

Filipy Said
Maria Helena Pereira
Marcela Martinez
Pedro Carvalho
Ricardo Baba

RNA de interferência



ESALQ

USP

Introdução

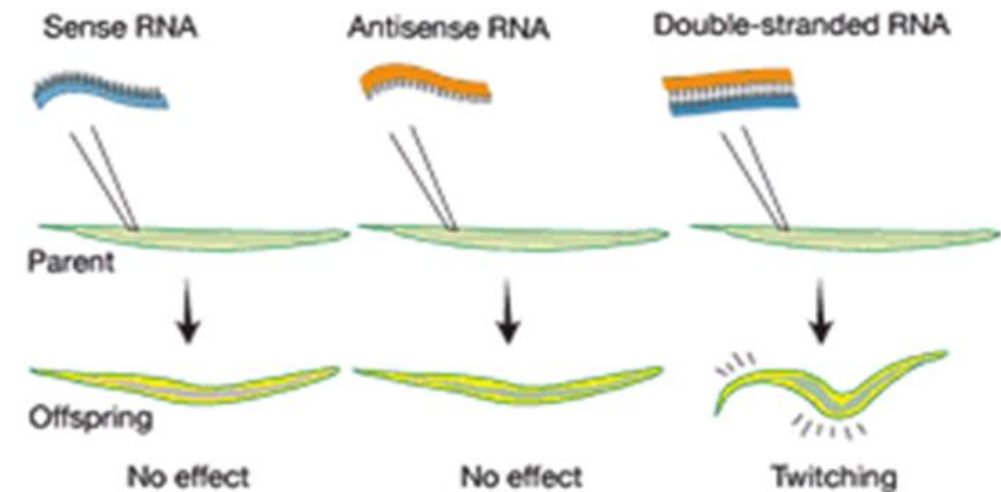
- Início década 90: Superexpressão gênica de pigmento em Petúnias; Resistência viral em plantas;

Em 1998, Craig Mello e Andrew Fire: RNA interferência (iRNA)- Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2006.

- Experimento *C. elegans* e proteína muscular;

2. The experiment

RNA carrying the code for a muscle protein is injected into the worm *C. elegans*. Single-stranded RNA has no effect. But when double-stranded RNA is injected, the worm starts twitching in a similar way to worms carrying a defective gene for the muscle protein.



Fonte: França et al., 2010.

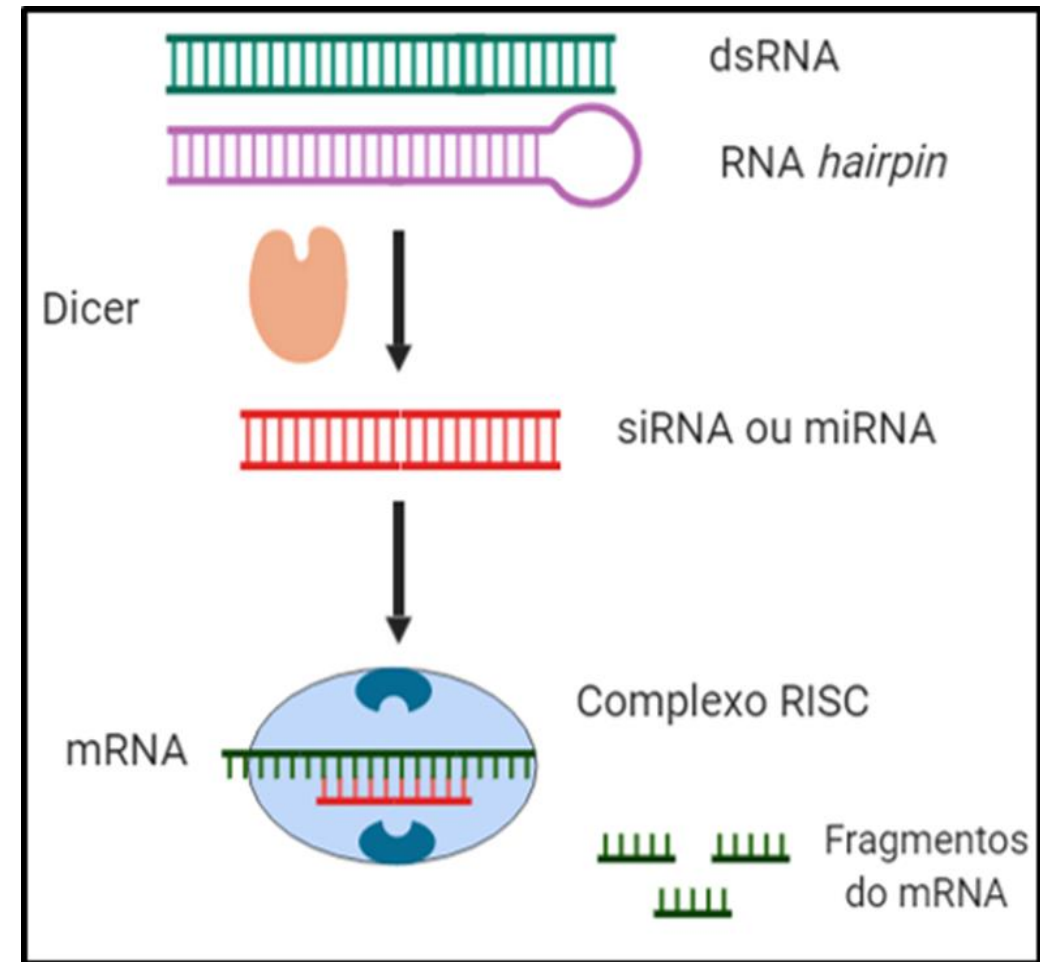
Funcionamento

O que é iRNA?

- dsRNA (*double stranded RNA*);
 - miRNA (micro RNA): Origem de transcritos de RNA (precursores de miRNA), formação de hairpin;
 - siRNA (*short interfering*): Origem da clivagem de RNA de fita dupla;

• Enzima Dicer;

• Complexo RISC (*Induced silencing complex*)- proteínas Argonautas.



Fonte: França et al., 2010.



Fonte: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/12/o-que-e-interferencia-por-rna-rnai.html>

Escolha RNAi

- Análise função gênica;
Literatura científica, estudo expressão gênica, análises bioinformática.
- Triagem;
Identificar genes envolvidos ao processo ou patologia;
Análise de Rnai e/ou através de bibliotecas e/ou criação das mesmas.
- Estudos genômicos e transcriptômicos;
RNA-seq.
- Validação funcional;
confirmar relevância gene alvo para fenótipo.
Organismos modelos.

Introdução RNAi

- Transfecção;
Métodos físicos;
Estudos de função gênica.
- Vetores virais;
Estudos em animais e clínicos.
- Expressão transgênica;
Inserção gênica;
Estudos em planta.

Qual importância?

- Sistema de defesa contra organismos invasores;
- Autodefesa.

Onde são aplicados?

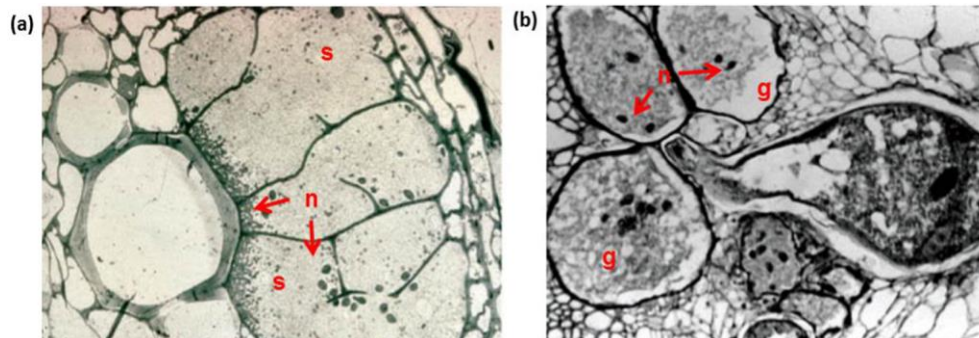
- Pesquisa científica;
- Pesquisa biomédica – pesquisa em medicamento;
- Terapia genética;
- Terapia antiviral;
- Na agricultura: controle pragas e doenças;

RNAi em nematóides

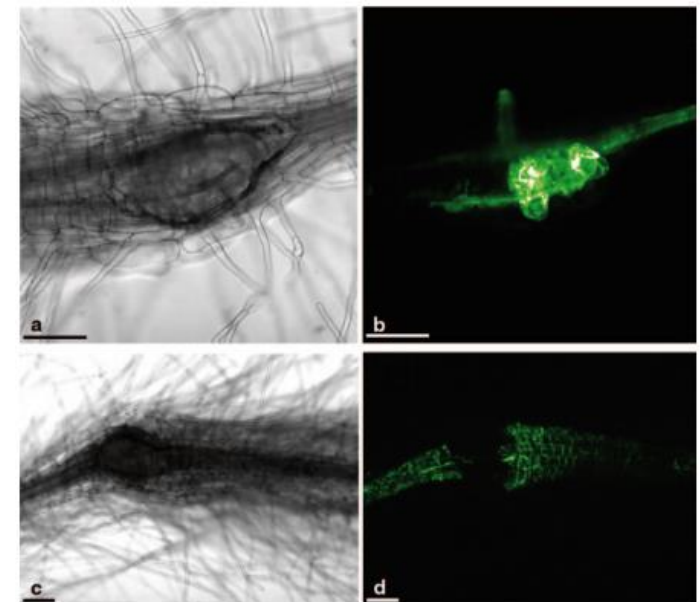
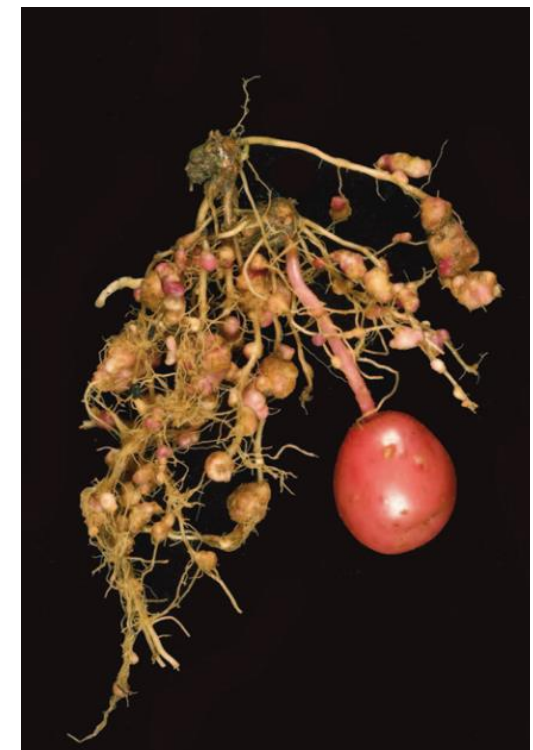
RNAi em nematóides

Organismos de vida-livre ou parasitas de plantas e animais:

- Ameaças às plantações globalmente (*plant-parasitic nematodes - PPNs*);
- Nematóides das galhas (*Root-knot nematodes – RKNs*) formam galhas nas raízes, pela indução da endoreduplicação;
- Nematóides de cisto (*Cyst nematodes – CNs*) formam sincícios nas raízes.



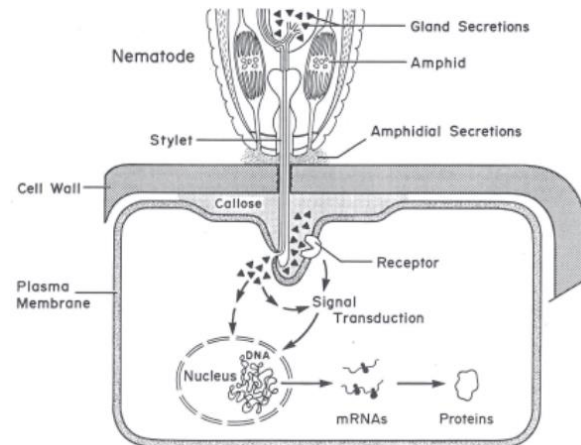
Fonte: Joshi e colaboradores (2022)



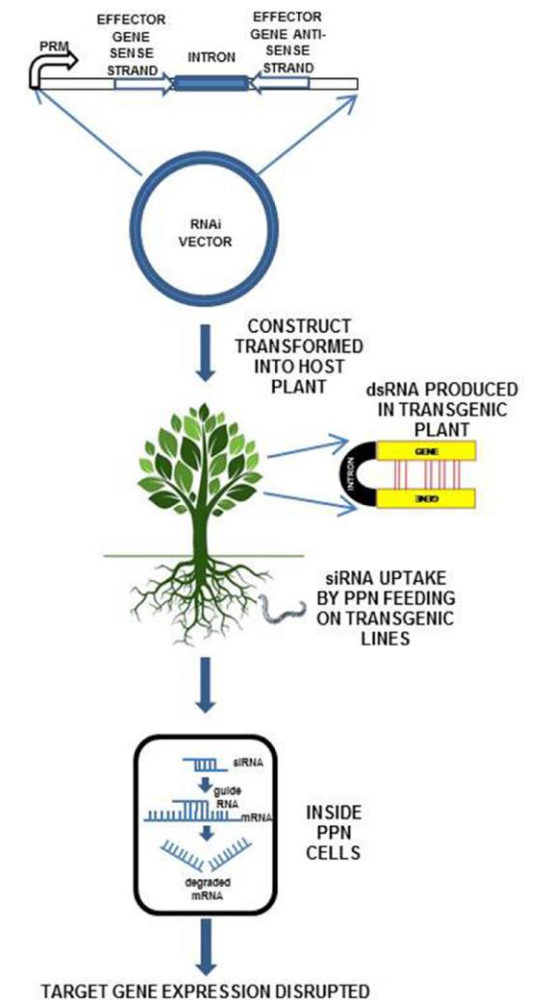
Fonte: Jones e colaboradores (2011)

RNAi em nematóides

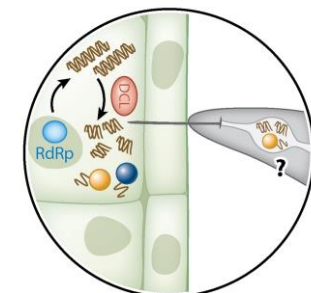
- A aplicação de RNAi em nematóides envolve a imersão, alimentação e estratégias de entrega pelo hospedeiro (*Host delivered-RNAi - HDRNAi*):
 - Silenciamento de proteínas efectoras de estabelecimento da relação hospedeiro-parasita.



Fonte: Hussey e colaboradores (2002)



Fonte: Joshi e colaboradores (2022)



Fonte: Rosa e colaboradores (2018)

RNAi em nematóides

Table 1
List of effector/secretory genes silenced by HD-RNAi in cyst and root-knot nematodes.

Nematode	Species	Effector genes	Glands secreting the effector	Phenotypic effect	Host Plant	Promoter used	References
Cyst nematode	<i>H. schachtii</i>	<i>Hs4G06</i> (ubiquitin-like)	Dorsal gland	23–64% reduction in developing females	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Sindhu et al., 2009
	<i>H. schachtii</i>	<i>Hs3B05</i> (cellulose binding protein)	Dorsal gland	12–47% reduction in developing females	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Sindhu et al., 2009
	<i>H. schachtii</i>	<i>Hs8H07</i> (SKP1-like)	Dorsal gland	More than 50% reduction in females	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Sindhu et al., 2009
	<i>H. schachtii</i>	<i>Hs10A06</i> (zinc finger protein)	Dorsal gland	42% reduction in developing females	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Sindhu et al., 2009
	<i>H. glycines</i>	<i>Hg30C02</i>	Dorsal gland	92% reduction in females	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Hamamouch et al., 2012
Root knot nematode	<i>G. Pallida</i>	<i>Gp-hyp</i>	Amphid sheath cells	50–60% reduction in females	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Eves-van den Akker et al., 2014
	<i>M. arenaria</i>	<i>Ma16D10</i>	Sub-ventral gland	63–90% reduction in galls	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Huang et al., 2006
	<i>M. incognita</i>	<i>Mi-Crt</i> (<i>Calreticulin</i>)	Sub-ventral gland	Reduction in galls	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Jaouannet et al., 2012
	<i>M. incognita</i>	<i>MiSD05</i>	Sub-ventral gland	Reduction in galls and fecundity	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Xue et al., 2013
	<i>Meloidogyne</i> spp.	<i>Mi16D10</i>	Sub-ventral gland	Reduction in number of egg masses	Grape hairy root	CaMV35S	Yang et al., 2013
	<i>M. incognita</i>	<i>Misp12</i>	Dorsal gland	69% decrease in number of females	<i>Nicotiana benthamiana</i>	CaMV35S	Xie et al., 2016
	<i>M. chinwoodi</i>	<i>Mc16D10L</i>	Sub-ventral gland	57–67% reduction in egg masses	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Dinh et al., 2014a
	<i>M. chinwoodi</i>	<i>Mc16D10L</i>	Sub-ventral gland	65–68% reduction in egg masses	Potato	CaMV35S	Dinh et al., 2014b
	<i>M. incognita</i>	<i>Mimsp40</i>	Sub-ventral gland	Reduction in number of galls and egg masses	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Niu et al., 2016
	<i>M. incognita</i>	<i>Mimsp18</i>	Dorsal gland	Reduction in number of galls upto 47%	<i>Eggplant</i>	CaMV35S	Shivakumar et al., 2017
	<i>M. incognita</i>	<i>Mimsp20</i>	Sub-ventral gland	Reduction in number of galls upto 47%	<i>Eggplant</i>	CaMV35S	Shivakumar et al., 2017
	<i>M. incognita</i>	<i>Mimsp1</i>	Sub-ventral gland	Reduction in number of galls upto 34–47%	<i>Eggplant</i>	CaMV35S	Chaudhary et al., 2019
	<i>M. incognita</i>	<i>Mi-msp2</i>	Sub-ventral gland	Reduction in number of galls (52–54%) and females (60–66%)	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Joshi et al., 2019
	<i>M. incognita</i>	<i>Mi-msp3</i>	Sub-ventral gland	Reduction in number of galls (89%)	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Joshi et al., 2020
	<i>M. incognita</i>	<i>Mi-msp5</i>	Dorsal gland	Reduction in number of galls (78%)	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Joshi et al., 2020
<i>M. incognita</i>	<i>Mi-msp18</i>	Dorsal gland	Reduction in number of galls (86%)	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Joshi et al., 2020	
<i>M. incognita</i>	<i>Mi-msp24</i>	Dorsal gland	Reduction in number of galls (89%)	<i>Arabidopsis</i>	CaMV35S	Joshi et al., 2020	

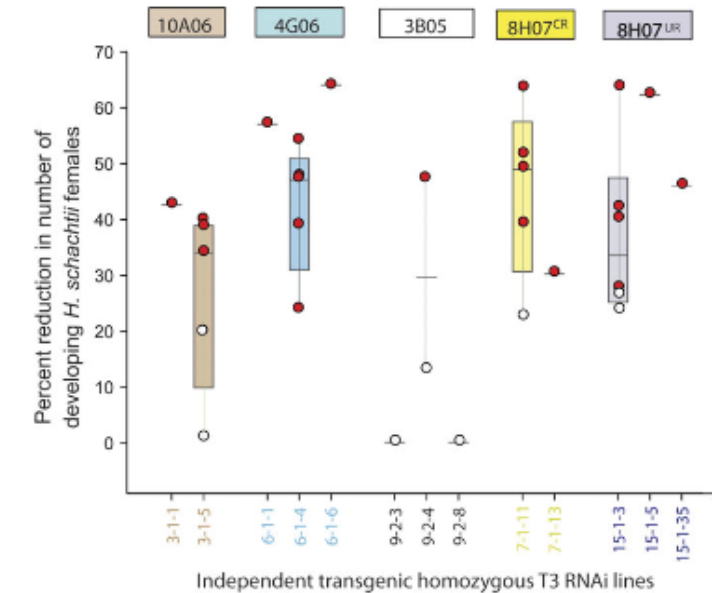
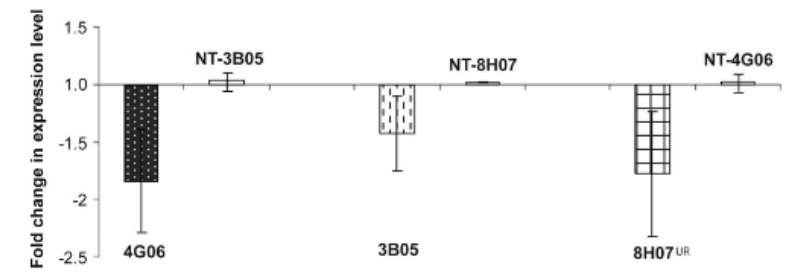
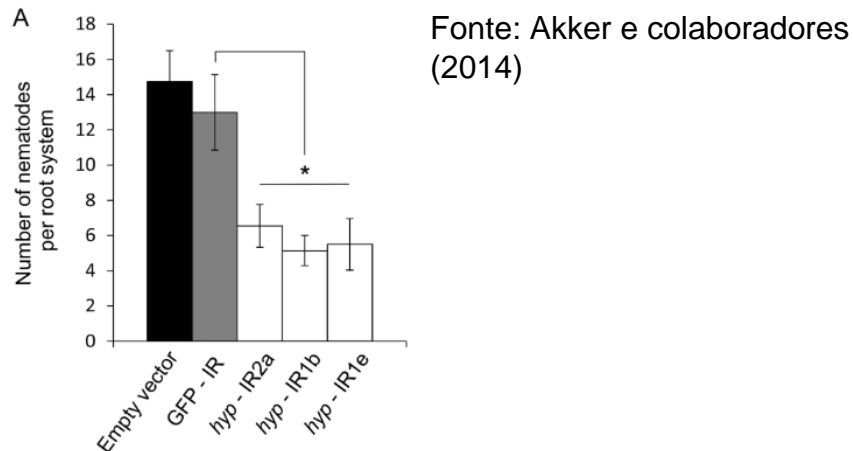
Aplicações em CNs

■ Sindhu e colaboradores (2009); Hamamouch e colaboradores (2012):

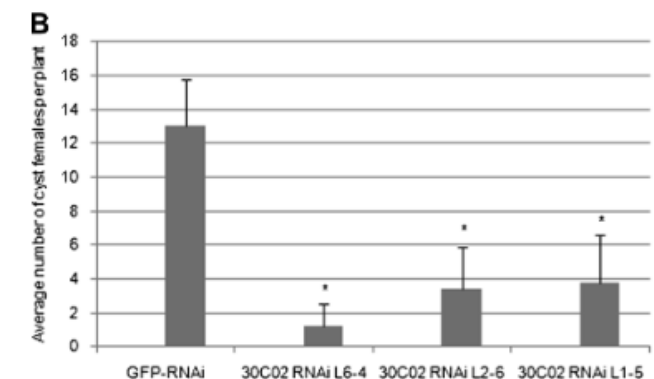
- Interação entre *Heterodera schachtii* e *Arabidopsis thaliana*;
- Redução de até 92% da população de fêmeas adultas.

■ Akker e colaboradores (2014):

- Interação entre *Globodera pallida* e batata;
- Redução de até 60% da população de fêmeas adultas.



Fonte: Sindhu e colaboradores (2009)

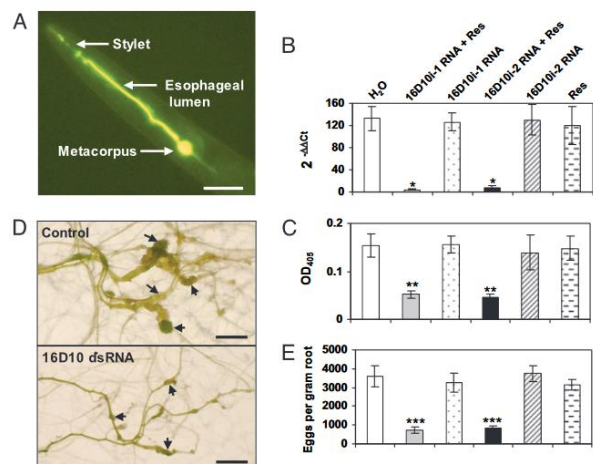


Fonte: Hamamouch e colaboradores (2012)

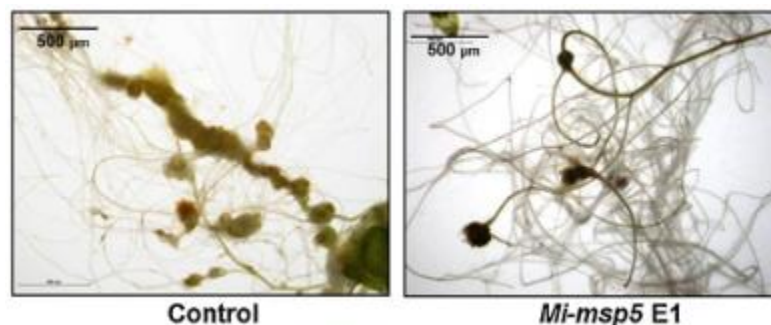
Aplicações em RKNs

■ Huang e colaboradores (2006); Xue e colaboradores (2013); Joshi e colaboradores (2019, 2020):

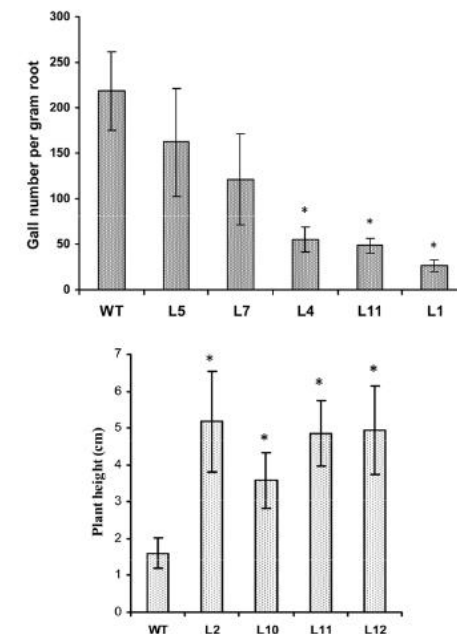
- Interação entre *Meloidogyne incognita* e *Arabidopsis thaliana*;
- Redução de até 90% do número de galhas e 95% do número de ovos.



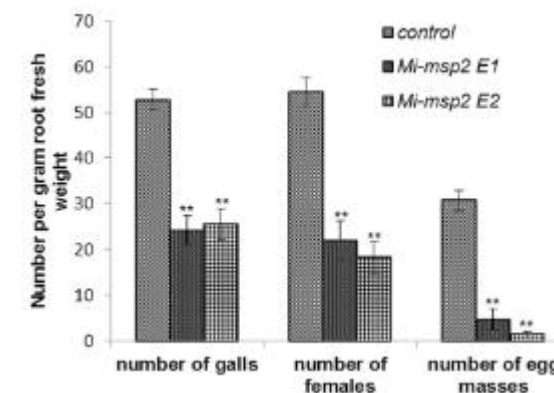
Fonte: Huang e colaboradores (2006)



Fonte: Joshi e colaboradores (2020)



Fonte: Xue e colaboradores (2013)



Fonte: Joshi e colaboradores (2019)

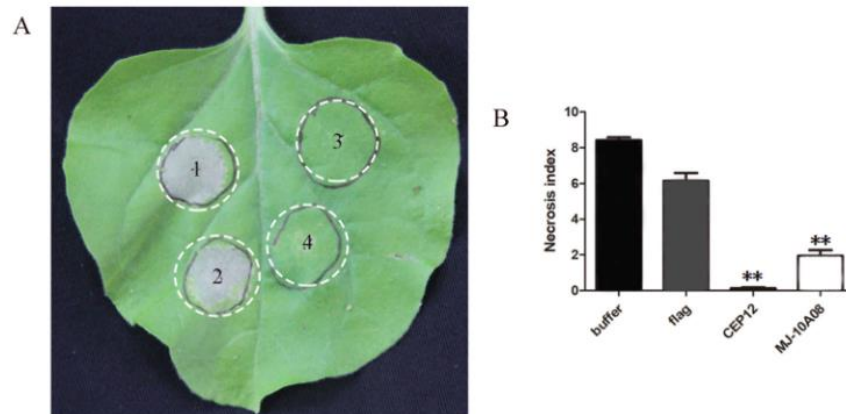
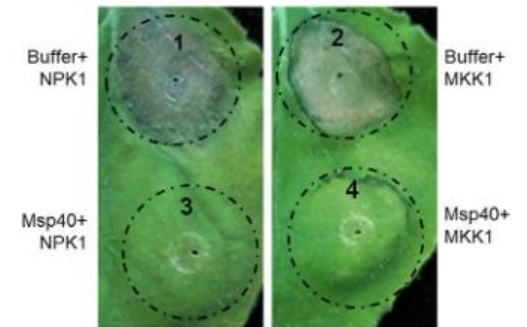
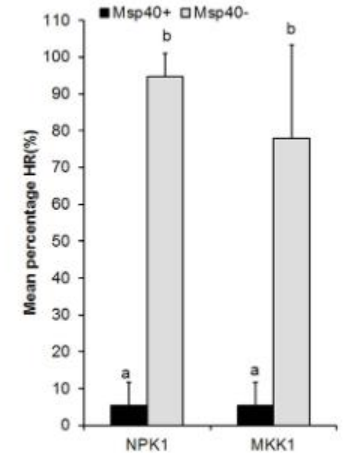
Aplicações em RKNs

■ Niu e colaboradores (2016):

- Interação entre *Meloidogyne incognita* e *Arabidopsis thaliana*:
- Redução de até 95% da área de lesão por morte celular programada.

■ Hu e colaboradores (2022):

- Interação entre *Meloidogyne javanica* e Tabaco (*Nicotiana benthamiana*):
- Redução de até 64% do número de galhas.



Fonte: Hu e colaboradores (2022)

Fonte: Niu e colaboradores (2016)

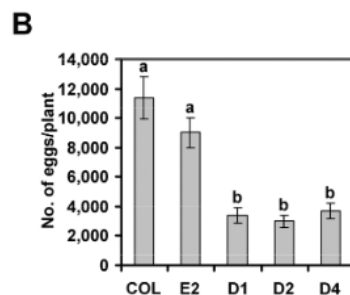
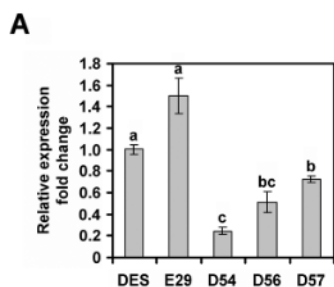
Aplicações em RKNs

■ Dinh e colaboradores (2014):

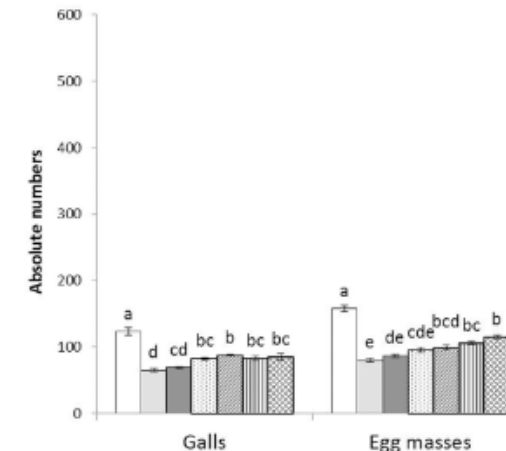
- Interação entre *Meloidogyne chitwoodi* e *Arabidopsis thaliana*;
- Redução de até 74% do número de ovos.

■ Shivakumara e colaboradores (2017); Chaudhary e colaboradores (2019):

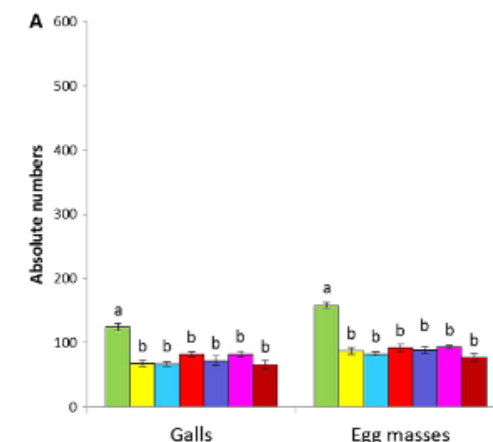
- Interação entre *Meloidogyne incognita* e Berinjela (*Solanum melongena*);
- Redução de até 48% do número de galhas e de até 50% do número de ovos.



Fonte: Dinh e colaboradores (2014)



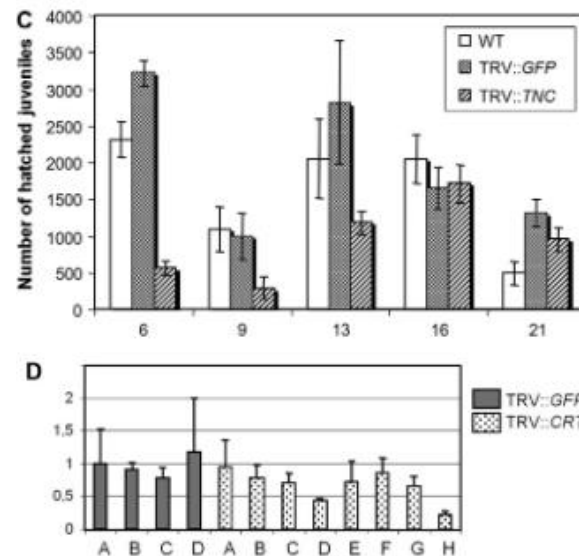
Fonte: Shivakumara e colaboradores (2017)



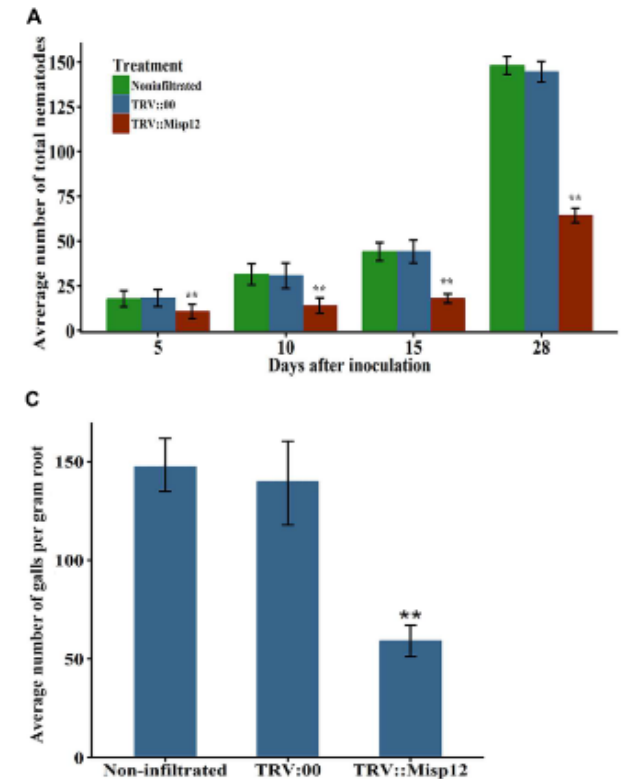
Fonte: Chaudhary e colaboradores (2019)

Aplicações em RKNs

- Dubreuil e colaboradores (2009); Xie e colaboradores (2016):
 - Interação entre *Meloidogyne incognita* e Tabaco (*Nicotiana benthamiana*);
 - Redução de até 63% do número de ovos.



Fonte: Dubreuil e colaboradores (2009)

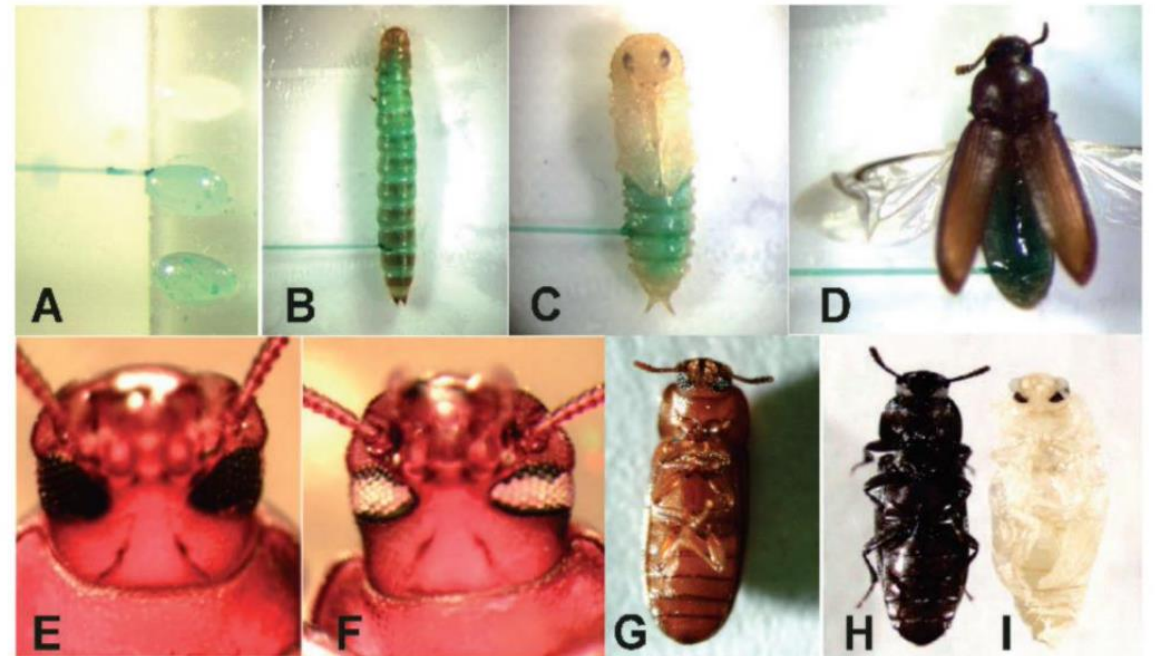
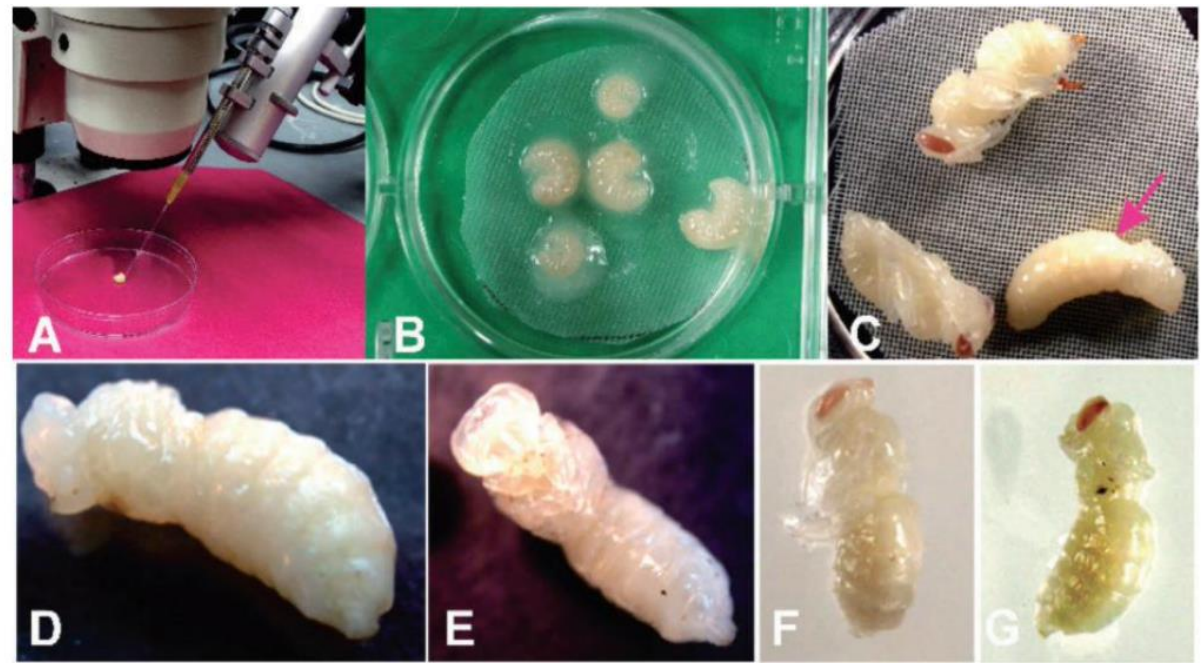


Fonte: Xie e colaboradores (2016)

RNAi em insetos

RNAi em insetos

Microrinjeção
Soaking



Aronstein et al., 2011

2007

LETTERS

nature
biotechnology

Control of coleopteran insect pests through
RNA interference

James A Baum¹, Thierry Bogaert², William Clinton¹, Gregory R Heck¹, Pascale Feldmann², Oliver Ilagan¹,
Scott Johnson¹, Geert Plaetinck², Tichafa Munyikwa¹, Michael Pleau¹, Ty Vaughn¹ & James Roberts^{1,3}

nm/naturebiotechnology

Non-transgenic corn

Transgenic corn



V-ATPase A

Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)

Renata Bolognesi¹, Parthasarathy Ramaseshadri^{1*}, Jerry Anderson¹, Pamela Bachman², William Clinton¹, Ronald Flannagan¹, Oliver Ilagan¹, Christina Lawrence², Steven Levine², William Moar², Geoffrey Mueller², Jianguo Tan², Joshua Uffman², Elizabeth Wiggins¹, Gregory Heck¹, Gerrit Segers¹

¹ Biotechnology Division, Monsanto Company, Chesterfield, Missouri, United States of America, ² Regulatory Division, Monsanto Company, St. Louis, Missouri, United States of America

2012



Cry3Bb1
EPSPS
DvSnf7



VT4PRO™

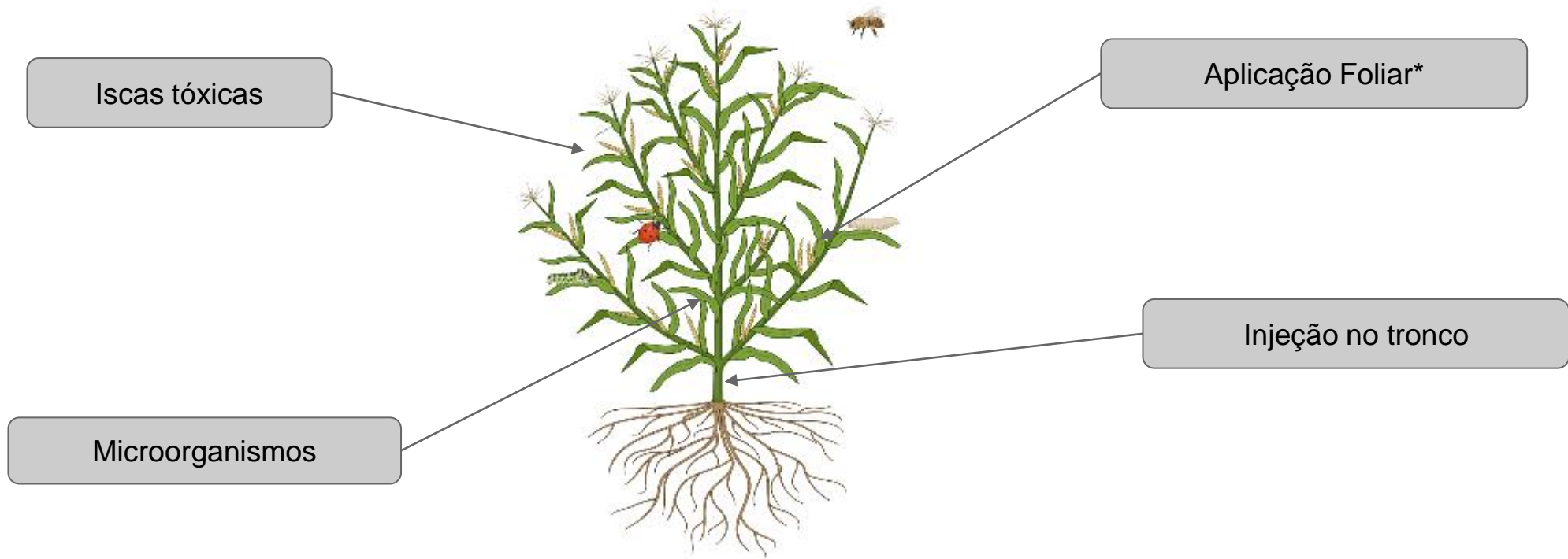
With RNAi TECHNOLOGY

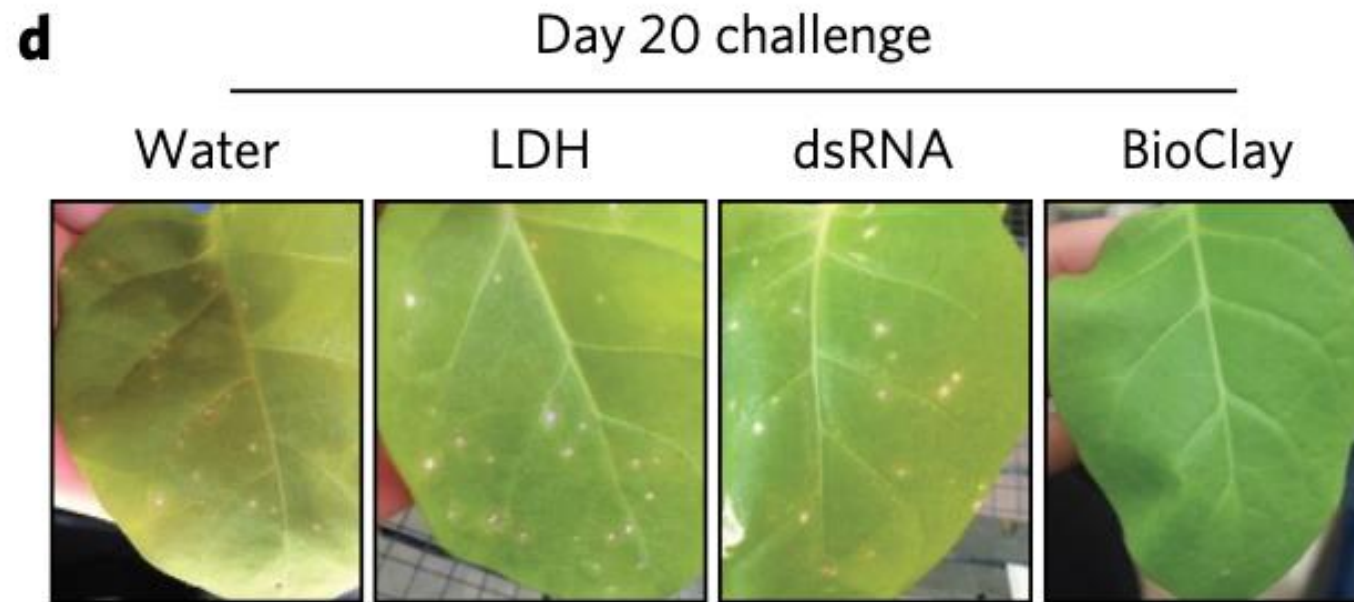
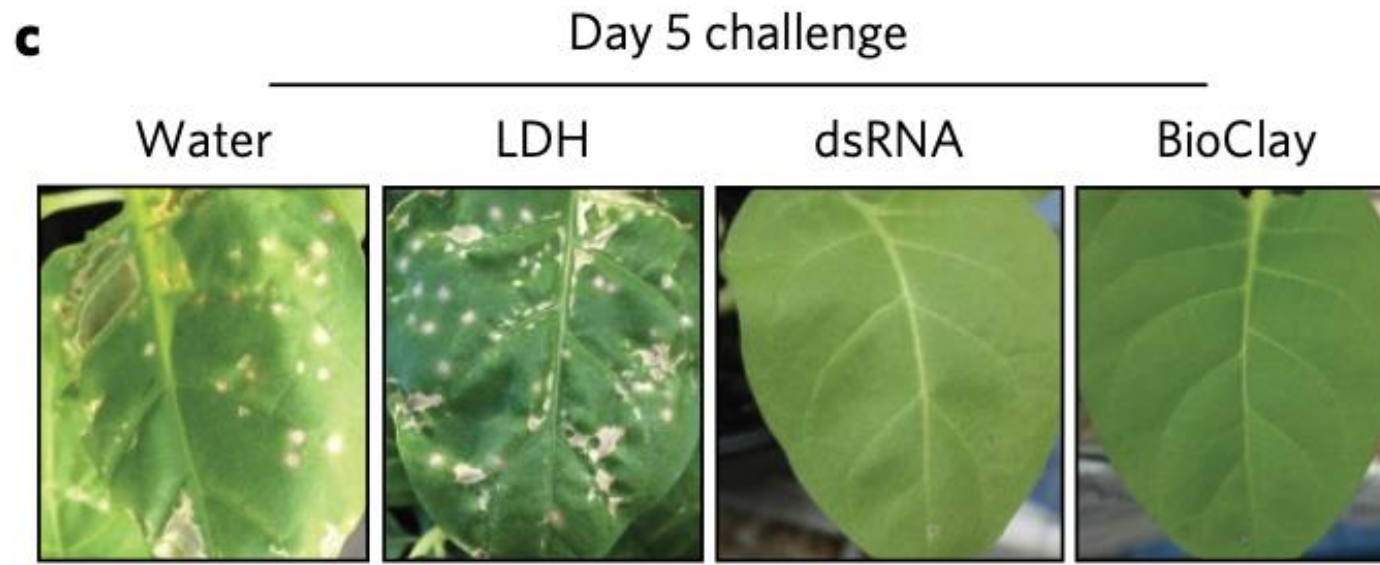
VT4PRO™ WITH RNAI TECHNOLOGY¹

Expected in 2024, Pending State Registrations.

For farmers prioritizing performance, VT4PRO™ with RNAi Technology will be the first product from Bayer to combine the three built-in modes of action in **Trecepta® Technology**, an elite above-ground pest package for corn, with two below-ground modes of action including RNAi Technology — the latest defense to help manage corn rootworm. VT4PRO is the newest product featuring the next generation against corn rootworm.

Métodos não transformativos





Mitter *et al.* 2017

TABLE 3 | Non-transformative delivery strategies for insects, pathogens, and virus management.

Target pest	Crop	Delivery strategy	Target gene	Molecule	Size	Molecule concentration	Results	Reference
Insects								
<i>Plutella xylostella</i>	Kale	Foliar spray	AChE2	siRNA	18–27 bp	200 µg/ml	Approximately 60% mortality.	(Gong et al., 2013)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Potato	Foliar spray	Actin	dsRNA	50 – 297 bp	5 µg leaf ⁻¹	Significant mortality in dsRNA length-depend pattern.	(San Miguel and Scott, 2016)
<i>Diaprepes abbreviates</i>	Citrus	Foliar spray	Not informed	dsRNA	Not informed	Not informed	Control started 4-5 days after dsRNA application.	(de Andrade and Hunter, 2016)
<i>Diaphorina citri</i> ; <i>Bactericera cockerelli</i> ; <i>Homalodisca vitripennis</i>	Citrus approximately 2.5 m tall and Grapevines	Trunk injection; root drench	Arginine kinase	dsRNA	Not informed	2 g in 15 liters of water	Insects successfully uptake dsRNA from the treated plants; dsRNA was detected in plants for at least 57 days.	(Hunter et al., 2012)
<i>Nilaparvata lugens</i>	Rice	Roots soaking	Ces CYP18A1	dsRNA	Not informed	1 mL (1.0 mg mL ⁻¹ of water)	Gene knocked down; nymph mortality.	(Li et al., 2015)
<i>Ostrinia furnacalis</i>	Maize	Irrigation	KTI	dsRNA		10 mL (0.5 mg mL ⁻¹ water)	Gene knocked down; larval mortality.	
<i>Myzus persicae</i>	Tomato	Foliar application	ZYMV HC-Pro	dsRNA	588 bp	10.5 µg dsRNA in 10 µL water	Insect successfully uptake dsRNA; the dsRNA was processed into siRNA by the insect RNAi machinery.	(Gogoi et al., 2017)
<i>Tetranychus urticae</i>							Low dsRNA uptake; No siRNA in insects.	
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>								
<i>Halyomorpha halys</i>	Green beans	Soaking	JHAMT Vg	dsRNA	200-500 bp	300 µl (0.017 µg µL ⁻¹ of water) 300 µl (0.067 µg µL ⁻¹ of water)	Significant reduction in gene expression.	(Ghosh et al., 2017)
<i>Planococcus citri</i>	Tobacco	VIGS using recombinant TMV	Actin CHS1 V-ATPase	siRNA	Not informed	–	Crawlers feed on recombinant TMV-infected plants showed lower fecundity and pronounced death.	(Khan et al., 2013)
<i>Bactericera cockerelli</i>	Tomato Tomatillo Tobacco	VIGS using recombinant TMV	Actin	siRNA	21 nt	–	Gene knocked down in insects feed on these plants; Insects fed on infected tomatillo plants showed a decreased progeny production.	(Wuriyangan and Falk, 2013)
<i>Diaphorina citri</i>	Citrus	VIGS using recombinant CTV	Awd	siRNA	20-22 nt	–	Adults showed malformed-wing phenotype and increased mortality.	(Hajeri et al., 2014)
<i>Phenacoccus solenopsis</i>	Tobacco	VIGS using recombinant PVX	Bur V-ATPase	siRNA	–	–	Insects fed on treated plants showed physical deformities or died.	(Khan et al., 2018)
<i>Drosophila melanogaster</i>	–	VIGS using recombinant FHV; microinjection	RPS13 Vha26 Alpha COP	siRNA	–	–	Significantly higher mortality in insects.	(Taning et al., 2018)
<i>Helicoverpa armigera</i>	–	dsRNA expressed in bacteria, using recombinant <i>E. coli</i> strain HT115; artificial diet coated with engineered bacteria	AK	dsRNA	379-426 bp	30 µL (10 ⁹ cells)	Knocked down the target gene caused drastic reductions in body weight, body length, and pupation rate, resulting in high mortality.	(Ai et al., 2018)

RNAi em plantas

RNAi em plantas

■ Breve histórico

Relatada a ocorrência
de co-supressão em
plantas

1990

1998

Primeiras
observações de vírus
suprimindo genes
silenciadores

Detecção de
pequenos RNAs
apresentando PTGS

1999

2002

Clivagem de mRNAs
em *A. thaliana*
direcionada por
miRNAs

miRNAs de plantas
atuando como
repressores de
tradução

2003

RNAi em plantas

- Silenciamento por RNAi em estudos envolvendo expressão gênica:

RNAi em plantas

- Silenciamento por RNAi em estudos envolvendo expressão gênica:
 - Esclarecer funções e efeitos de genes específicos

RNAi em plantas

- Silenciamento por RNAi em estudos envolvendo expressão gênica:
 - Esclarecer funções e efeitos de genes específicos
 - Compreender os mecanismos de regulação

RNAi em plantas

- Silenciamento por RNAi em estudos envolvendo expressão gênica:
 - Esclarecer funções e efeitos de genes específicos
 - Compreender os mecanismos de regulação
 - Descrever vias metabólicas

RNAi em plantas

- Silenciamento por RNAi em estudos envolvendo expressão gênica:
 - Esclarecer funções e efeitos de genes específicos
 - Compreender os mecanismos de regulação
 - Descrever vias metabólicas
 - Promover avanços no melhoramento genético

RNAi em plantas

- Métodos de entrega de RNAi utilizados:
 - Transformação genética
 - Expressão transiente
 - Vetor viral
 - Nanopartículas de entrega de RNA

RNAi em plantas



- Melhoramento genético:

RNAi em plantas

■ Melhoramento genético:

■ Eliminar características não desejadas

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

AGRICULTURE

Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing

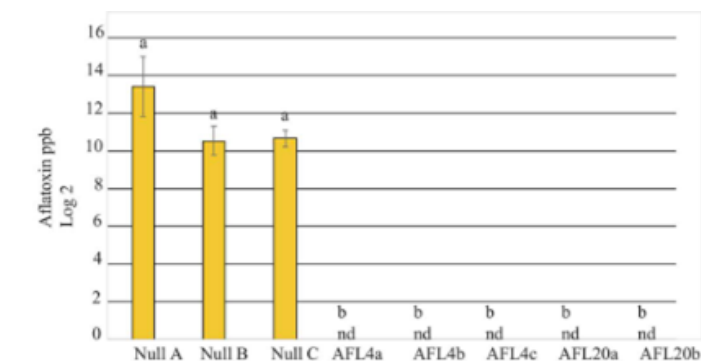
Dhiraj Thakare,¹ Jianwei Zhang,^{1,2} Rod A. Wing,^{1,2} Peter J. Cotty,³ Monica A. Schmidt^{1*}

Aflotoxinas são compostos tóxicos, carcinogênicos, produzidos por algumas espécies de *Aspergillus*

Contaminações são responsáveis por grandes perdas na produção

gene alvo: aflC

Construção de cassete com 3 seções do gene
3 transgênicas RNAiAFL



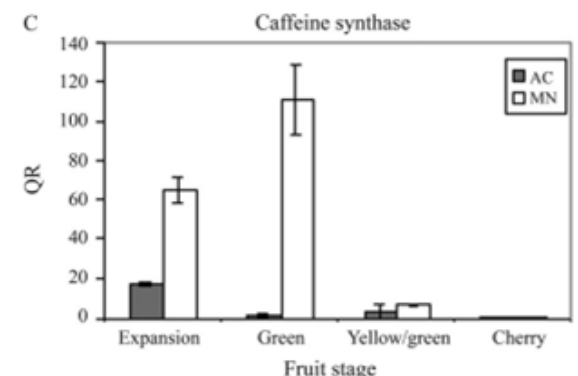
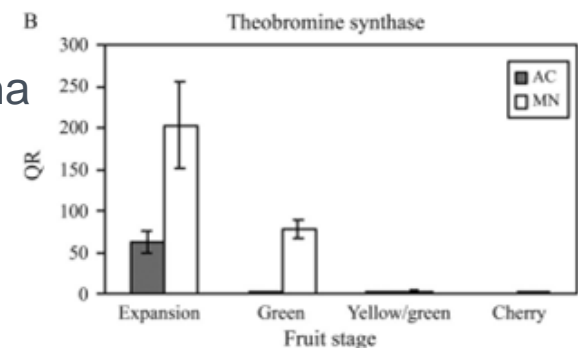
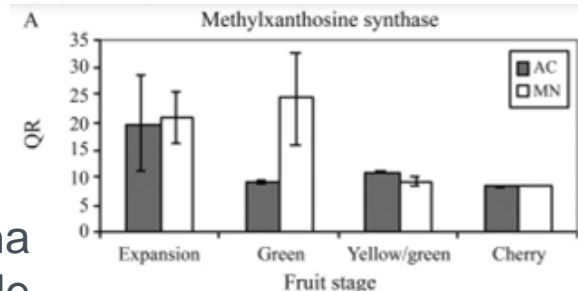
Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica*

Mirian Perez Maluf^{1,2}, Carla Cristina da Silva², Michelle de Paula Abreu de Oliveira², Aline Gomes Tavares², Maria Bernadete Silvarolla² and Oliveiro Guerreiro Filho²



Biossíntese de cafeína envolve várias etapas de metilação de adenina.

Metilxantina e teobromina são intermediários

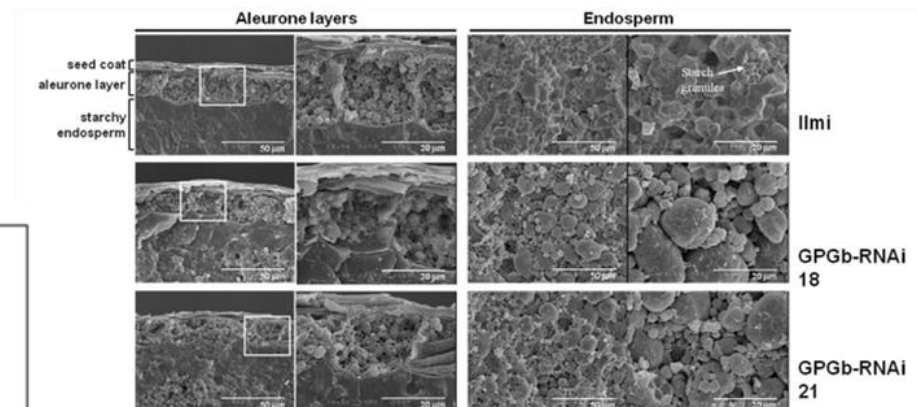
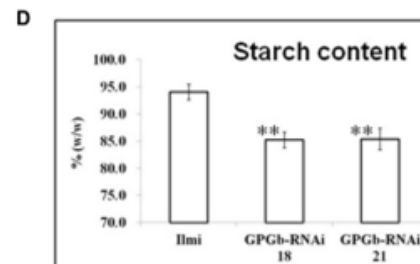
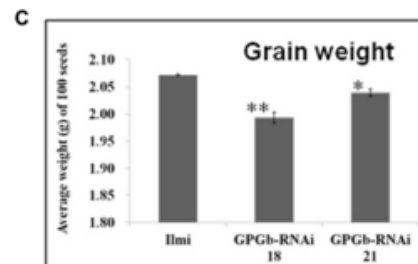


RNAi em plantas

- Melhoramento genético:
 - Eliminar características não desejadas
 - Alterar características nutricionais

RNA Interference-Mediated Simultaneous Suppression of Seed Storage Proteins in Rice Grains

Kyungwon Cho^{1,2}, Hye-Jung Lee^{1,2}, Yeong-Min Jo¹, Sun-Hyung Lim¹, Randeep Rakwal^{2,3}, Jong-Yeol Lee^{1*} and Young-Mi Kim^{1*}



Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DET1* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes

Ganga Rao Davuluri¹, Ageeth van Tuinen^{1,6}, Paul D Fraser², Alessandro Manfredonia¹, Robert Newman^{3,6}, Diane Burgess³, David A Brummell^{3,6}, Stephen R King^{4,6}, Joe Palys⁴, John Uhlig⁴, Peter M Bramley², Henk M J Pennings⁴ & Chris Bowler^{1,5}



RNAi em plantas

■ Melhoramento genético:

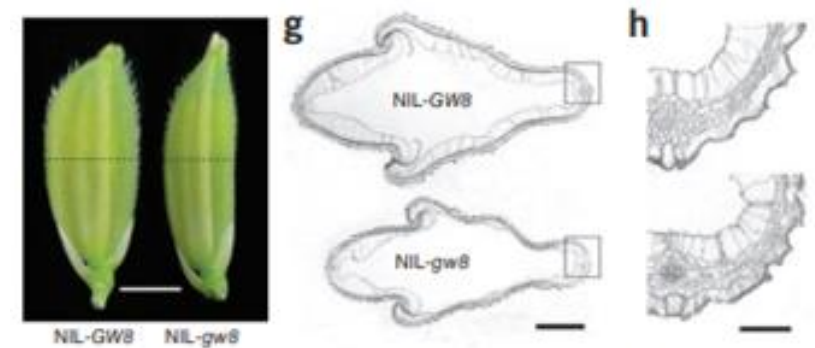
- Eliminar características não desejadas
- Alterar características nutricionais
- Alterar características morfológicas

RNA Interference Knockdown of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in Maize Reveals Novel Functions for Brassinosteroid Signaling in Controlling Plant Architecture^{1[OPEN]}

Gokhan Kir², Huaxun Ye, Hilde Nelissen, Anjanasree K. Neelakandan, Andree S. Kusnandar, Anding Luo, Dirk Inzé, Anne W. Sylvester, Yanhai Yin, and Philip W. Beecraft*

Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice

Shaokui Wang^{1,2}, Kun Wu¹, Qingbo Yuan¹, Xueying Liu¹, Zhengbin Liu¹, Xiaoyan Lin², Ruizhen Zeng², Haitao Zhu², Guojun Dong³, Qian Qian³, Guiquan Zhang² & Xiangdong Fu¹



RNAi em plantas

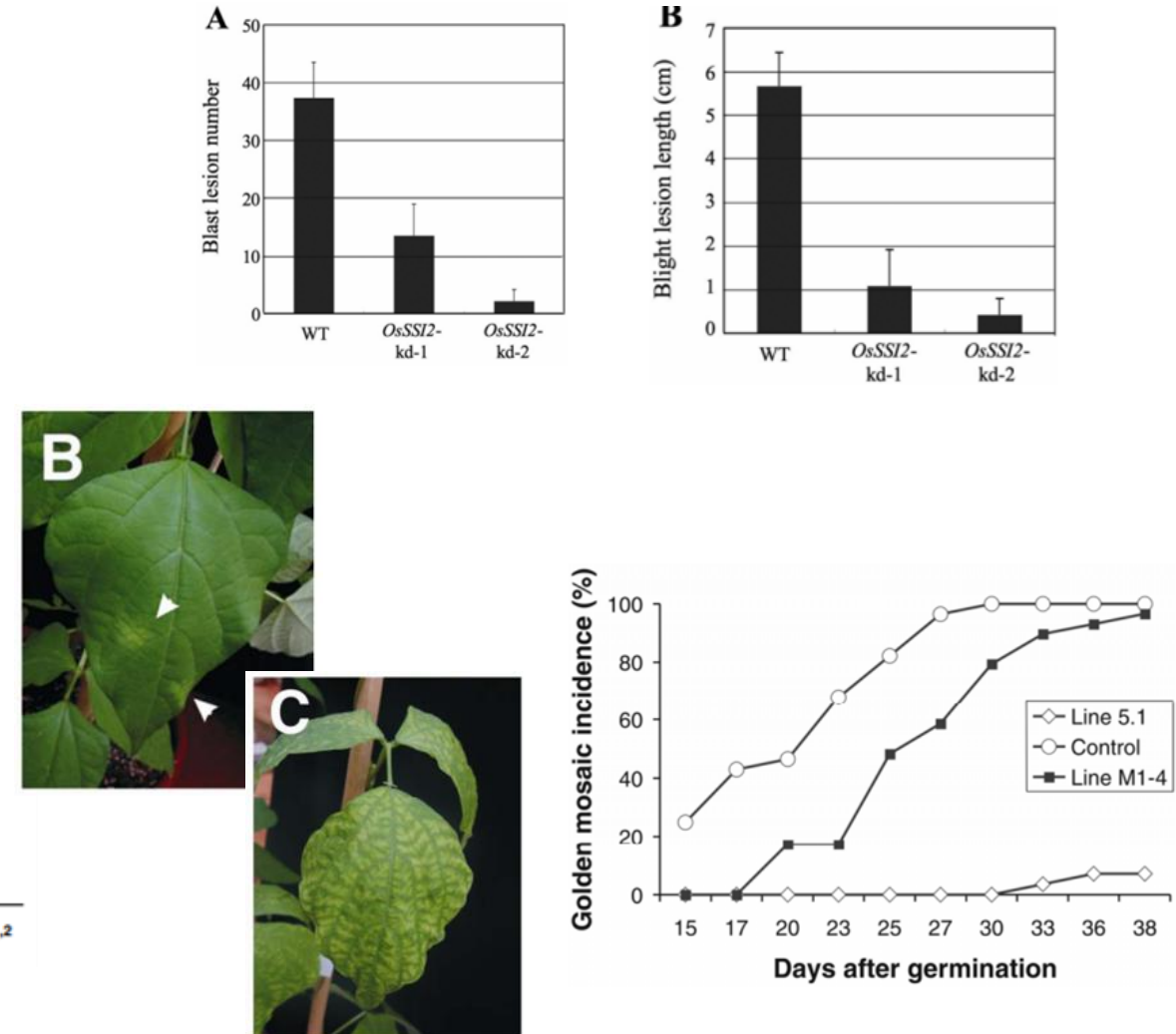
- Melhoramento genético:
 - Eliminar características não desejadas
 - Alterar características nutricionais
 - Alterar características morfológicas
 - Resistência a estresses bióticos

RNAi-Mediated Resistance to *Bean golden mosaic virus* in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*)

Kenny Bonfim,^{1,2} Josias C. Faria,³ Elsa O. P. L. Nogueira,¹ Érica A. Mendes,¹ and Francisco J. L. Aragão^{1,2}

Suppression of the Rice Fatty-Acid Desaturase Gene *OsSSI2* Enhances Resistance to Blast and Leaf Blight Diseases in Rice

Chang-Jie Jiang,¹ Masaki Shimono,¹ Satoru Maeda,¹ Haruhiko Inoue,¹ Masaki Mori,¹ Morifumi Hasegawa,² Shoji Sugano,¹ and Hiroshi Takatsuji¹



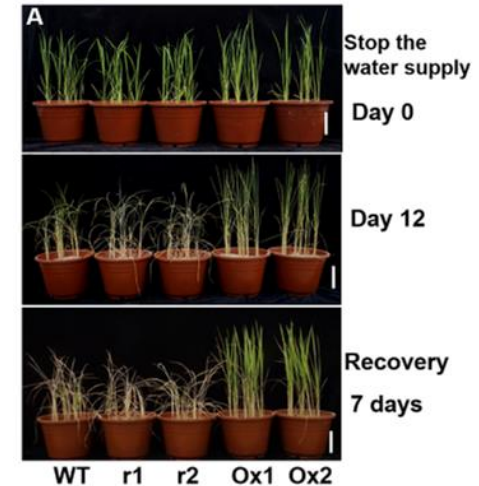
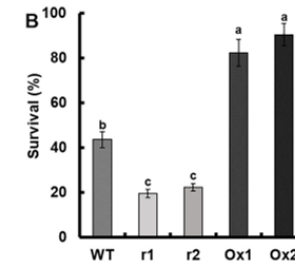
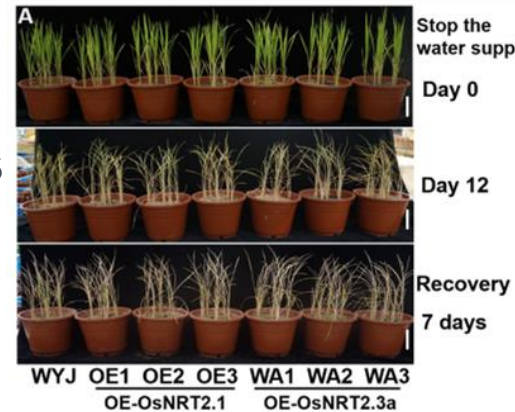
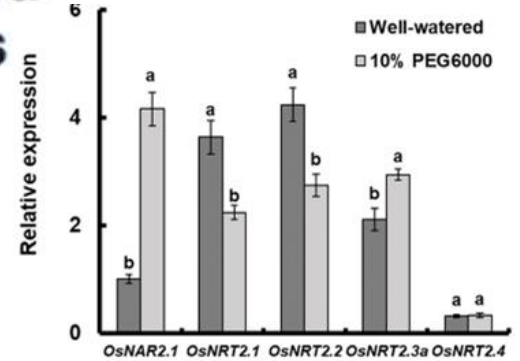
RNAi em plantas

■ Melhoramento genético

- Eliminar características não desejadas
- Alterar características nutricionais
- Alterar características morfológicas
- Resistência a estresses bióticos
- Resistência a estresses abióticos

OsNAR2.1 Positively Regulates Drought Tolerance and Grain Yield Under Drought Stress Conditions in Rice

Jingguang Chen^{1,2}, Tiantian Qi¹, Zhi Hu¹, Xiaoru Fan¹, Longlong Zhu¹, Muhammad Faseeh Iqbal¹, Xiaoming Yin¹, Guohua Xu¹ and Xiaorong Fan^{1*}



RNAi em plantas

■ Outros exemplos:

Down-regulation of the Sucrose Transporter *CsSUT1* Causes Male Sterility by Altering Carbohydrate Supply¹[OPEN]

Lulu Sun,^{a,2} Xiaolei Sui,^{a,2} William J. Lucas,^b Yaxin Li,^a Sheng Feng,^a Si Ma,^a Jingwei Fan,^a Lihong Gao,^a and Zhenxian Zhang^{a,3,4}

Os resultados demonstraram que a macho-esterilidade pode ser induzida pela menor regulação da expressão do gene *CsSUT1* (transportador de sucrose) mediada por RNAi.

Flores masculinas com essa alteração tiveram teores de sucrose, hexose e amido reduzidos nos últimos estágios de desenvolvimento.

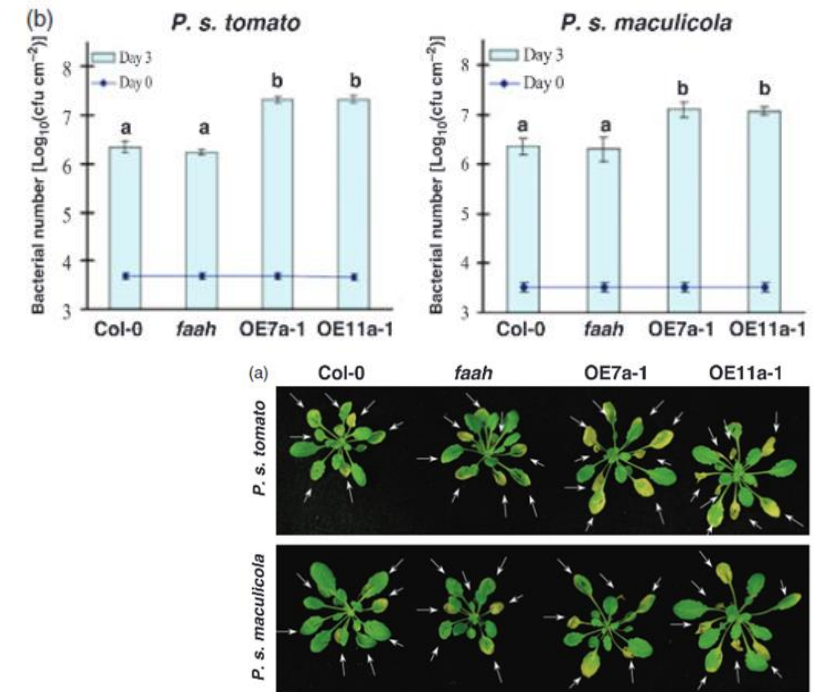
Análises transcricionais mostraram que muitos genes relacionados com o metabolismo, sinalização e transporte de açúcares, assim como genes relacionados com a sinalização da auxina, estavam sub-regulados, enquanto fatores de transcrição MYB (regulação da fertilidade masculina) estavam supra-regulados

Overexpression of a fatty acid amide hydrolase compromises innate immunity in Arabidopsis

Li Kang¹, Yuh-Shuh Wang¹, Srinivasa Rao Uppalapati¹, Keri Wang¹, Yuhong Tang¹, Vatsala Vadapalli², Barney J. Venables², Kent D. Chapman², Elison B. Blancaflor¹ and Kirankumar S. Mysore^{1,*}

¹Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK, USA, and

²Center for Plant Lipid Research, Department of Biological Sciences, University of North Texas, Denton, TX, USA



RNAi em Humanos

RNAi em Humanos

UNIVERSITY of WASHINGTON

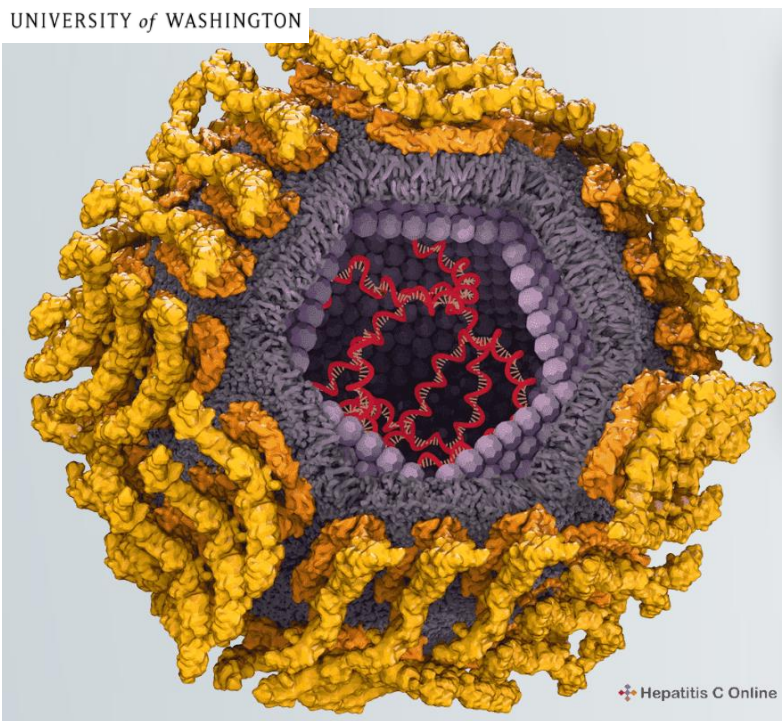


Figura 1 - Estrutura do HCV: Glicoproteínas do envelope (heterodímeros E1 e E2), uma membrana lipídica, o nucleocapsídeo e o genoma de RNA de fita simples.

DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1656-1659.2002> (2002)
DOI: [10.1073/pnas.1307527110](https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110) (2013)




International Journal of Pharmaceutics

Volume 479, Issue 1, 1 February 2015, Pages 181-188



Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

Josune Torrecilla ✉, Ana del Pozo-Rodríguez ✉, Paola Stephanie Apaolaza ✉, María Ángeles Solinís ✉, Alicia Rodríguez-Gascón  ✉

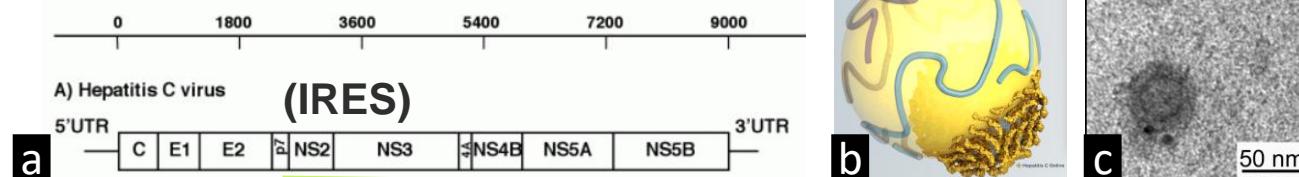
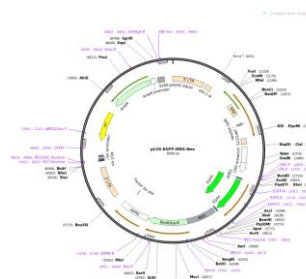


Figura 2 – a: O RNA do HCV é um RNA de fita simples de sentido positivo com aproximadamente 9.600 bases de nucleotídeos de comprimento e um único quadro de leitura aberto longo (3.006-3.037 códon) flanqueado por regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3'. O genoma do RNA do HCV é usado tanto para tradução quanto para transcrição; B-c: partícula viral de HCV produzida em um sistema de cultura de tecidos a partir de um genoma viral. Partículas virais foram geradas após transfecção da linha celular de hepatoma humano Huh7 por replicons de HCV da cepa JFH1 genótipo.

DOI: [10.1038/nm1268](https://doi.org/10.1038/nm1268) (2005)

RNAi em Humanos

- ✓ Plasmídeo HCV-IRES 1b U6-Promotor-GFP-Neo
- ✓ Fluorescência Alexa Fluor 488;
- ✓ Corante fluorescente Nile Red;
- ✓ HA-P-shRNA74-SLN (hyaluronic acid) +Protamina;
- ✓ DX-P-shRNA74-SLN (dextran) +Protamina;
- ✓ shRNA74 (3'-TCGCAGATCGGTACCGCAA-5');
(IRES-GFP)
- ✓ Linhagem hepatocelular humano HepG2;



www.addgene.org/128660/

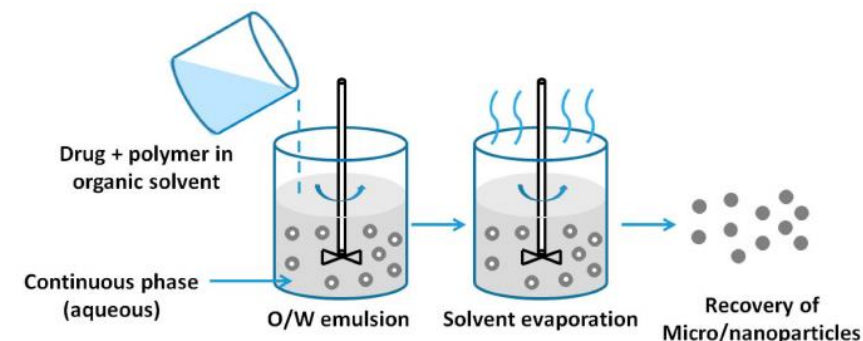


DOI: [//dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.197](https://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.197)

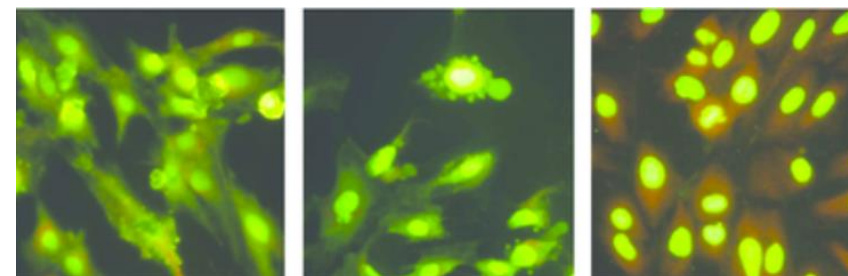
Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

[Josune Torrecilla](#), [Ana del Pozo-Rodríguez](#), [Paola Stephanie Apaolaza](#),
[María Ángeles Solinís](#), [Alicia Rodríguez-Gascón](#)



DOI - [10.3390/nano6020026](https://doi.org/10.3390/nano6020026)



DOI: [10.3390/ijms17071015](https://doi.org/10.3390/ijms17071015)

RNAi em Humanos

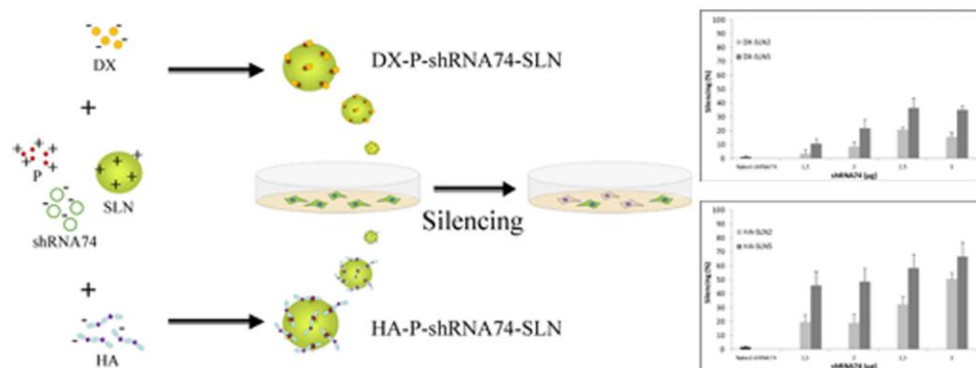


Figura 3 – Transfecções com HA-SLN2 1:2, HA-SLN5 1:5, DX-SLN2 e DX-SLN5 em diferentes doses de shRNA74 foram os tratamentos e transfecções com sem a mistura [de shRNA](#) (shRNAscr) usadas como controles internos.

Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

Josune Torrecilla [✉](#), Ana del Pozo-Rodríguez [✉](#), Paola Stephanie Apaolaza [✉](#),
 María Ángeles Solinís [✉](#), Alicia Rodríguez-Gascón [✉](#)

Vector	PA:P:shRNA74:SLN ratio	Size (nm)	Zeta potential (mV)	PdI
HA-SLN2	0.5:2:1:2	233±13	+29±0.46	0.21±0.012
HA-SLN5	0.5:2:1:5	242±16	+30.97±0.45	0.23±0.004
DX-SLN2	1:2:1:2	208±9.9*	+31.58±0.86	0.23±0.006
DX-SLN5	1:2:1:5	219±3.5	+38.87±0.64**	0.22±0.018

*

$p < 0.05$ respect to HA-SLN5.

**

$p < 0.01$ respect to all other formulations.

Figura 4 - Quatro vetores silenciadores direcionados para o loop de haste II do 5' UTR (shRNA74), HA-SLN2, HA-SLN5, DX-SLN2 e DX-SLN5 em diferentes doses de shRNA74: 1,5 µg, 2 µg, 2,5 µg e 3 µg .

RNAi em Humanos

Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

Josune Torrecilla [✉](#), Ana del Pozo-Rodríguez [✉](#), Paola Stephanie Apaolaza [✉](#),
María Ángeles Solinís [✉](#), Alicia Rodríguez-Gascón [✉](#)

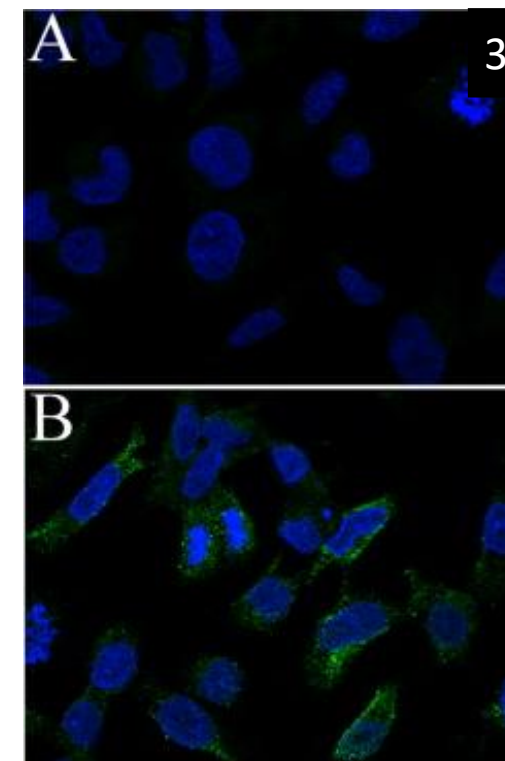
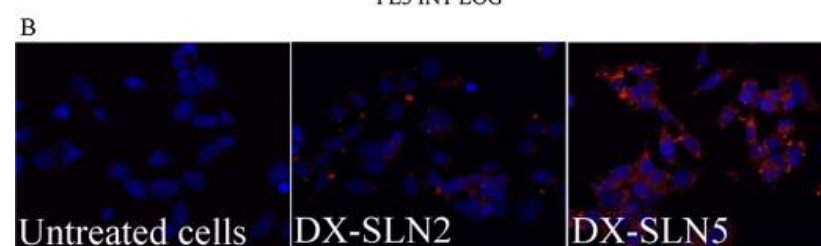
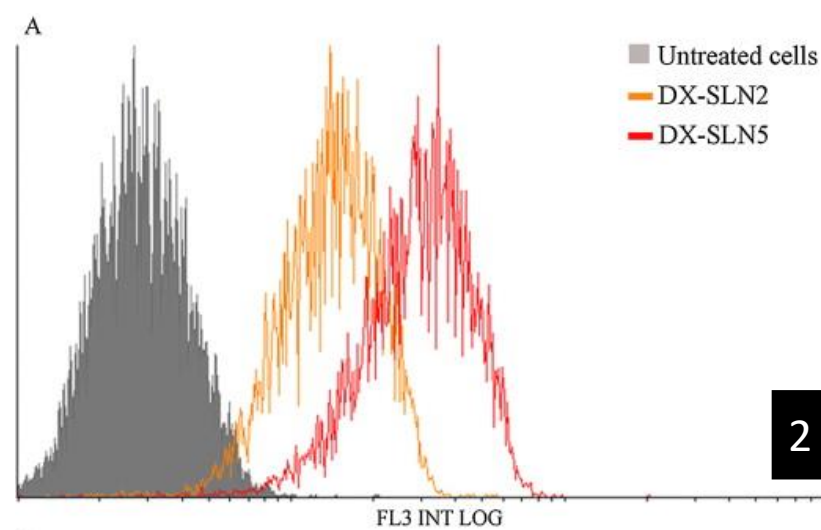
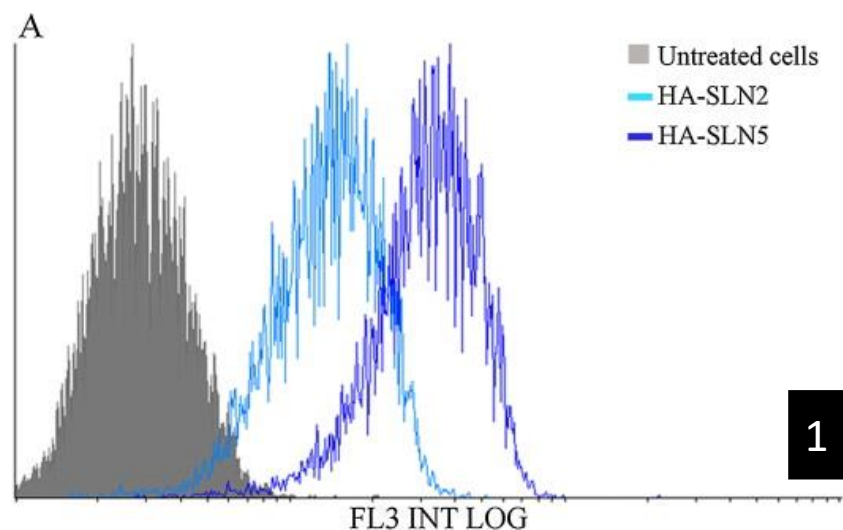


Figura 5 – 1 e 2: Captação celular de vetores virais em células HepG2; 3: Detecção da expressão de CD44 por imunocitoquímica.

RNAi em Humanos

Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

Josune Torrecilla [✉](#), Ana del Pozo-Rodríguez [✉](#), Paola Stephanie Apaolaza [✉](#),
María Ángeles Solinís [✉](#), Alicia Rodríguez-Gascón [✉](#)

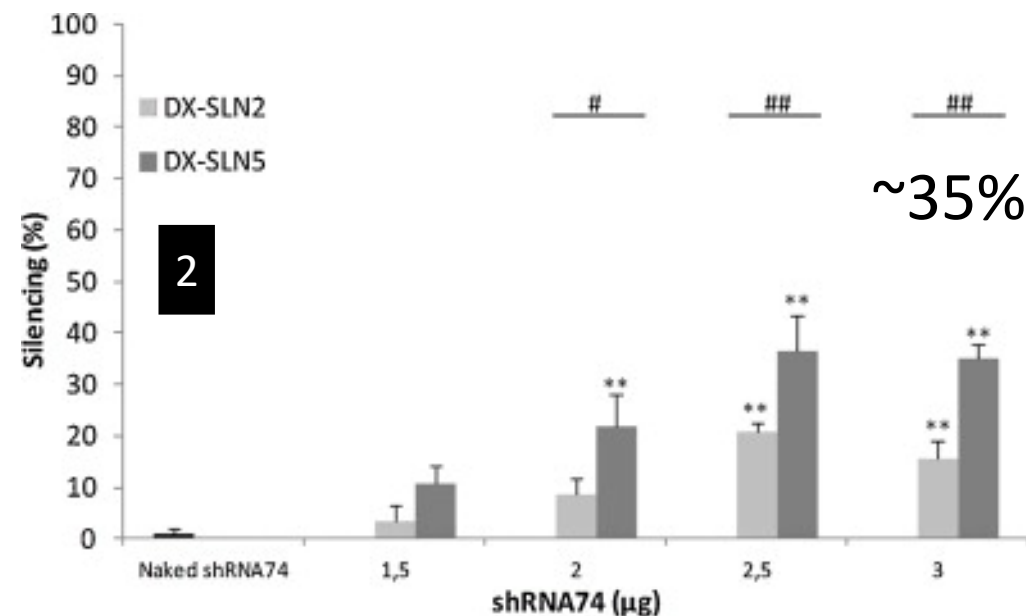
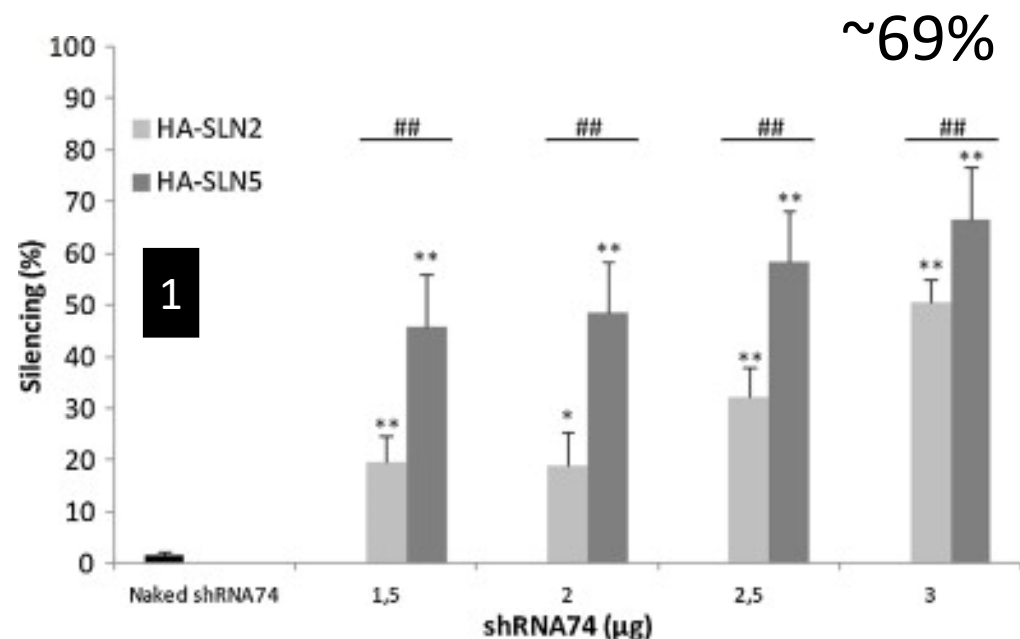


Figura 6 – Silenciamento da expressão de IRES em células HepG2, 48 h após os tratamento, com 1: vetores HA-SLN2 e HA-SLN5 com e 2: vetores DX-SLN2 e DX-SLN5, em diferentes doses de shRNA74. **O shRNA74 nu induziu uma taxa de silenciamento insignificante (<2%).**

RNAi em Humanos

Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

Josune Torrecilla [✉](#), Ana del Pozo-Rodríguez [✉](#), Paola Stephanie Apaolaza [✉](#),
María Ángeles Solinís [✉](#), Alicia Rodríguez-Gascón [✉](#)

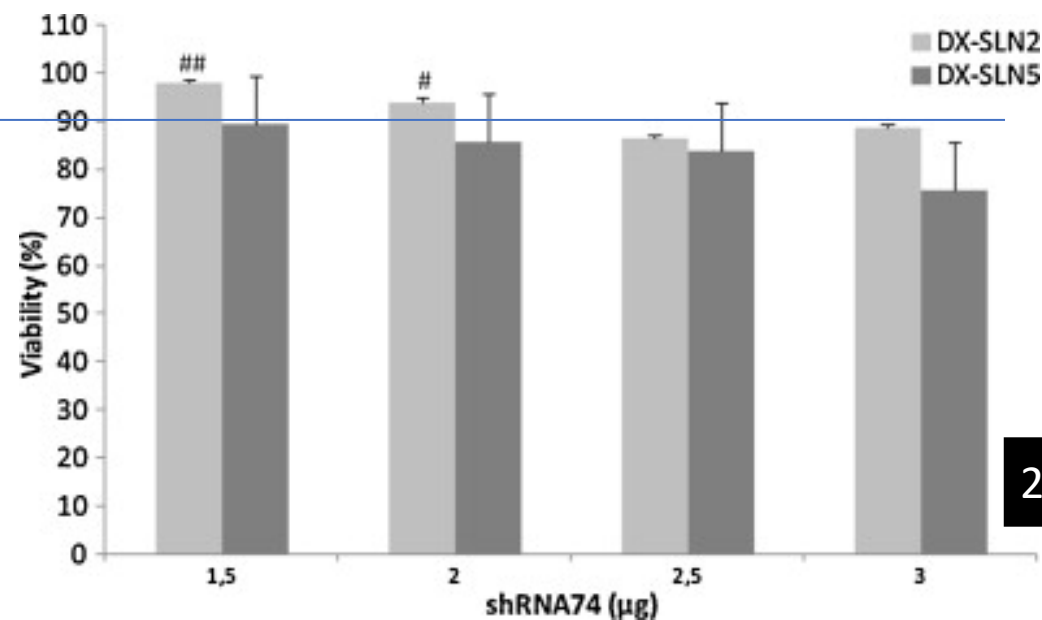
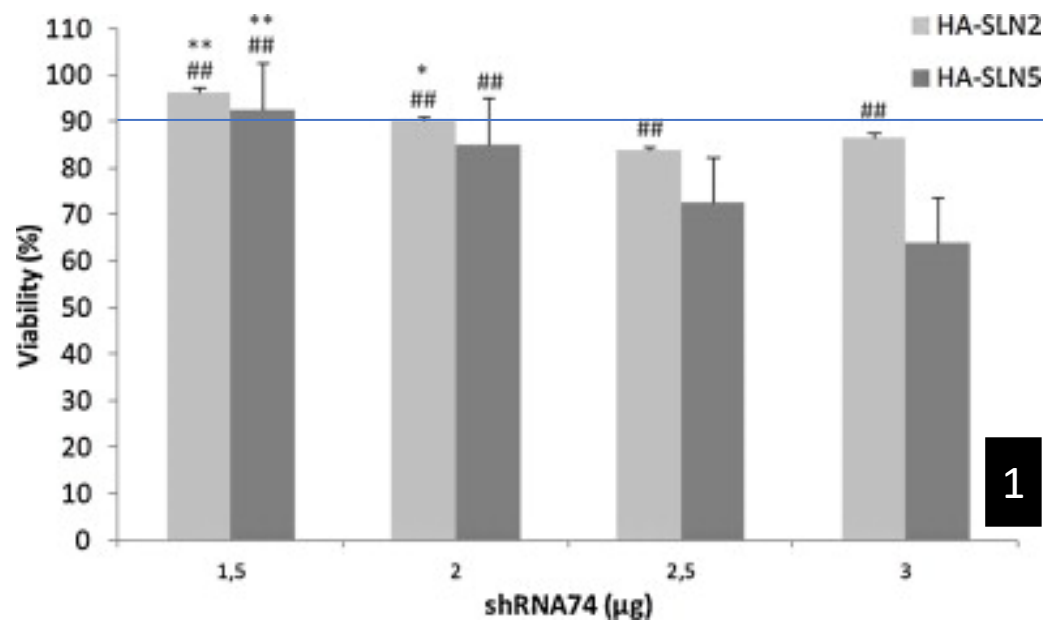



Figura 7 – Viabilidade celular 48 h após o tratamento de células HepG2 com os vetores 1: HA-SLN2 e HA-SLN5 e 2: DX-SLN2 e DX-SLN5, em diferentes doses de shRNA74.

RNAi em Humanos

Pharmaceutical nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference

[Josune Torrecilla](#) ✉, [Ana del Pozo-Rodríguez](#) ✉, [Paola Stephanie Apaolaza](#) ✉, [María Ángeles Solinís](#) ✉, [Alicia Rodríguez-Gascón](#)  ✉

- Todos os vetores apresentaram tamanho de partícula na faixa de nanômetros e carga superficial positiva, e foram capazes de proteger o shRNA74 contra Dnases.
- A capacidade de silenciamento depende da presença de DX ou HA no vetor, da proporção de shRNA74 para SLN e da dose de shRNA74.
- Com ambos os polissacarídeos, a maior eficácia de silenciamento foi obtida com os vetores DX-SLN5 e HA-SLN5 nas doses mais altas de shRNA74 (2,5 µg e 3 µg).
- Vetores não virais compostos por SLNs, protamina e HA ou DX, portadores de shRNA74, podem silenciar a expressão de HCV-IRES em células HepG2 por RNA de interferência shRNA.

RNAi em Humanos



Pharmaceutical Nanotechnology

Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: *In vivo* protein expression after intravenous administration

Ana del Pozo-Rodríguez^{a,b}, Diego Delgado^{a,b}, María Ángeles Solinís^{a,b}, Jose Luis Pedraz^{a,b}, Enrique Echevarría^c, Juan Manuel Rodríguez^c, Alicia R. Gascón^{a,b,*}

^a Networking Research Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, SLFBP-EHU, Vitoria-Gasteiz, Spain
^b Pharmacy and Pharmaceutical Technology Laboratory, Pharmacy Faculty, University of the Basque Country (UPV-EHU), Vitoria-Gasteiz, Spain
^c Physiology Laboratory, Pharmacy Faculty, University of the Basque Country (UPV-EHU), Vitoria-Gasteiz, Spain

2010



Silencing of hepatitis C virus replication by a non-viral vector based on solid lipid nanoparticles containing a shRNA targeted to the internal ribosome entry site (IRES)

Josune Torrecilla^a, Ana del Pozo-Rodríguez^a, María Ángeles Solinís^a, Paola S. Apaolaza^a, Beatriz Berzal-Herranz^b, Cristina Romero-López^b, Alfredo Berzal-Herranz^b, Alicia Rodríguez-Gascón^a

2015

LIPID NANOPARTICLES FOR TREATING OCULAR DISEASES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to the use of a lipid nanoparticle system useful for transfecting genetic material in the prevention or treatment of eye diseases.



Pharmaceutical Nanotechnology

Dextran-protamine–solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: *In vitro* characterization and *in vivo* transfection after intravenous administration to mice

Diego Delgado^a, Alicia Rodríguez Gascón^a, Ana del Pozo-Rodríguez^a, Enrique Echevarría^b, Aritz Pérez Ruiz de Garibay^a, Juan Manuel Rodríguez^b, María Ángeles Solinís^{a,*}

^a Pharmacy and Pharmaceutical Technology Laboratory, Pharmacy Faculty, University of the Basque Country (UPV-EHU), Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain
^b Physiology Laboratory, Pharmacy Faculty, University of the Basque Country (UPV-EHU), Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain

2012



2016



Curriculum Vitae

Personal information Alicia Rodríguez Gascon

Alicia Rodríguez Gascon

Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia



Conclusões

Conclusões

- Mais estudos aprofundados sobre papéis fisiológicos e moleculares precisam ser realizados sobre RNAi em trabalhos de plantas e patógenos.
 - Com o aumento da compressão do mecanismo regulatório há aumento da capacidade de explorar o mecanismo como ferramenta experimental.
- Para a agricultura os principais desafios são: controle eficiente, especificidade do alvo, estabilidade e persistência, variação genética, assuntos regulatórios e aceitação pública.
 - Uso da tecnologia e comercialização em resistência a patógenos e insetos, menor que o esperado.

Conclusões

- Cenário em transição: Estudos sobre minimizar custos, tornando-os também mais seguros e duradouros. A tecnologia RNAi irá desempenhar papel fundamental na proteção de plantas no futuro.

Em uso:

- Plantas (milho) resistente a insetos (Diabrotica do milho e lagarta do cartucho).
- Controle de nematoide, da Nematode Control;

- Além da criação de plantas transgênicas com tecnologia RNAi, também é promissor a utilização de inseticidas-RNAi, que pode ser explorada como uma estratégia eficaz no controle de pragas no futuro.

Conclusões

... em humanos:

- Desafios: garantir que a terapia por RNAi atinja o alvo e seja eficiente e minimizar os potenciais efeitos colaterais que surgem com a utilização do recurso.
- Os estudos caminham a favor da medicina, com os seguintes estudos atuais avançados: Tratamento para reduzir colesterol LDL, doenças virais (HIV, hepatite C), terapia contra câncer.

Em uso: Patisiran- contra polineuropatia amiloidótica familiar. Acúmulo de proteínas (transtiretina) nos tecidos. Uso de siRNA intravenoso.

Obrigado!

