93	28.57	25.00	-nan	33.33	53.33	28.57	31.03	
29.03	12.50	16.00	50.00	20.00	42.11	41.67	56.25	100.00	
61.43	40.74	68.75	48.84	41.03	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	33.33	35.00	-nan
25:	hsa-mir-149		35.14	31.25	20.00	32.43	36.84	15.38	
41.67	19.35	25.00	21.88	-nan	24.32	39.47	30.30	37.14	
21.62	23.81	23.33	33.33	14.29	38.57	40.32	62.22	61.43	
100.00	47.54	68.18	45.95	36.36	0.00	0.00	0.00	25.00	
25.00	0.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	29.63	40.00	-
nan									
26:	hsa-mir-340		47.37	29.41	20.00	7.14	14.29	25.00	
0.00	12.50	17.65	23.53	-nan	25.00	28.57	16.67	18.18	
18.18	28.57	27.27	33.33	36.36	38.71	30.61	52.94	40.74	
47.54	100.00	63.64	37.50	23.08	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	42.86	66.67	53.33	-nan	-nan	11.11	32.63	-nan
27:	hsa-miR-125a-3p		-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	37.50	27.27	75.00	68.75	68.18
63.64	100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	36.36	-nan	
28:	hsa-mir-141		38.71	30.30	38.60	32.73	31.82	29.03	
45.71	34.62	39.29	42.00	44.44	44.00	39.39	33.87	35.00	
34.67	31.91	32.65	55.56	29.17	34.69	32.61	56.82	48.84	
45.95	37.50	-nan	100.00	68.18	34.78	43.48	34.38	34.38	
33.33	37.50	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	55.10	40.00	-
nan									
29:	hsa-mir-200a		31.03	30.65	35.85	37.25	40.98	29.63	
44.12	41.67	42.31	50.00	50.00	28.89	44.26	30.51	28.07	
36.11	22.73	21.74	44.44	23.91	35.56	33.33	53.66	41.03	
36.36	23.08	-nan	68.18	100.00	45.45	50.00	30.00	36.67	
39.13	40.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	60.00	39.47	-
nan									

30: hsa-mir-30d	28.57	40.91	25.00	42.86	23.08	33.33			
33.33	21.43	32.00	36.36	16.67	28.57	0.00	24.00	15.79	
10.71	26.32	10.00	16.67	7.14	38.89	28.57	18.18	-nan	
0.00	-nan	-nan	34.78	45.45	100.00	80.00	77.14	66.18	
58.57	60.87	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	48.89	31.75	-
nan									
31: hsa-mir-30a	32.14	36.36	37.50	50.00	30.77	33.33			
50.00	28.57	44.00	45.45	33.33	42.86	0.00	32.00	31.58	
17.86	21.05	10.00	0.00	7.14	55.56	42.86	18.18	-nan	
0.00	-nan	-nan	43.48	50.00	80.00	100.00	84.51	66.18	
60.00	66.67	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	60.00	40.62	-
nan									
32: hsa-mir-30e	24.32	38.71	29.41	44.44	22.86	26.67			
20.00	29.41	32.14	28.57	11.11	28.57	41.67	24.24	25.00	
16.22	11.11	22.73	0.00	17.65	44.44	42.86	18.18	-nan	
0.00	-nan	-nan	34.38	30.00	77.14	84.51	100.00	59.09	
58.33	55.06	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	50.00	30.59	-
nan									
33: hsa-mir-30b	16.22	32.26	23.53	38.89	31.43	53.33			
46.67	17.65	25.00	21.43	22.22	35.71	58.33	33.33	28.57	
27.03	29.63	9.09	0.00	17.65	29.41	42.86	18.18	-nan	
25.00	-nan	-nan	34.38	36.67	66.18	66.18	59.09	100.00	
70.00	73.56	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	52.17	34.57	-
nan									
34: hsa-mir-30c-2	6.90	26.09	11.11	33.33	29.63	28.57			
28.57	33.33	38.46	33.33	28.57	35.71	25.00	28.00	20.00	
20.69	31.58	10.00	0.00	7.14	50.00	42.86	18.18	-nan	
25.00	-nan	-nan	33.33	39.13	58.57	60.00	58.33	70.00	
100.00	78.87	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	60.87	32.31	-
nan									
35: hsa-mir-30c-1	19.44	32.26	23.53	33.33	26.47	60.00			
53.33	17.65	28.57	21.43	22.22	53.85	66.67	31.25	33.33	
27.78	26.92	9.52	0.00	17.65	41.18	28.57	10.00	-nan	
0.00	-nan	-nan	37.50	40.00	60.87	66.67	55.06	73.56	
78.87	100.00	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	59.57	32.93	-
nan									
36: hsa-mir-410	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	25.00	-nan	21.43	-nan	-nan
42.86	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	100.00	64.94	69.62	54.55	63.64	-nan	33.75	-nan	
37: hsa-mir-543	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	50.00	-nan	50.00	-nan	-nan
66.67	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	64.94	100.00	79.49	58.33	66.67	-nan	30.77	-nan	
38: hsa-mir-494	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	62.50	-nan	46.67	-nan	-nan
53.33	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	69.62	79.49	100.00	58.33	58.33	-nan	34.57	-nan	
39: hsa-mir-374a	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	54.55	58.33	58.33	100.00	76.06	-nan	37.50	-nan	
40: hsa-mir-374b	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	63.64	66.67	58.33	76.06	100.00	-nan	37.50	-nan	

41: hsa-mir-448	12.90	16.67	13.64	28.57	36.59	0.00			
14.29	18.52	26.67	24.00	-nan	35.90	37.14	50.00	33.33	
26.19	28.57	23.08	-nan	45.00	37.78	29.41	31.25	33.33	
29.63	11.11	-nan	55.10	60.00	48.89	60.00	50.00	52.17	
60.87	59.57	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	100.00	37.84	-
nan									
42: M28983.1	34.51	21.95	22.73	33.33	30.59	26.32			
30.88	30.59	29.07	28.74	18.18	29.85	37.89	32.32	37.70	
34.57	27.54	29.09	31.82	30.00	38.32	34.94	34.09	35.00	
40.00	32.63	36.36	40.00	39.47	31.75	40.62	30.59	34.57	
32.31	32.93	33.75	30.77	34.57	37.50	37.50	37.84	100.00	
33.33									
43: hsa-miR-590-3p	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan
-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-
nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	-nan	33.33	100.00	

**Anexo 6.** Matriz do alinhamento global do gene *IL1B* e seus respectivos microRNAs realizado no programa Clustaw Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20170915-171712-0188-33654147-oy/pim>).

```
#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
1: hsa-mir-212      100.00  53.45  51.16  39.71  31.25  46.67  -
nan 100.00  -nan  -nan  60.00  -nan  34.09  35.29  -nan  45.19
-nan
2: hsa-mir-328      53.45  100.00  52.63  57.89  -nan  58.54  -
nan 33.33  -nan  -nan  -nan  44.19  33.33  -nan  43.66
-nan
3: hsa-mir-132      51.16  52.63  100.00  51.43  52.94  58.73  -
nan 66.67  -nan  -nan  50.00  -nan  27.91  27.27  -nan  40.00
-nan
4: hsa-mir-326      39.71  57.89  51.43  100.00  76.92  60.00  -
nan 33.33  -nan  -nan  66.67  -nan  36.84  30.30  -nan  38.37
-nan
5: hsa-miR-330-5p   31.25  -nan  52.94  76.92  100.00  63.64  -
nan -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  36.84
-nan
6: hsa-mir-149      46.67  58.54  58.73  60.00  63.64  100.00  -
nan 100.00  -nan  -nan  63.64  -nan  26.92  50.00  -nan  39.29
-nan
7: hsa-mir-21       -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -
100.00  -nan  -nan  -nan  35.56  -nan  -nan  -nan  -nan
47.89  -nan
8: hsa-mir-204      100.00  33.33  66.67  33.33  -nan  100.00  -
nan 100.00  66.34  -nan  -nan  100.00  45.00  -nan  -nan  37.61
-nan
9: hsa-mir-211      -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -
nan 66.34  100.00  100.00  -nan  100.00  47.06  -nan  -nan  44.95
-nan
10: hsa-mir-488     -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -
nan -nan  100.00  100.00  -nan  40.74  -nan  -nan  55.56  31.71
-nan
11: hsa-mir-144      60.00  -nan  50.00  66.67  -nan  63.64
35.56  -nan  -nan  -nan  100.00  -nan  -nan  -nan  -nan
40.48  -nan
12: hsa-mir-340     -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -
nan 100.00  100.00  40.74  -nan  100.00  -nan  -nan  60.00  31.58
50.00
13: hsa-mir-185      34.09  44.19  27.91  36.84  -nan  26.92  -
nan 45.00  47.06  -nan  -nan  -nan  100.00  80.00  -nan  51.90
-nan
14: hsa-mir-495      35.29  33.33  27.27  30.30  -nan  50.00  -
nan -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  80.00  100.00  -nan  37.50
-nan
15: hsa-miR-299-3p  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -nan  -
nan -nan  -nan  55.56  -nan  60.00  -nan  -nan  100.00  40.91
-nan
16: NM_000576.2     45.19  43.66  40.00  38.37  36.84  39.29
47.89  37.61  44.95  31.71  40.48  31.58  51.90  37.50  40.91
100.00  50.00
```



**Anexo 7. Matriz do alinhamento global do gene *MMP3* e seus respectivos microRNAs realizado no programa Clustaw Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-l20170915-172327-0634-42358084-oy/pim>).**

```

#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
      1: hsa-mir-134      100.00   -nan   45.21   50.00   -nan   -nan
50.00  20.00  20.00  50.00  20.00  25.00  25.00  33.33  25.00
25.00  30.00  40.00  40.00  30.00  -nan   40.00  60.00  50.00
40.00  33.33  60.00  30.00  20.00  50.00  20.00  50.00  -nan  -
nan   20.00  -nan
      2: hsa-mir-372      -nan  100.00   50.75   35.48   -nan   -nan
36.36  33.33  26.67  33.33  27.27  25.00  25.00  33.33  20.00
25.00  25.00  35.00  35.00  30.00  44.44  36.36  50.00  40.00
60.00  25.00  36.36  28.57  66.67   0.00   0.00   0.00  -nan  -
nan   0.00  -nan
      3: NM_002422.4      45.21   50.75  100.00   42.31   45.45   45.45
40.51  25.33  26.97  33.33  37.14  27.50  26.76  34.83  24.19
25.81  26.15  22.95  28.00  24.68  37.27  33.85  36.07  35.00
36.67  32.86  25.35  28.77  33.33  32.20  37.74  36.71  31.82
22.73  34.18  22.73
      4: hsa-mir-365b      50.00   35.48   42.31  100.00  100.00  100.00
83.72  49.18  49.18  42.11  35.29  43.40  44.23  31.15  36.92
35.38  38.10  38.10  35.29  38.57  33.33  42.86  33.33  44.64
42.11  34.43  40.48  34.38  29.63  46.94  43.14  41.18  37.50
18.75  36.54  25.00
      5: hsa-miR-365b-3p  -nan   -nan   45.45  100.00  100.00  100.00
100.00  37.50  18.75  44.44  25.00  50.00  46.67  22.22  33.33
38.89  55.56  50.00  38.89  50.00  45.45  23.08  7.69  15.38
15.38  33.33  33.33  30.77  23.08  10.00  15.38  7.69  0.00
0.00  23.08  0.00
      6: hsa-miR-365a-3p  -nan   -nan   45.45  100.00  100.00  100.00
100.00  37.50  18.75  44.44  25.00  50.00  46.67  22.22  33.33
38.89  55.56  50.00  38.89  50.00  45.45  23.08  7.69  15.38
15.38  33.33  33.33  30.77  23.08  10.00  15.38  7.69  0.00
0.00  23.08  0.00
      7: hsa-mir-365a      50.00   36.36   40.51   83.72  100.00  100.00
100.00  41.18  44.23  45.45  31.03  52.94  48.00  32.76  39.62
37.74  43.14  43.14  41.07  44.83  39.02  45.83  34.00  38.78
40.00  36.00  42.86  34.55  31.11  42.00  38.46  36.54  31.25
12.50  33.96  18.75
      8: hsa-mir-15a      20.00   33.33   25.33   49.18   37.50   37.50
41.18  100.00  66.27  42.86  38.18  53.70  55.10  43.08  46.15
44.23  53.85  50.00  42.62  49.21  48.39  38.60  31.58  37.50
35.71  44.64  33.33  52.73  39.66  41.51  46.81  46.55  36.36
36.36  42.37  40.91
      9: hsa-mir-15b      20.00   26.67   26.97   49.18   18.75   18.75
44.23  66.27  100.00  36.73  29.51  53.33  53.70  35.71  41.51
41.51  37.74  41.51  37.10  40.00  47.22  43.10  39.66  38.60
45.61  40.35  37.21  50.00  32.76  40.74  39.58  37.50  40.91
40.91  30.77  40.91
     10: hsa-mir-31      50.00   33.33   33.33   42.11   44.44   44.44
45.45  42.86  36.73  100.00  40.54  50.00  51.11  50.88  48.21
48.21  50.88  54.55  50.00  54.10  48.84  43.48  40.00  47.73
42.22  56.90  47.22  54.72  34.78  39.53  41.03  43.90  66.67
66.67  40.48  77.78

```

11:	hsa-mir-874	20.00	27.27	37.14	35.29	25.00	25.00		
31.03	38.18	29.51	40.54	100.00	51.79	48.98	47.54	44.83	
34.48	56.25	60.00	48.78	37.21	63.46	46.94	34.88	37.21	
42.86	51.11	58.54	65.91	49.06	37.78	55.26	60.34	57.89	
52.63	55.17	52.63							
12:	hsa-mir-16-1	25.00	25.00	27.50	43.40	50.00	50.00		
52.94	53.70	53.33	50.00	51.79	100.00	73.75	41.89	44.90	
42.86	52.94	48.98	36.36	45.61	54.39	39.29	35.85	37.74	
37.74	40.00	35.42	43.14	36.07	34.62	32.08	38.10	36.36	
36.36	37.50	40.91							
13:	hsa-mir-16-2	25.00	25.00	26.76	44.23	46.67	46.67		
48.00	55.10	53.70	51.11	48.98	73.75	100.00	43.48	47.92	
50.00	52.00	50.00	33.33	48.21	57.69	49.09	40.38	42.31	
46.15	40.43	39.53	43.14	28.81	35.29	33.96	40.68	38.10	
38.10	38.33	42.86							
14:	hsa-mir-424	33.33	33.33	34.83	31.15	22.22	22.22		
32.76	43.08	35.71	50.88	47.54	41.89	43.48	100.00	46.43	
46.43	49.12	49.09	45.31	43.08	48.57	32.31	27.87	36.67	
35.00	49.23	34.09	47.62	34.29	30.77	32.20	35.06	45.45	
40.91	35.06	45.45							
15:	hsa-mir-18a	25.00	20.00	24.19	36.92	33.33	33.33		
39.62	46.15	41.51	48.21	44.83	44.90	47.92	46.43	100.00	
88.73	64.62	62.69	55.38	66.67	44.44	35.42	24.49	33.33	
30.61	56.60	43.75	60.00	34.78	39.02	32.56	39.53	16.67	
16.67	31.82	16.67							
16:	hsa-mir-18b	25.00	25.00	25.81	35.38	38.89	38.89		
37.74	44.23	41.51	48.21	34.48	42.86	50.00	46.43	88.73	
100.00	60.00	61.19	58.46	68.18	42.22	33.33	24.49	33.33	
32.65	56.60	37.50	54.55	36.96	39.02	34.88	41.86	16.67	
16.67	34.09	16.67							
17:	hsa-mir-20a	30.00	25.00	26.15	38.10	55.56	55.56		
43.14	53.85	37.74	50.88	56.25	52.94	52.00	49.12	64.62	
60.00	100.00	77.61	68.57	67.61	58.00	43.14	40.00	40.82	
36.00	66.07	50.00	70.69	42.31	45.45	37.78	39.13	50.00	
50.00	29.79	50.00							
18:	hsa-mir-20b	40.00	35.00	22.95	38.10	50.00	50.00		
43.14	50.00	41.51	54.55	60.00	48.98	50.00	49.09	62.69	
61.19	77.61	100.00	65.67	69.12	63.04	40.82	34.00	34.69	
28.00	64.81	50.00	69.64	35.42	42.86	36.36	38.64	50.00	
50.00	26.67	50.00							
19:	hsa-mir-106a	40.00	35.00	28.00	35.29	38.89	38.89		
41.07	42.62	37.10	50.00	48.78	36.36	33.33	45.31	55.38	
58.46	68.57	65.67	100.00	70.37	48.33	44.64	41.82	42.59	
38.18	61.29	53.19	64.18	39.34	38.00	40.00	47.27	40.00	
33.33	35.71	40.00							
20:	hsa-mir-17	30.00	30.00	24.68	38.57	50.00	50.00		
44.83	49.21	40.00	54.10	37.21	45.61	48.21	43.08	66.67	
68.18	67.61	69.12	70.37	100.00	51.61	37.93	35.09	39.29	
35.09	60.94	52.08	60.87	35.48	42.31	32.69	40.35	31.25	
31.25	31.03	31.25							
21:	hsa-mir-497	-nan	44.44	37.27	33.33	45.45	45.45		
39.02	48.39	47.22	48.84	63.46	54.39	57.69	48.57	44.44	
42.22	58.00	63.04	48.33	51.61	100.00	43.14	38.30	39.13	
43.48	47.27	46.67	55.17	43.48	40.91	44.74	48.44	50.00	
45.45	42.19	45.45							
22:	hsa-mir-302b	40.00	36.36	33.85	42.86	23.08	23.08		
45.83	38.60	43.10	43.48	46.94	39.29	49.09	32.31	35.42	
33.33	43.14	40.82	44.64	37.93	43.14	100.00	71.64	73.13	
78.79	42.37	62.50	48.39	43.75	61.67	73.68	68.25	63.64	
54.55	63.49	63.64							

23:	hsa-mir-302a	60.00	50.00	36.07	33.33	7.69	7.69		
34.00	31.58	39.66	40.00	34.88	35.85	40.38	27.87	24.49	
24.49	40.00	34.00	41.82	35.09	38.30	71.64	100.00	72.06	
75.00	38.18	59.46	38.33	35.00	56.14	58.93	58.33	63.64	
59.09	51.67	63.64							
24:	hsa-mir-302c	50.00	40.00	35.00	44.64	15.38	15.38		
38.78	37.50	38.60	47.73	37.21	37.74	42.31	36.67	33.33	
33.33	40.82	34.69	42.59	39.29	39.13	73.13	72.06	100.00	
82.09	35.19	64.86	44.07	38.98	60.71	67.27	64.41	68.18	
59.09	54.24	68.18							
25:	hsa-mir-302d	40.00	60.00	36.67	42.11	15.38	15.38		
40.00	35.71	45.61	42.22	42.86	37.74	46.15	35.00	30.61	
32.65	36.00	28.00	38.18	35.09	43.48	78.79	75.00	82.09	
100.00	35.19	67.57	41.67	42.37	58.93	69.64	69.49	77.27	
68.18	62.71	77.27							
26:	hsa-mir-93	33.33	25.00	32.86	34.43	33.33	33.33		
36.00	44.64	40.35	56.90	51.11	40.00	40.43	49.23	56.60	
56.60	66.07	64.81	61.29	60.94	47.27	42.37	38.18	35.19	
35.19	100.00	47.92	66.67	45.90	43.10	35.29	42.62	40.00	
40.00	41.94	46.67							
27:	hsa-mir-302e	60.00	36.36	25.35	40.48	33.33	33.33		
42.86	33.33	37.21	47.22	58.54	35.42	39.53	34.09	43.75	
37.50	50.00	50.00	53.19	52.08	46.67	62.50	59.46	64.86	
67.57	47.92	100.00	52.83	47.27	43.59	54.29	63.83	72.22	
50.00	53.19	61.11							
28:	hsa-mir-106b	30.00	28.57	28.77	34.38	30.77	30.77		
34.55	52.73	50.00	54.72	65.91	43.14	43.14	47.62	60.00	
54.55	70.69	69.64	64.18	60.87	55.17	48.39	38.33	44.07	
41.67	66.67	52.83	100.00	48.53	50.82	41.38	48.53	47.37	
52.63	42.03	42.11							
29:	hsa-mir-195	20.00	66.67	33.33	29.63	23.08	23.08		
31.11	39.66	32.76	34.78	49.06	36.07	28.81	34.29	34.78	
36.96	42.31	35.42	39.34	35.48	43.48	43.75	35.00	38.98	
42.37	45.90	47.27	48.53	100.00	37.93	54.72	50.70	50.00	
59.09	50.70	50.00							
30:	hsa-mir-373	50.00	0.00	32.20	46.94	10.00	10.00		
42.00	41.51	40.74	39.53	37.78	34.62	35.29	30.77	39.02	
39.02	45.45	42.86	38.00	42.31	40.91	61.67	56.14	60.71	
58.93	43.10	43.59	50.82	37.93	100.00	68.97	70.15	68.18	
68.18	64.71	59.09							
31:	hsa-mir-520b	20.00	0.00	37.74	43.14	15.38	15.38		
38.46	46.81	39.58	41.03	55.26	32.08	33.96	32.20	32.56	
34.88	37.78	36.36	40.00	32.69	44.74	73.68	58.93	67.27	
69.64	35.29	54.29	41.38	54.72	68.97	100.00	88.52	100.00	
80.95	78.69	80.95							
32:	hsa-mir-520e	50.00	0.00	36.71	41.18	7.69	7.69		
36.54	46.55	37.50	43.90	60.34	38.10	40.68	35.06	39.53	
41.86	39.13	38.64	47.27	40.35	48.44	68.25	58.33	64.41	
69.49	42.62	63.83	48.53	50.70	70.15	88.52	100.00	95.45	
81.82	75.86	81.82							
33:	hsa-miR-520c-3p	-nan	-nan	31.82	37.50	0.00	0.00		
31.25	36.36	40.91	66.67	57.89	36.36	38.10	45.45	16.67	
16.67	50.00	50.00	40.00	31.25	50.00	63.64	63.64	68.18	
77.27	40.00	72.22	47.37	50.00	68.18	100.00	95.45	100.00	
81.82	86.36	81.82							
34:	hsa-miR-520d-3p	-nan	-nan	22.73	18.75	0.00	0.00		
12.50	36.36	40.91	66.67	52.63	36.36	38.10	40.91	16.67	
16.67	50.00	50.00	33.33	31.25	45.45	54.55	59.09	59.09	
68.18	40.00	50.00	52.63	59.09	68.18	80.95	81.82	81.82	
100.00	77.27	81.82							



35: hsa-mir-519d	20.00	0.00	34.18	36.54	23.08	23.08		
33.96	42.37	30.77	40.48	55.17	37.50	38.33	35.06	31.82
34.09	29.79	26.67	35.71	31.03	42.19	63.49	51.67	54.24
62.71	41.94	53.19	42.03	50.70	64.71	78.69	75.86	86.36
77.27	100.00	86.36						
36: hsa-miR-520a-3p	-nan	-nan	22.73	25.00	0.00	0.00		
18.75	40.91	40.91	77.78	52.63	40.91	42.86	45.45	16.67
16.67	50.00	50.00	40.00	31.25	45.45	63.64	63.64	68.18
77.27	46.67	61.11	42.11	50.00	59.09	80.95	81.82	81.82
81.82	86.36	100.00						

