

Cópia gratuita - venda proibida

Tiago Campos Pereira
(coordenador)

Introdução à
Técnica de
Interferência
por **RNA - RNAi**

SBG Sociedade
Brasileira de
Genética

Ribeirão Preto, 2013



Cópia gratuita - venda proibida

© 2013

Todos os direitos desta edição são reservados à Sociedade Brasileira de Genética.

Comissão Editorial

Élgion Lúcio Silva Loreto – *editor*
Departamento de Biologia, UFMS

Carlos Frederico Martins Menck
Departamento de Microbiologia, ICB, USP

Louis Bernard Klaczko
Departamento de Genética, UNICAMP

Marcio de Castro Silva-Filho
Departamento de Genética, ESALQ, USP

Maria Cátira Bortolini
Departamento de Genética, UFRGS

Marcelo dos Santos Guerra Filho
Departamento de Botânica, UFPE

Pedro Manoel Galetti Junior
Departamento de Genética e Evolução, UFSCar

Introdução à técnica de Interferência por RNA – RNAi / Tiago Campos
Pereira (coord.) – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética,
2013.

170 p. : il.

ISBN 978-85-89265-17-1

1. SILENCIAMENTO GÊNICO. 2. siRNA. 3. dsRNA. I. Pereira, Tiago
Campos, coord.

Capa, projeto gráfico, diagramação e normalização

editora  cubo
soluções para o universo acadêmico



Rua Cap. Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 - Ribeirão Preto - SP
16 3621-8540 | 16 3621-3552

Lista de Acrônimos, Siglas e Abreviaturas

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): ferramenta de procura por alinhamento local.

CDS (*coding DNA sequence*): sequência codificadora do DNA.

cRNA (*complementary RNA*): RNA complementar.

ds-: dsRNA.

dsGFP: dsRNA contra o gene da GFP. Na literatura, o termo “dsXYZ” refere-se a um dsRNA contra o gene XYZ.

dsRNA (*double-stranded RNA*): RNA dupla-fita.

esiRNAs (*endonuclease-prepared small interfering RNAs*): pequenos RNAs de interferência preparados através da clivagem de um dsRNA por uma endonuclease.

hpRNA (*hairpin RNA*): RNA de interferência longo, em forma de grampo.

HDGS (*homology-dependent gene silencing*): silenciamento gênico dependente de homologia.

IVT (*in vitro transcription*): transcrição *in vitro*. Produção de RNAs em laboratório através de um DNA molde e uma RNA polimerase.

lhRNA (*long hairpin RNA*): o mesmo que hpRNA.

miRNA: microRNA.

miR: microRNA.

NCBI (National Center for Biotechnology Information): centro nacional de informação sobre biotecnologia (dos EUA).

nt: nucleotídeo(s).

pb: par(es) de bases.

PTGS (*post-transcriptional gene silencing*): silenciamento gênico pós-transcricional.

RdRP (*RNA-dependent RNA Polymerase*): RNA polimerase dependente de RNA.

RISC (*RNA-induced Silencing Complex*): complexo de silenciamento induzido por RNA.

RNAi (*RNA-mediated interference*): interferência por RNA.

shRNA (*short hairpin RNA*): pequeno RNA de interferência em forma de grampo.

siGFP: siRNA contra o gene da GFP. Na literatura, o termo “siXYZ” refere-se a um siRNA contra o gene XYZ.

siRNA (*small interfering RNA*): pequeno RNA de interferência.

si-: siRNA.

sh-: shRNA.

UTR (*untranslated region*): região não traduzida.

Cópia gratuita - venda proibida

Sumário

vii	Prefácio
1	Capítulo 1 Histórico
15	Capítulo 2 Aplicações da Técnica de RNAi em Plantas
25	Capítulo 3 Aplicações Biotecnológicas da RNAi em Animais
37	Capítulo 4 Aplicações Médicas da RNAi
46	Capítulo 5 Moléculas Utilizadas em RNAi e Métodos de Obtenção
64	Capítulo 6 Desenho Racional de siRNAs
76	Capítulo 7 Desenho Racional de dsRNAs
81	Capítulo 8 Controles Utilizados & Confirmação do Silenciamento
94	Capítulo 9 Estratégias para Uso da RNAi em Células de Mamíferos <i>In Vitro</i>
113	Capítulo 10 Métodos de Entrega de Duplexes de RNA <i>In Vivo</i>

Cópia gratuita - venda proibida

117	Capítulo 11 Cuidados Especiais Associados ao Uso da RNAi
125	Capítulo 12 Supressores de RNAi
141	Capítulo 13 RNA Activation e outros Efeitos Mediados por dsRNAs
157	Glossário
159	Adendo Desvendando Expressões e Termos

Prefácio

Tiago Campos Pereira

Os dados gerados pela experimentação em laboratório, ou pela observação da natureza, são expostos à sociedade através de artigos científicos, os *papers*. A cada ano milhares de *papers* são publicados, agregando conhecimentos que tornam melhores nossas condições de vida. Dentre a miríade de artigos produzidos, pouquíssimos são capazes de promover uma revolução na comunidade científica.

Um destes manuscritos foi publicado em 19 de fevereiro de 1998, na prestigiosa revista científica *Nature*. Naquele momento, a comunidade de geneticistas moleculares lia um trabalho que revolucionaria a área assim como a PCR fizera 13 anos antes.

Andrew Fire, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver e Craig C. Mello revelavam ao mundo uma descoberta impressionante: moléculas de RNA dupla fita eram capazes de promover o silenciamento gênico potente e específico no verme modelo *C. elegans*. Eles demonstraram que era possível manipular geneticamente um organismo de maneira relativamente simples. Toda a complexidade, tempo, equipamentos e *know-how* necessários para a produção de animais *knock out* poderiam ser substituídos por uma estratégia incredivelmente simples - a RNAi. E se este procedimento fosse aplicável em outras espécies de animais e plantas? Em humanos? As implicações na área agrônômica, veterinária e médica eram inúmeras e eles compreenderam claramente isto, a ponto de postergar por meses a publicação mais importante de suas vidas para garantir o registro da patente.

Apenas oito anos após este artigo seminal, Andrew Fire e Craig Mello foram laureados com o Nobel de Medicina ou Fisiologia. Fire apresenta uma intrigante história de vida. Ele se graduou em matemática aos 19 anos, pela Universidade da Califórnia, em Berkeley, em 1978. Decidido a seguir carreira em biologia molecular, ele se enveredou na pós-graduação sob a supervisão de Phillip Sharp (Nobelista em 1993), do MIT. Ao concluir seu doutorado, em 1983, ele partiu para a Inglaterra para realizar o pós-doutoramento com Sydney Brenner (Nobelista em 2002) na Universidade de Cambridge. Retornando aos EUA, Fire permaneceu um longo período como pesquisador no Carnegie Institution of Washington, até aceitar o convite para assumir

Cópia gratuita - venda proibida

uma posição na Universidade Stanford em 2003. O ano de 2006 marcaria sua vida, assim como fora com seus ex-supervisores, ao receber o prêmio Nobel.

Este livro foi concebido para auxiliar o pesquisador a compreender as bases teóricas referentes a esta técnica tão promissora - a RNAi, suas aplicações, limitações, estratégias de uso e demais aspectos. Ele foi preparado ao longo de três anos, envolvendo um grupo de pesquisadores e docentes de diversas universidades, visando proporcionar ao leitor uma ampla visão sobre o tema.

Registro aqui meus agradecimentos a todos que auxiliaram direta e indiretamente na produção deste texto (autores, colaboradores, revisores e editores), às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPESP e Fundações de Amparo à Pesquisa dos estados de todos os autores, por fornecerem todo o arcabouço necessário para a elaboração deste livro.

Em especial, agradeço a Deus por me conceder a vida, por me dar a chance de estudar a vida, por me fazer feliz nesta vida e por me conceder a vida eterna.

“Porque eu bem sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o Senhor; pensamentos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que esperais.” Jeremias 29:11.

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia¹

¹*Depto. de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP*

Vários processos biológicos fundamentais foram desvendados por meio de ações investigativas devidamente delineadas e planejadas, enquanto que outros foram colocados em evidência graças à perspicácia e capacidade dos pesquisadores em interpretar resultados experimentais inesperados ou contraditórios. O silenciamento gênico mediado por moléculas de RNA (ou simplesmente silenciamento por RNA) é um, entre outros fenômenos, cujas evidências de sua existência não foram observadas diretamente, mas inferidas a partir de resultados iniciais totalmente imprevisíveis. Neste contexto, à medida que novos ensaios eram delineados para tentar explicar as contradições observadas, o que parecia absurdo ou um efeito de manipulação indevida passava a fornecer embasamento científico para novas análises. Assim, sob uma perspectiva histórica é possível afirmar que a descoberta desse importante fenômeno foi fruto da intuição aliada a um processo analítico minucioso. Embora a terminologia usada para se referir ao silenciamento mediado por moléculas de RNA seja vasta e diretamente associada ao organismo no qual esse processo foi inicialmente investigado, no presente capítulo, o termo silenciamento por RNA será usado de forma geral para se referir a esse fenômeno epigenético responsável pela regulação negativa da expressão gênica.

A ocorrência de silenciamento gênico associado a moléculas de RNA foi evidenciada inicialmente em plantas no começo da década de 90 em um estudo empregando petúnias. Intencionando aumentar a expressão da enzima calcone sintase (*chalcone synthase*; CHS), nessa espécie, pela introdução de cópias adicionais do gene endógeno via transgênese, Napoli et al. (1990) obtiveram uma série de resultados contraditórios. A enzima CHS está envolvida na biossíntese de antocianina, sendo esperada uma intensificação da coloração violeta das flores em linhagens transgênicas portando uma construção quimérica contendo a região codificadora do gene *chs*. Entretanto, de maneira totalmente inesperada, observou-se que a introdução do referido transgene resultava em bloqueio total ou parcial da via de síntese de antocianina, determinando o aparecimento de plantas com

Cópia gratuita - venda proibida

flores totalmente brancas ou variegadas (42% do total). Por outro lado, progênies de plantas sem a introdução do gene *chs* eram normais e apresentavam flores violetas.

Os ensaios subsequentes, visando compreender tais resultados, foram primordiais para desvendar as bases moleculares do silenciamento por RNA. Primeiramente verificou-se que a ausência de pigmentação nas flores brancas estava associada a uma redução de 50 vezes no acúmulo de transcritos do transgene e do gene endógeno se comparada com as flores violetas normais. Por outro lado, observou-se que a reversão somática das plantas com flores brancas para o fenótipo parental era acompanhada por um aumento coordenado nos níveis de tais transcritos. Com base nesses dados, o fenômeno observado foi chamado de cossupressão (Figura 1) já que uma supressão coordenada da expressão do transgene e do gene endógeno pré-existente era constatada. Estes resultados foram corroborados em artigo publicado por outro grupo de pesquisa, em que se demonstrou que a introdução de uma cópia genômica intacta do gene *chs* também era capaz de promover a cossupressão, demonstrando, assim, que tal fenômeno não era restrito a construções gênicas geradas artificialmente (Van der Krol et al., 1990). Em estudos complementares, verificou-se que a transcrição nuclear dos genes suprimidos em plantas com fenótipo de cossupressão era normal, sendo a redução na acumulação dos transcritos correspondentes observada exclusivamente no citoplasma (De Carvalho et al., 1992; Van Blokland et al., 1994). O termo PTGS (do inglês *post-transcriptional gene silencing*) foi então cunhado para designar o fenômeno citoplasmático constatado em petúnias (e em outras espécies vegetais) e, assim, diferenciá-lo do silenciamento transcricional de ocorrência nuclear observado em outros organismos. É importante realçar aqui que as flores brancas ou variegadas observadas nas linhagens cossuprimidas de petúnia representaram o primeiro fenótipo efetivamente relacionado com o silenciamento por RNA, muito embora o mecanismo de ação desse fenômeno biológico fosse até então totalmente desconhecido.

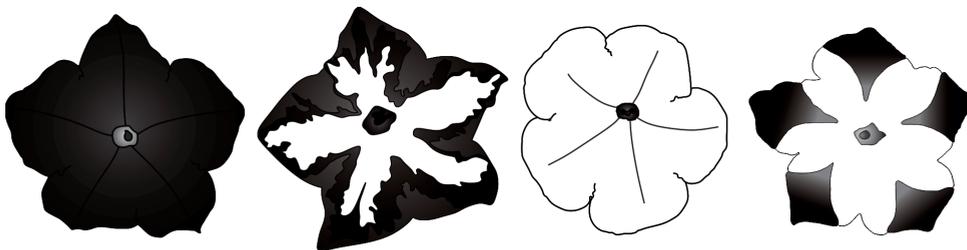


Figura 1. Cossupressão em petúnias. Fenótipo normal (primeira à esquerda) e plantas cossuprimidas (três exemplares à direita): os setores brancos correspondem a regiões em que há silenciamento gênico.

Paralelamente ao fenômeno de cossupressão observado em petúnias, uma série de outros experimentos, visando compreender as bases moleculares de um mecanismo de resistência induzida observado particularmente em plantas, denominado “resistência derivada do patógeno” (PDR do inglês *pathogen derived resistance*; Sanford e Johnston, 1985), foi determinante para demonstrar a importância funcional das moléculas de RNA no silenciamento. A proteção gerada pela PDR é normalmente obtida transformando-se plantas com porções selecionadas do genoma do patógeno alvo. Explorando tal conceito,

a maioria dos relatos, em que a PDR foi empregada com sucesso, refere-se ao controle de infecções virais em que a região codificadora da proteína do capsídeo viral foi introduzida por transgenia em plantas modelo (revisto em Fitchen e Beachy, 1993). Em alguns casos, entretanto, observou-se que a resistência obtida podia ser mediada tanto pela proteína capsidial como pela molécula de RNA correspondente, sendo a resistência mediada pelo RNA altamente específica à sequência viral doadora e efetiva contra altos níveis de inóculo (Goodwin et al., 1996; Lindbo e Dougherty, 1992; Lindbo et al., 1993).

Esses dados experimentais foram relevantes já que evidenciaram a existência em plantas de um mecanismo de silenciamento viral mediado por moléculas de RNA aparentemente dependente de homologia. Nesse contexto, apesar de Lindbo et al. (1993) terem sido os primeiros a correlacionar tal observação ao fenômeno de cossupressão observado em petúnias, o elo entre o PTGS (e o fenômeno de cossupressão) e a resistência viral mediada por RNA só veio a ser estabelecido mais tarde, com o emprego de vetores virais portando sequências exógenas não virais. Em um exemplo clássico e pioneiro, English et al. (1996) introduziram no genoma do *Potato virus X* (PVX) a região codificadora da enzima bacteriana β -glucuronidase (gene *uidA*) e observaram que o vírus recombinante era capaz de infectar plantas de tabaco selvagem, mas não plantas transgênicas de tabaco nas quais o gene *uidA* estava silenciado pós-transcricionalmente. Cabe ressaltar que o PVX é um vírus cujo genoma é constituído por uma molécula de RNA de fita simples, cuja replicação é exclusivamente citoplasmática, e que o gene *uidA* não apresenta homologia com o genoma da planta. Tais ensaios permitiram estabelecer que o PTGS não era um fenômeno induzido pela exclusiva introdução e expressão de um transgene, como inicialmente observado em petúnias, e corroboraram a constatação de que a degradação do RNA alvo ocorria essencialmente no citoplasma. Estudos posteriores demonstraram que o PTGS também se manifestava quando sequências homólogas a genes endógenos eram introduzidas em vetores virais, e esses inoculados em plantas não transgênicas (Ruiz et al., 1998a). As investigações com tal abordagem foram importantes, pois, além de demonstrarem que o PTGS e a resistência mediada por RNA eram funcionalmente equivalentes, evidenciaram que os vírus são indutores e alvos do PTGS. Nesse cenário, a descoberta de que os vírus codificam proteínas supressoras de silenciamento, as quais serão abordadas em capítulo específico do presente livro, constituiu um fato preponderante para sedimentar o papel do silenciamento por RNA na defesa antiviral.

Ainda na década de 90, experimentos empregando como modelo o fungo filamentoso *Neurospora crassa* evidenciaram que a ocorrência do silenciamento mediado por RNA (ou PTGS) não era um fenômeno restrito às plantas. Em 1992, Romano e Macino verificaram que a introdução de cópias extras do gene *albino-1* (*al-1*) em *N. crassa* determinava o aparecimento de colônias (30%) com fenótipo semelhante ao observado em linhagens do fungo em que o gene *al-1* se encontrava mutado. O gene *al-1* é essencial à síntese de carotenoides e confere ao fungo uma coloração tipicamente alaranjada. O paradoxal fenótipo branco (ou amarelo pálido) observado pelos autores foi associado a um fenômeno de silenciamento gênico denominado *quelling* (repressão em inglês), que, do ponto de vista molecular, apresentava um mecanismo de ação similar àquele observado na cossupressão em plantas: ocorrência de degradação citoplasmática dos transcritos apresentando similaridade de sequência ao transgene, resultando em um silenciamento gênico pós-transcricional (revisto em Fulci e Macino, 2007). Ou seja, o *quelling* era funcionalmente relacionado ao PTGS. Ensaio adicionais demonstraram que sequências gênicas não transcritas, tais como promotores e sequências regulatórias, não eram capazes de induzir o *quelling*, e que este era totalmente reversível (Cogoni et al., 1996). A descoberta de sua reversibilidade foi imprescindível para viabilizar

a identificação de mutantes defectivos nesse processo (Cogoni e Macino, 1997), abordagem que culminou na identificação do primeiro gene (denominado *qde-1* para *quelling defective*) diretamente envolvido no silenciamento mediado por RNA. Esse gene codifica uma “RNA polimerase dependente de RNA (RdRP)”, cuja essencialidade na manifestação do silenciamento por RNA em outros organismos foi posteriormente demonstrada (Mourrain et al., 2000; Dalmay et al., 2000).

Resultados similares aos observados em *N. crassa* também foram evidenciados no ciliado unicelular *Paramecium*. Nesse caso, constatou-se que a injeção no núcleo somático de múltiplas cópias de um DNA plasmidial portando a região codificadora de determinado gene alvo conduzia a um silenciamento sequência-específico do gene endógeno (Ruiz et al., 1998b).

A compreensão do mecanismo de ação do silenciamento por RNA teve um grande impulso com duas importantes publicações usando *Caenorhabditis elegans* como modelo. A primeira relatava resultados intrigantes obtidos quando a técnica de RNA antissenso foi utilizada para investigar a função do gene *par-1* nesse nematoide (Guo e Kemphues, 1995). Essa metodologia permite silenciar a expressão de determinado gene pela introdução, no organismo, de moléculas de RNA de polaridade negativa (antissenso) complementares ao RNA mensageiro do gene alvo. Nesse estudo, entretanto, os autores verificaram que tanto as moléculas de RNA antissenso como as moléculas de RNA senso eram capazes de silenciar o gene em estudo, sendo tal efeito também observado quando ambas eram associadas. Embora nenhuma explicação plausível tenha sido apresentada pelos autores para justificar o efeito observado, uma das hipóteses aventadas referia-se à real composição das amostras de RNA usadas nos ensaios. Tais preparações poderiam conter, por exemplo, moléculas aberrantes de RNA, ou então moléculas de RNA de dupla fita (dsRNA), que seriam capazes de induzir o silenciamento gênico detectado de maneira inesperada nos ensaios. Essa possibilidade foi elegantemente investigada por Fire et al. (1998), que comprovaram a ocorrência de um efeito sinérgico sobre a expressão de diferentes genes alvo quando moléculas de RNA senso e antissenso eram injetadas simultaneamente em *C. elegans*. Nessa publicação, os autores mencionam que uma interferência potente e específica na função gênica acontecia quando moléculas de dsRNA homólogas ao gene alvo eram injetadas no nematoide. Consequentemente, uma redução na acumulação de transcritos do gene alvo em resposta à presença de dsRNA era constatada. Tal efeito, porém, não era observado quando tais moléculas eram dirigidas contra regiões promotoras ou introns, associando o silenciamento à necessidade de transcrição da sequência alvo. Em função dessas observações, os autores denominaram tal fenômeno de interferência mediada por RNA ou simplesmente RNAi.

Experimentos subsequentes realizados pelo mesmo grupo demonstraram que o silenciamento gênico proporcionado pela RNAi ocorre de maneira pós-transcricional, já que nenhuma alteração na sequência primária de DNA do gene alvo era observada, e que a acumulação de transcritos do gene alvo no citoplasma era eliminada (Montgomery et al., 1998). Segundo modelo pioneiro proposto na referida publicação, as moléculas de dsRNA seriam responsáveis por acionar um mecanismo pós-transcricional de silenciamento gênico. Uma vez presentes no contexto celular, essas moléculas ativariam um complexo proteico hipotético que seria responsável por localizar o RNA celular alvo por homologia de sequência, acionando a sua degradação por meio de uma atividade endonucleolítica seguida de uma atividade exonucleolítica (Montgomery e Fire, 1998). Com base nesse modelo e no mesmo período, o suposto envolvimento das moléculas de dsRNA no desencadeamento do silenciamento gênico foi amplamente demonstrado em outros organismos, como em plantas com fenótipo

Cópia gratuita - venda proibida

de cossupressão (Voinnet et al., 1998), em drosófila (Kennerdell e Carthew, 1998) e em *Trypanosoma brucei* (Ngô et al., 1998), sugerindo tratar-se de um mecanismo ancestral de regulação da expressão gênica. Curiosamente, um possível papel das moléculas de dsRNA na regulação da expressão gênica já havia sido antecipado por outros autores muitos anos antes (Davidson e Britten, 1979; Schmidt et al., 1986).

O demonstrado envolvimento das moléculas de dsRNA no acionamento do silenciamento gênico em diferentes organismos permitia explicar, por exemplo, a razão pela qual os vírus seriam indutores e alvos do PTGS. Sabe-se que os vírus acumulam grande quantidade de intermediários de replicação na forma de dsRNA, os quais, conseqüentemente, desencadeariam o silenciamento viral ou do gene endógeno a ele associado. Da mesma maneira, a referida implicação do dsRNA na ativação do silenciamento viria a consolidar a hipótese formulada por Metzloff et al. (1997), na qual a acumulação de moléculas de dsRNA derivadas de regiões complementares do transgene, ou de cópias inseridas em orientação invertida, seria responsável pela cossupressão do gene *chs* observada em petúnias (Figura 2).

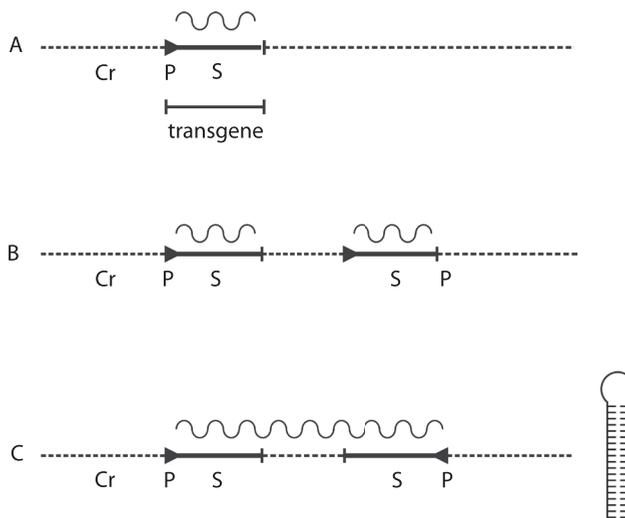


Figura 2. Base molecular da cossupressão. A integração dos transgenes ocorre de maneira aleatória no genoma. Em muitos casos, apenas uma única cópia se integra no cromossomo (A); em outros casos ocorre a integração de várias cópias (B). A administração de um número excessivo de cópias durante o processo de transgenia aumenta as chances de inserções próximas e invertidas no genoma (C), cuja transcrição ininterrupta gera dsRNAs. Setas: promotores (P). Linhas retas contínuas: região codificadora do gene (S - senso). Linhas onduladas: transcrito. Cr: cromossomo..

Com a obtenção e caracterização de mutantes defectivos em RNAi, a relação entre a interferência por RNA (silenciamento gênico induzido por moléculas de dsRNA) e a cossupressão (silenciamento induzido pela introdução de um transgene) pôde ser estabelecida em *C. elegans* (Ketting e Plasterk, 2000). Esses autores constataram que tais mutantes também eram resistentes à cossupressão induzida pela introdução de cópias adicionais de genes endógenos no nematoide, fato que sugere a utilização por ambos de um maquinário celular

comum. Os autores propuseram ainda que, nos dois fenômenos, a degradação do RNA alvo seria dirigida por uma molécula de RNA antissenso com similaridade de sequência ao alvo.

O mencionado envolvimento de uma molécula guia de RNA antissenso no reconhecimento da molécula alvo a ser degradada já vinha sendo proposto desde 1999, quando Hamilton e Baulcombe demonstraram experimentalmente a existência de pequenas moléculas de RNA senso e antissenso em plantas com PTGS. Essas moléculas, com aproximadamente 25 nucleotídeos (nt), se acumulavam em linhagens em que o PTGS fora induzido pela infecção viral bem como pela introdução de transgenes (ou seja cossuprimidas), mas não em linhagens não silenciadas. Por tal característica, essas moléculas foram reconhecidas como determinantes de especificidade do PTGS, mas só tiveram sua função estabelecida quando Hammond et al. (2000) demonstraram a existência, em extratos de células de drosófila transfectadas com moléculas de dsRNA, de um complexo enzimático (denominado RISC para *RNA-induced silencing complex*) dotado de uma atividade nuclease capaz de degradar especificamente transcritos cognatos (*i.e.*, similares em sequência) às moléculas indutoras. Uma vez parcialmente purificada, verificou-se que essa nuclease encontrava-se associada a pequenas moléculas de RNA de aproximadamente 25 nt homólogas ao transcrito do gene alvo. Segundo os autores, essas moléculas seriam funcionalmente associadas àquelas observadas em plantas, sugerindo uma possível atuação como moléculas guias do referido complexo, fornecendo, desta maneira, especificidade ao sistema.

O fato do silenciamento por RNA ser capaz de se propagar de célula a célula e se tornar sistêmico em plantas e nematoides foi outra grande contribuição desse período. Em plantas, experimentos empregando a técnica de enxertia demonstraram que o silenciamento podia ser transmitido de um porta-enxerto, silenciado para um dado transgene, para enxertos não silenciados portando o mesmo transgene (Palauqui et al., 1997). Esses resultados foram corroborados com o emprego de genes repórteres, tanto em plantas como em *C. elegans*, e apontavam para a existência de um sinal sistêmico de propagação (Voinnet e Baulcombe, 1997; Voinnet et al., 1998; Timmons e Fire, 1998; Timmons et al., 2001). Embora a natureza de tal sinal sistêmico ainda seja motivo de controvérsia, evidências obtidas em plantas sugerem o envolvimento de pequenos RNAs de fita simples e seus precursores nesse processo (revisto em Melnyk et al., 2011). Em *C. elegans*, um gene (denominado *Sid1* para *systemic RNA interference deficient*) implicado funcionalmente no transporte desse sinal entre células, porém totalmente dispensável para iniciar ou manter o silenciamento, foi identificado (Winston et al., 2002). Adicionalmente, o caráter herdável do silenciamento por RNA também foi evidenciado em *C. elegans*, já que, uma vez induzido por moléculas de dsRNA em um determinado indivíduo, ele é mantido em sua progênie (Grishok et al., 2000).

Nessa fase, o uso de sistema livre de células (*cell-free system*; *wheat germ extract*; *plant embryo extract*) foi determinante para dissecar as bases moleculares e bioquímicas do silenciamento por RNA (Tuschl et al., 1999; Tang et al., 2003). Foi pelo emprego de um desses sistemas de análise *in vitro* (extratos de embriões de drosófila) que Zamore et al. (2000) demonstraram que, durante o silenciamento, as moléculas indutoras de dsRNA eram processadas em moléculas menores (de 21 a 23 nt) ao mesmo tempo que o RNA alvo era clivado em intervalos de 21 a 23 nt. Com base nesses resultados, os autores propuseram um modelo em que as moléculas de 21 a 23 nt derivadas do processamento do dsRNA atuariam como moléculas guias e seriam responsáveis por recrutar o complexo RISC para junto do RNA alvo a ser clivado, e que este, por sua vez, seria reconhecido pelo seu pareamento com tais moléculas guias. Essas pequenas moléculas efetoras seriam, portanto, funcionalmente

similares àquelas observadas em plantas por Hamilton e Baulcombe em 1999, sendo então denominadas de *small interfering RNAs* (siRNA). É importante ressaltar aqui que o tamanho dos siRNAs gerados pelo processamento das moléculas de dsRNAs pode variar de espécie para espécie (21 a 25 nt). Ensaios comprobatórios realizados a seguir demonstraram que moléculas sintéticas de siRNA eram suficientes para induzir RNAi *in vitro* (Elbashir et al., 2001a, b, c) e *in vivo* (McCaffrey et al., 2002) na ausência de dsRNA, consolidando assim o papel dos siRNAs como direcionadores da degradação do RNA alvo (Schwarz et al., 2002).

Com o avanço das investigações, os componentes da via do silenciamento por RNA iam sendo desvendados e as lacunas ainda existentes, preenchidas experimentalmente. Nesse contexto, o uso de mutantes foi essencial para comprovar a inter-relação entre todos os fenômenos de silenciamento descritos até aqui em diferentes modelos, o que, por consequência, permitiu evidenciar o emprego de um conjunto comum de componentes (revisto em Bernstein et al., 2001b). Nesse cenário, um ano após a elucidação do papel dos siRNAs, a enzima responsável pela clivagem das moléculas de dsRNA foi identificada bioquimicamente (Bernstein et al., 2001a), com posterior confirmação genética em diferentes organismos (Grishok et al., 2001; Ketting et al., 2001; Knight e Bass, 2001). Essa enzima, denominada Dicer, é uma ribonuclease do tipo III que cliva especificamente, em um processo dependente de ATP, moléculas de dsRNA, produzindo moléculas de menor tamanho (~21 nt) contendo dois nt protuberantes na extremidade 3'. A Dicer é conservada evolutivamente, apresentando homólogos em fungos, plantas, vermes e animais superiores.

A etapa seguinte consistiu na elucidação dos componentes do complexo RISC, responsável pela parte efetora da via de silenciamento. Estudos bioquímicos demonstraram que uma das subunidades desse complexo de 500 kDa é uma proteína da família Argonauta (denominada AGO2; Hammond et al., 2001) composta estruturalmente por domínios funcionais denominados PAZ (em N-terminal) e PIWI (em C-terminal). O papel primordial das proteínas Argonautas no silenciamento por RNA foi, concomitantemente, evidenciado em estudos genéticos empregando *C. elegans* (gene *rde-1*; Tabara et al., 1999), *Arabidopsis thaliana* (gene *ago1*; Fagard et al., 2000) e *N. crassa* (gene *qde-2*; Catalanotto et al., 2002). Como os membros dessa família também estão envolvidos no controle do desenvolvimento em diferentes espécies, uma correlação entre o silenciamento por RNA e a regulação da expressão de genes envolvidos no controle do desenvolvimento foi sugerida.

Além de AGO2, diversas outras proteínas foram descritas como associadas à RISC, fato que gerou grande controvérsia sobre qual delas estaria efetivamente envolvida na atividade catalítica do complexo. Uma dificuldade adicional advinha da não existência de um domínio nuclease associado a uma das principais candidatas, a já mencionada proteína AGO2. Essa questão começou a ser resolvida quando experimentos empregando preparações mais homogêneas de RISC purificada a partir de extratos de células HeLa humanas (Martinez et al., 2002), ou de células S2 de drosófila (Rand et al., 2004), demonstraram que somente a proteína AGO2 estava associada à atividade catalítica do complexo RISC-siRNA. Esse dado foi corroborado com a resolução da estrutura tridimensional dessa proteína, demonstrando que o domínio PIWI apresenta um enovelamento similar ao de uma RNase H (Song et al., 2003), uma ribonuclease envolvida na degradação das moléculas de RNA presentes em híbridos RNA/DNA. Essa descoberta foi seminal para demonstrar que a atividade catalítica responsável pela clivagem do RNA alvo no silenciamento por RNA (denominada SLICER) era determinada pelo domínio PIWI presente em AGO2. Verificou-se posteriormente que AGO2 também é responsável pela clivagem da fita não guia do siRNA associado a RISC (Rand et al., 2005). Mediante todas estas informações genéticas e bioquímicas, um esboço da via de PTGS pode ser feito (Figura 3).

Cópia gratuita - venda proibida

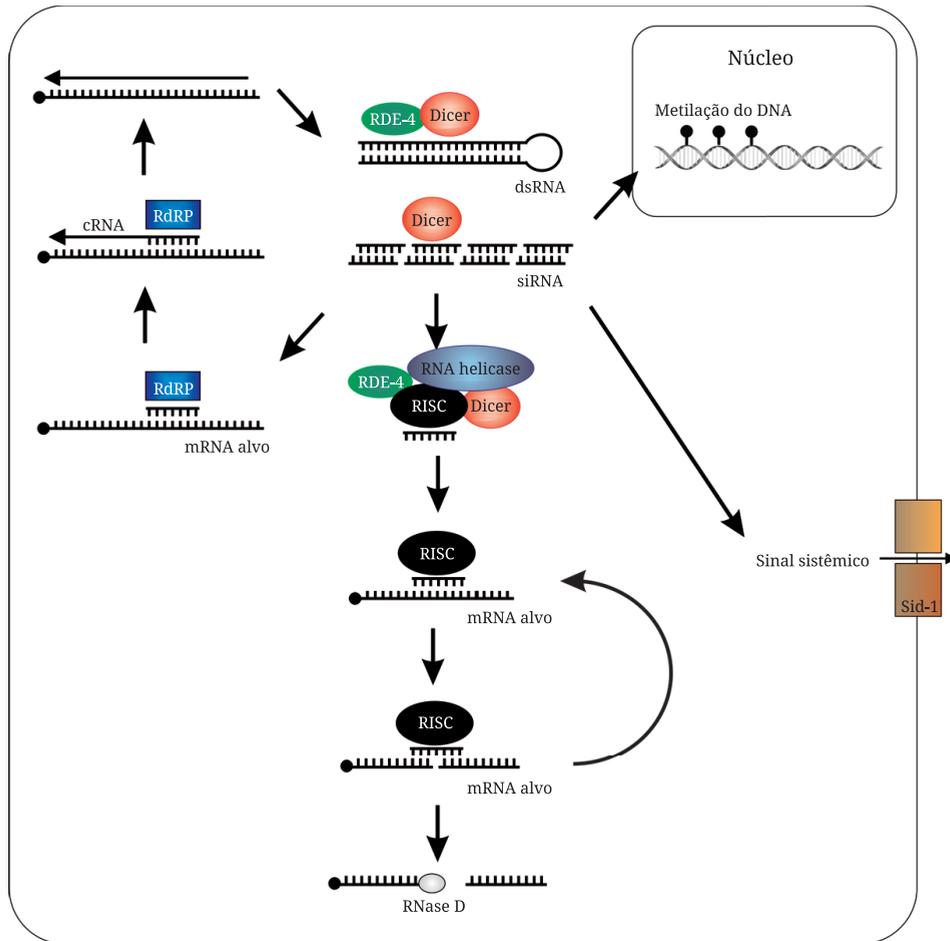


Figura 3. A via de silenciamento gênico pós-transcricional. A ocorrência de dsRNAs em uma célula pode ter diversas origens: replicação viral, mobilização de transposons ou inoculação de moléculas artificiais. Estes dsRNAs são processados por Dicer em siRNAs que podem promover: (i) a clivagem do RNA alvo via RISC; (ii) amplificação de dsRNAs via RdRP; ou (iii) silenciamento gênico transcricional via RITS e/ou RdDM. Uma das fitas do siRNA, denominada fita guia, permanece em RISC para promover o silenciamento gênico pós-transcricional. Uma vez que o RNA alvo tenha sido clivado por *slicer* (o componente central de RISC), exoribonucleases degradam os fragmentos resultantes (5' e 3'). Em plantas e alguns animais, um sinal de sinalização sistêmico é enviado entre as células.

Outra importante faceta do silenciamento por RNA foi evidenciada quando alguns resultados experimentais demonstraram a ocorrência de efeitos nucleares associados a esse fenômeno. Nesse caso, modificações em escala genômica, tais como a ocorrência de metilação no DNA e alterações na cromatina, foram observadas. O primeiro relato do provável envolvimento de moléculas de RNA no direcionamento da metilação de citosinas em sequências homólogas de DNA foi realizado por Wassenecker et al. (1994) em análises empregando plantas infectadas com viroides recombinantes. Nessas plantas, em decorrência da infecção, constatou-se a metilação de sequências endógenas complementares ao RNA genômico do agente infeccioso. Em um estudo posterior, Mette et al. (2000) demonstraram que a metilação do DNA genômico

direcionada pelo RNA requeria moléculas de dsRNA que eram clivadas em pequenas moléculas guias similares àquelas relacionadas com o silenciamento pós-transcricional de ocorrência citoplasmática. Nesse caso, somente sequências de DNA complementares à molécula guia de RNA eram modificadas, indicando uma correlação entre o silenciamento pós-transcricional e a metilação do DNA. Em perfeita sintonia com tal correlação, verificou-se que mutações em genes da maquinaria do PTGS, como nos genes *sgs2* e *ago1* de *Arabidopsis*, resultavam em uma diminuição da metilação do transgene cossuprimido (Fagard et al., 2000). Ainda nos vegetais, observou-se que moléculas de dsRNAs cognatas a regiões promotoras eram capazes de direcionar a metilação *de novo* dos promotores correspondentes, resultando em um silenciamento gênico transcricional (TGS; Aufsatz et al., 2002; Melquist e Bender, 2003). Esse processo de metilação *de novo* foi chamado de *RNA-directed DNA methylation* (RdDM). Em muitos casos, a observada metilação era acompanhada de alterações na estrutura da cromatina junto da região promotora, processo que envolvia a ação de fatores específicos de remodelamento da cromatina. Algum tempo depois, resultados similares aos observados em plantas foram também obtidos em células humanas em cultura, empregando moléculas de siRNA sintéticas como indutores (Morris et al., 2004). Embora esse dado sinalize para a ocorrência e conservação da RdDM em humanos, Park et al. (2004) não foram capazes de evidenciar metilação do DNA genômico quando siRNAs dirigidos contra os exons 1 e 4 do gene *Huntingtin* foram usados.

O elo entre a maquinaria de silenciamento por RNA e a formação da heterocromatina foi estabelecido na levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe*. Num primeiro momento, Volpe et al. (2002) demonstraram que mutações nos componentes da via de silenciamento por RNA determinavam a perda de heterocromatina na região dos centrômeros e provocavam a acumulação de transcritos senso e antissenso originados de suas regiões repetitivas, as quais não são normalmente expressas. Os autores propuseram que tais transcritos seriam responsáveis pela formação de moléculas de dsRNA que, por sua vez, seriam processadas nas moléculas efetoras de siRNA. Uma abordagem bioquímica subsequente permitiu identificar um complexo ribonucleoproteico, contendo os referidos siRNAs, e cuja presença era determinante para o início da formação de heterocromatina junto da região centromérica (Verdel et al., 2004). Esse resultado sugeria que, de forma análoga à RISC, o recém-identificado complexo nuclear (denominado RITS para *RNA-induced transcriptional silencing complex*) se utilizaria de moléculas guias de siRNA para localizar regiões específicas do cromossomo, visando à sua inativação. Para comprovar tal possibilidade, os autores fizeram uso de células nas quais o gene *dcr1* havia sido nocauteado. Nessas células, incapazes de produzir siRNA devido à ausência de Dicer, o complexo RITS não era capaz de localizar a região centromérica e, como consequência, a formação da heterocromatina era abortada (Verdel et al., 2004). Resultados obtidos no mesmo ano demonstraram que o complexo RITS interage com um segundo complexo denominado RDRC (para *RNA-directed RNA polymerase complex*) e o recruta para junto da região em que a heterocromatina deverá ser formada (Motamedi et al., 2004). Foi então estabelecido que o complexo RDRC, dotado de uma RNA polimerase, está envolvido na síntese de dsRNA para posterior produção de siRNA (Sugiyama et al., 2005). De maneira similar ao observado em *S. pombe*, o papel do silenciamento por RNA no direcionamento de modificações sequência-específicas na estrutura da cromatina também foi evidenciado em vários outros organismos. Observou-se ainda que, em *Tetrahymena thermophila*, um mecanismo baseado no silenciamento por RNA estaria envolvido na eliminação de DNA e na reestruturação do genoma desse protozoário ciliado durante o desenvolvimento (revisto em Mochizuki e Gorovsky, 2004).

Cabe ressaltar que a acumulação de conhecimento sobre o silenciamento por RNA e a inequívoca demonstração do papel desempenhado pelas pequenas moléculas de RNA nesse processo culminaram no desenvolvimento de uma nova e revolucionária metodologia de análise genética (técnica de RNAi), cuja robustez foi comprovada em diversos estudos de enfoque acadêmico e/ou terapêutico. Além disso, representou um passo decisivo para que novas classes de pequenos RNAs regulatórios passassem a ser descobertas e caracterizadas. Essas moléculas diferem quanto ao tipo de enzima envolvido na sua biogênese, composição do complexo que executa suas funções regulatórias, mecanismo de regulação e funções biológicas que executam no contexto celular (revisado por Ghildiyal e Zamore, 2009). O reconhecimento final do impacto provocado pelas descobertas relacionadas com o silenciamento por RNA veio com a outorga do prêmio Nobel de Medicina ou Fisiologia de 2006 a Andrew Fire e Craig Mello, dois dos principais pesquisadores da área.

Bibliografia

- Aufsatz, W., Mette, M. F., Van der Winden, J., Matzke, A. J. M. and Matzke, M. 2002. RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16499-16506. PMID:12169664 PMCID:139914. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.162371499>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. 2001a. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366. PMID:11201747. <http://dx.doi.org/10.1038/35053110>
- Bernstein, E., Denli, A. M. and Hannon, G. J. 2001b. The rest is silence. *RNA* 7:1509-1521. PMID:11720281 PMCID:1370194.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. and Cogoni, C. 2002. Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes Dev* 16:790-795. PMID:11937487 PMCID:186333. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.222402>
- Cogoni, C., Irelan, J., Schumacher, M., Schmidhauser, T., Selker, E. and Macino, G. 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J* 15:3153-63. PMID:8670816 PMCID:450258.
- Cogoni, C. and Macino, G. 1997. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10233-10238. PMID:9294193 PMCID:23345. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.19.10233>
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D. C. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101:543-553. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80864-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80864-8)
- Davidson, E. H. and Britten, R. J. 1979. Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. *Science* 204:1052-1059. PMID:451548. <http://dx.doi.org/10.1126/science.451548>
- De Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inzé, D. and Castresana, C. 1992. Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 11:2595-2602. PMID:1378394 PMCID:556734.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl T. 2001a. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200. PMID:11157775 PMCID:312613. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.862301>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. 2001b. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498. PMID:11373684. <http://dx.doi.org/10.1038/35078107>

- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. 2001c. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20:6877-88. PMID:11726523 PMCID:125328. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.23.6877>
- English, J. J., Mueller, E. and Baulcombe, D. C. 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8:179-88. PMID:12239381 PMCID:161090.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C. and Vaucheret, H. 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for posttranscriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11650-11654. PMID:11016954 PMCID:17255. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.200217597>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811. PMID:9486653. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
- Fitch, J. H. and Beachy, R. N. 1993. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu Rev Microbiol* 47:739-763. PMID:8257114. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.003515>
- Fulci, V. and Macino, G. 2007. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Curr Opin Microbiol* 10:199-203. PMID:17395524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.016>
- Ghildiyal, M. and Zamore, P. D. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10:94-108. PMID:19148191 PMCID:2724769. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2504>
- Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T. D., Wernsman, E. A. and Dougherty, W. G. 1996. Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8:95-105. PMID:8597662 PMCID:161084.
- Grishok, A., Tabara, H. and Mello, C. C. 2000. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287: 2494-2497. PMID:10741970. <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5462.2494>
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C. C. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)
- Guo, S. and Kemphues, K. J. 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90082-9](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90082-9)
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952. PMID:10542148. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-6. PMID:10749213. <http://dx.doi.org/10.1038/35005107>
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R. and Hannon, G. J. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293:1146-50. PMID:11498593. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1064023>
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95:1017-1026. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81725-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81725-0)
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. and Plasterk, R. H. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2654-9. PMID:11641272 PMCID:312808. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.927801>
- Ketting, R. F. and Plasterk, R. H. 2000. A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404:296-298. PMID:10749214. <http://dx.doi.org/10.1038/35005113>

Cópia gratuita - venda proibida

- Knight, S. W. and Bass, B. L. 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293:2269-71. PMID:11486053 PMCID:1855227. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1062039>
- Lindbo, J. A. and Dougherty, W. G. 1992. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189:725-733. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90595-G](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(92)90595-G)
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. and Dougherty, W. G. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5:1749-1759. PMID:12271055 PMCID:160401.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. and Tuschl, T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110:563-574. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00908-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00908-X)
- McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. and Kay, M. A. 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418:38-9. PMID:12097900. <http://dx.doi.org/10.1038/418038a>
- Melnyk, C. W., Molnar, A. and Baulcombe, D. C. 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J* 30:3553-3563. PMID:21878996 PMCID:3181474. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.274>
- Melquist, S. and Bender, J. 2003. Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 17:2036-2047 PMID:12893775 PMCID:196257. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1081603>
- Mette, M. F., Aufsatz, W., Van Der Winden, J., Matzke, M. A. and Matzke, A. J. M. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19:5194-5201. PMID:11013221 PMCID:302106. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.19.5194>
- Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P. D. and Flavell, R. B. 1997. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in *Petunia*. *Cell* 88:845-854. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81930-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81930-3)
- Mochizuki, K. and Gorovsky, M. A. 2004. Small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Curr Opin Genet Dev* 14:181-187. PMID:15196465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2004.01.004>
- Montgomery, M. K., Xu, S. and Fire, A. 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15502-15507. PMID:9860998 PMCID:28072. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.26.15502>
- Montgomery, M. K. and Fire, A. 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends in Genetics* 14:255-258. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01510-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01510-8)
- Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E. and Looney, D. J. 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305: 1289-1292. PMID:15297624. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1101372>
- Motamedi, M. R., Verdel, A., Colmenares, S. U., Gerber, S. A., Gygi, S. P. and Moazed, D. 2004. Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell* 119: 789-802. PMID:15607976. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.034>
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayer, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Rémoúé, K., Sanial, M., Vo, T. A. and Vaucheret, H. 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101:533-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80863-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80863-6)
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289. PMID:12354959 PMCID:159885.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. and Ullu, E. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14687-14692. PMID:9843950 PMCID:24510. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.25.14687>

- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16: 4738-4745. PMID:9303318 PMCID:1170100. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.15.4738>
- Park, C. W., Chen, Z., Kren, B. T. and Steer, C. J. 2004. Double-stranded siRNA targeted to the *huntingtin* gene does not induce DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 323:275-280. PMID:15351733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.096>
- Rand, T. A., Ginalski, K., Grishin, N. V. and Wang, X. 2004. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14385-14389. PMID:15452342 PMCID:521941. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405913101>
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. and Wang, X. 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123:621-629. PMID:16271385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.020>
- Romano, N. and Macino, G. 1992. Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6:3343-3353. PMID:1484489. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>
- Ruiz, M. T., Voinnet, O. and Baulcombe, D. C. 1998a. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10:937-46. PMID:9634582 PMCID:144041.
- Ruiz, F., Vayssié, L., Klotz, C., Sperling, L. and Madeddu, L. 1998b. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* 9:931-943. PMID:9529389 PMCID:25319.
- Sanford, J. C. and Johnston, S. A. 1985. The concept of pathogen derived resistance. *J Theor Biol* 113: 395-405. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193\(85\)80234-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193(85)80234-4)
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B. and Zamore, P. D. 2002. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell* 10:537-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00651-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00651-2)
- Schmidt, F. R., Lemke, P. A. and Esser, K. 1986. Viral influences on aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24:248-252. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00261546>
- Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J. and Joshua-Tor, L. 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-1032. PMID:14625589. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb1016>
- Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. and Grewal, S. I. 2005. RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:152-157. PMID:15615848 PMCID:544066. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407641102>
- Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P. and Zamore, P. D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 17:49-63. PMID:12514099 PMCID:195971. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1048103>
- Timmons, L. and Fire, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854. PMID:9804418. <http://dx.doi.org/10.1038/27579>
- Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5)
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P. and Sharp, P. A. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13:3191-3197. PMID:10617568 PMCID:317199. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.13.24.3191>
- Van Blokland, R., Van Der Geest, N., Mol, J. N. M. and Kooter, J. M. 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* 6:861-877. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.6060861.x>
- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. and Stuitje, A. R. 1990. Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-299. PMID:2152117 PMCID:159886.

Cópia gratuita - venda proibida

- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I. and Moazed, D. 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303:672-676. PMID:14704433 PMCID:3244756. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1093686>
- Voinnet, O. and Baulcombe, D. C. 1997. Systemic signaling in gene silencing. *Nature* 389:553. PMID:9335491. <http://dx.doi.org/10.1038/39215>
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, DC. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95:177-187. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81749-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81749-3)
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. and Martienssen, R. A. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi, *Science* 297: 1833-1837. PMID:12193640. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1074973>
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sanger, H. L. 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90119-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90119-8)
- Winston, W. M., Molodowitch, C. and Hunter, C. P. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295:2456-2459. PMID:11834782. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068836>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)

Aplicações da Técnica de RNAi em Plantas

Capítulo

2

Prof. Dr. Vinícius D'Ávila Bitencourt Pascoal¹ e Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia²

¹*Faculdade de Ciências Básicas, Universidade Federal Fluminense*

²*Depto. de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP*

Introdução

Com o rápido aumento da população mundial nas últimas décadas, a necessidade de aumento da produção de alimentos para controlar a desnutrição, fome e a insegurança alimentar (Brown e Funk 2008; Lobell et al., 2008; Godfray et al., 2010) tem aumentado os esforços de pesquisa na utilização de ferramentas de genética molecular, DNA recombinante e biotecnologia na obtenção de plantas mais produtivas, resistentes a doenças e tolerantes a diferentes estresses (Mittler e Blumwald 2010; Tester e Langridge 2010).

As práticas convencionais para o melhoramento vegetal são amplamente utilizadas, porém são extremamente trabalhosas, consomem muito tempo e apresentam várias restrições ecológicas, fisiológicas e biológicas. Assim, as ferramentas de biotecnologia propiciam alterações pontuais, as quais podem gerar cultivares com maior produtividade e valor nutricional, além de mais resistentes a fatores bióticos e abióticos (Sharma et al., 2002).

Devido às vantagens oferecidas pela técnica de interferência por RNA (RNAi) ao utilizar pequenas moléculas de RNA não codificadoras para regular negativamente genes de forma específica, essa ferramenta tem grande potencial para ser usada amplamente na obtenção de plantas com características especiais, tais como: mudanças na arquitetura, melhoramento nutricional, tolerância aos estresses abiótico e biótico, deleção de alergênicos, desenvolvimento de plantas com esterilidade masculina e alterações na produção de metabólitos secundários (revisitos em Jagtap et al., 2011; Ali et al., 2010).

Mudanças na Arquitetura da Planta

Alterações na arquitetura das plantas relacionadas à altura, ramificação dos galhos, crescimento do caule, morfologia das folhas e inflorescência sempre foram alvos do melhoramento convencional ao longo dos séculos por serem fatores limitantes

de diversas características agronômicas importantes, como produtividade e resistência aos estresses ambientais (Khush 1999; Camp 2005; Wang e Li 2006).

Um exemplo de mudança da arquitetura da planta estaria relacionado a alterações no sistema radicular, com o intuito de aumentar a absorção de nutrientes pela distribuição uniforme das raízes no solo, propiciando melhor adaptação das plantas às mudanças climáticas globais (Dorlodot et al., 2007).

Estudos recentes, tanto em plantas modelos (*Arabidopsis* e *Petunia*) como em plantas cultivadas (milho, arroz e tomates), têm ampliado a compreensão das bases moleculares da arquitetura das plantas (Wang e Li 2006, 2008). Novos estudos também têm demonstrado o potencial das técnicas de biologia molecular para a produção de plantas com mudanças na arquitetura, especialmente pela manipulação das vias de síntese de diferentes fito-hormônios.

Os hormônios vegetais, tais como as giberelinas e os brassinosteroides, são os principais reguladores do crescimento longitudinal das plantas, sendo que as alterações na biossíntese destes compostos representam a principal estratégia para modificar a altura das plantas (Coles et al., 1999; Hedden e Phillips, 2000). Com tal perspectiva, demonstrou-se que a técnica de RNAi foi efetiva para suprimir a expressão do gene *OsGA20ox2* de arroz (*Oryza sativa L.*), que codifica uma enzima regulatória da síntese de giberelinas biologicamente ativas (GA). Como resultado, linhagens transgênicas de arroz foram recuperadas com menor produção de GA₁, GA₁₉ e GA₂₀ endógenos, resultando em fenótipo semianão com produtividade estável, se comparado com as plantas de tipo selvagem (Qiao et al., 2007). Na mesma linha, o silenciamento do gene *CKX1* em cevada e trigo culminou em um aumento na quantidade de raízes e na produtividade da planta. O gene *CKX1* codifica uma citocinina oxidase envolvida na degradação das citocininas, hormônio essencial ao desenvolvimento vegetal. Xiong et al. (2005), por sua vez, introduziram em tomate um vetor de silenciamento capaz de gerar RNA de dupla fita (dsRNA) contra o gene que codifica a ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) oxidase, inibindo assim a síntese de etileno, importante no processo de maturação. As plantas transgênicas geraram frutos que terão uma vida mais longa nas prateleiras dos supermercados.

Em outra abordagem, a técnica de RNAi foi utilizada para suprimir a expressão do gene *OsGLU1*, que codifica uma endo-1,4-beta-D-glucanase ligada à parede celular de arroz (*Oryza sativa L.*). Como resultado, observou-se uma redução no alongamento das células devido a alterações estruturais e de composição da parede celular, e uma consequente diminuição da distância dos entrenós, levando a planta a desenvolver um fenótipo anão (Zhou et al., 2006).

Em suma, a indução de mudanças na arquitetura das plantas tem grande potencial para gerar plantas com biótipos considerados “ideais”, minimizando assim os problemas advindos de uma arquitetura inadequada que tenha reflexos negativos sobre a produção e comercialização.

Melhoramento Nutricional

Aproximadamente 40% da população mundial apresenta algum tipo de desnutrição (Tucker, 2003). Como grande parte da dieta humana é baseada no consumo de vegetais e grãos, o enriquecimento da qualidade nutricional dos alimentos mais consumidos poderia auxiliar a solucionar este problema. Embora até o momento os métodos convencionais de melhoramento tenham gerado resultados significativos para o aumento da qualidade

nutricional dos alimentos, esses tendem a ser limitados pela baixa disponibilidade de recursos genéticos naturais para as espécies de interesse (Tang et al., 2007; Hirschi, K. 2008).

Com os avanços das técnicas de biologia molecular e biotecnologia, as possibilidades para a manipulação de vias metabólicas específicas, visando adequar/melhorar o valor nutricional dos alimentos, são ilimitadas. Exemplos incluem: modificação de vias metabólicas relacionadas com a composição de ácidos graxos; aumento dos níveis de antioxidantes particularmente os carotenoides, licopeno e flavonoides (Tucker, 2003).

Neste contexto, a tecnologia de RNAi oferece uma alternativa interessante para aplicação em processos de engenharia metabólica que resultem no desenvolvimento de alimentos biofortificados. A obtenção de plantas de algodão modificadas para alterar a composição de ácidos graxos do óleo, pelo silenciamento de genes-chave da via de dessaturação dos ácidos graxos nas sementes, representa um exemplo prático desta aplicação. O emprego de tal metodologia resultou em aumento do nível de ácido esteárico de 2% a 3% para 40% nas sementes das plantas silenciadas (Liu et al., 2002). Com o silenciamento de outro gene alvo, o teor de ácido oleico foi aumentado em até 77%, em comparação com aproximadamente 15% em sementes de plantas não transformadas (Liu et al., 2002). Uma estratégia semelhante foi usada para gerar grãos de milho com elevados teores de lisina, pela supressão específica de uma proteína de reserva (alfazeína de 22 kDa) presente no endosperma (Segal et al., 2003).

A técnica de RNAi também foi usada para melhorar o conteúdo de β -carotenos em batata pelo silenciamento do gene que codifica a enzima β -carotenoide hidroxilase (BCH), que converte o β -carotenoide em zeaxantina. Neste caso, foram usados dois cassetes de silenciamento, um para expressar dsRNA diretamente nos tubérculos, e um segundo para expressão constitutiva. As linhagens transformadas com o cassete contendo o promotor tubérculo-específico apresentaram um teor mais elevado de β -caroteno em comparação ao controle não transformado, demonstrando que o silenciamento do gene *BCH* tem grande potencial para promover uma melhora na qualidade nutricional da batata (Eck et al., 2007).

Nunes et al. (2006) demonstraram que o silenciamento do gene que codifica a enzima mio-inositol-1-fosfato (GmMIPS1) pode ser uma estratégia válida para reduzir significativamente o conteúdo de fitato (em até 94,5% em determinadas linhagens) em sementes de soja, aumentando assim a disponibilidade de fosfato assimilável. No entanto, neste caso, um efeito sobre o desenvolvimento das sementes foi observado. Uma síntese melhorada de amido, pelo silenciamento de dois genes codificadores de enzimas envolvidas na ramificação deste composto (Starch Braching Enzyme – SBE), foi relatada em linhagens silenciadas de trigo (Regina et al., 2006). Um fenótipo de alto conteúdo de amilose nos grãos foi observado quando os genes *SBE IIa* e *SBE IIb* foram silenciados simultaneamente. Similarmente, linhagens de cevada com baixa expressão de SBE IIa e IIb apresentaram teores elevados de amilose, gerando alto conteúdo de amido resistente (Regina et al., 2010).

Em estudos realizados com tomates, foi possível aumentar o conteúdo de carotenoides e flavonoides através do silenciamento fruto-específico do gene *DET1* (DE-ETIOLATED1), que regula diferentes vias de sinalização controladas por luz. Curiosamente, não foram observadas mudanças na produtividade e na qualidade dos frutos das linhagens silenciadas (Davuluri et al., 2005). Esse resultado demonstra que o *knockdown* de um gene regulatório essencial é capaz de modificar o conteúdo de metabólitos gerados a partir de vias metabólicas independentes. O incremento observado é de grande valia, já que esses fitoquímicos são conhecidos por beneficiar a saúde humana, sendo o tomate a principal fonte de carotenoides e flavonoides (Miller et al., 2002; Ross et al., 2002).

Tolerância aos Estresses Abióticos

Fatores abióticos ambientais, tais como salinidade, alterações de temperatura, inundação e seca são responsáveis por diminuições consideráveis na produtividade. A prospecção e caracterização funcional dos genes responsáveis pela resistência a estas condições, utilizando genômica funcional e outras metodologias, têm fornecido bases sólidas para melhorar a resposta das plantas a tais estresses (Cushman e Bohnert 2000; Pardo 2010). Neste cenário, os estudos funcionais com microRNAs (miRNAs) têm demonstrado que estes apresentam papéis regulatórios importantes na resposta das plantas a vários fatores abióticos. Por exemplo, Sunkar e Zhu (2004) relataram que o miR393 é superexpresso quando plântulas de *Arabidopsis thaliana* são expostas ao frio, desidratação, salinidade elevada ou tratamento a ácido abscísico. Além deste, os miRNAs miR319c, miR389a, miR397b e miR402 também foram responsivos a diferentes tipos de estresse abióticos aplicados em diferentes níveis neste estudo. MicroRNAs relacionados à resistência a estresses também foram identificados em arroz (Jian et al., 2010). Como em plantas, a maioria das famílias de miRNAs é conservada evolutivamente, a manipulação da expressão de determinados miRNAs abre perspectivas interessantes para a obtenção de plantas de importância comercial com maior tolerância a determinados estresses.

Por outro lado, a supressão da expressão de genes que modulam negativamente a resposta da planta aos estresses tem contribuído para a obtenção de linhagens mais tolerantes aos mais variados estresses ambientais. Plantas transgênicas de arroz, nas quais a expressão do gene *RACK1* (receptor for activated C-kinase 1) foi reduzida por RNAi, por exemplo, apresentaram maior resistência à seca. Este efeito foi atribuído ao fato de o referido receptor estar implicado na regulação negativa do sistema redox, associado com a tolerância ao estresse hídrico (Da-Hong et al., 2009). Em outro estudo, empregando a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, Zhao et al. (2011) demonstraram que o silenciamento do gene *PLDys* aumenta a tolerância das plantas aos efeitos tóxicos do alumínio. *PLDys* codifica uma fosfolipase que catalisa a hidrólise de fosfolípidos alterando a composição da membrana celular bem como sua permeabilidade ao Alumínio.

Tolerância aos Estresses Bióticos

Os estresses bióticos são causados por insetos, nematoides e patógenos (vírus, bactérias e fungos), os quais causam diminuição da produtividade das culturas, influenciando a produção agrícola total. As infecções virais são responsáveis por grande parte das perdas de produção, pois os vírus apresentam várias estratégias para se multiplicar e propagar de planta para planta, tanto de forma direta quanto indireta (usando vetores como insetos); permanecendo os fungos na segunda colocação em importância.

Atualmente, várias metodologias de controle desses patógenos têm sido desenvolvidas utilizando abordagens ecologicamente corretas, diminuindo assim o uso do controle químico, geralmente pouco aceito pelos consumidores. Dentre as diferentes abordagens, as mais comuns procuram aumentar a resistência da planta, empregando material genético derivado do próprio patógeno (resistência derivada do patógeno). As estratégias empregando RNAi, por sua vez, visam impedir a manifestação da doença, empregando plantas transgênicas capazes de expressar moléculas ativadoras de silenciamento, dirigidas contra genes específicos do patógeno ou da planta hospedeira (Shepherd et al., 2009; Fairbairn et al., 2007), sendo inúmeros os exemplos desta aplicação disponíveis na literatura.

A expressiva maioria dos vírus que infectam plantas possui um genoma composto por uma molécula de RNA de polaridade positiva e se replica através de moléculas intermediárias de dsRNA. Desta forma, são fortes indutores e alvos de RNAi. Contudo, os vírus desenvolveram mecanismos de supressão do silenciamento mediado por RNA, viabilizando assim a infecção do hospedeiro. Esse conhecimento foi utilizado por Waterhouse et al. em 1998 para demonstrar, como prova de conceito, que a expressão de dsRNA contra um gene alvo do vírus Y da batata (PVY) gera plantas de tabaco imunes ao vírus (Waterhouse et al., 1998).

Estratégia semelhante foi usada em uma linhagem comercial de batata, e, após serem transformadas para expressar um dsRNA contra a região 3' não codificadora do gene que codifica a proteína da capa do PVY, as plantas transgênicas selecionadas mostraram-se resistentes à três cepas de PVY (PVY^N, PVY^O e PVY^{NTN}). Por outro lado, infecções mistas com o vírus X da batata (PVX) não alteraram a resistência de tais plantas ao PVY (Missiou et al., 2004). Atualmente, as construções utilizadas para indução do silenciamento usando dsRNA combinam sequências de diferentes espécies virais, permitindo assim a obtenção de plantas resistentes a múltiplas infecções. A viabilidade de tal estratégia foi demonstrada recentemente em soja, na qual a resistência à infecção simultânea por três espécies virais foi observada (Zhang et al., 2011).

Utilizando outra abordagem, tendo como alvo genes do hospedeiro, Rodríguez-Hernández et al. (2012) silenciaram o gene que codifica o fator de iniciação da tradução eIF4E, conhecido importante para a multiplicação de vários vírus, e obtiveram plantas de melão altamente resistentes a uma ampla gama de espécies virais economicamente importantes.

Além do controle viral, relatos de uso bem sucedido da técnica de RNAi no controle de doenças fúngicas também são encontrados na literatura. Hernández et al. (2009), por exemplo, silenciaram o gene que codifica a enzima glutatona S-transferase (GST) em tabaco e aumentaram a resistência da planta ao fungo *Phytophthora parasitica var. nicotianae*. Com base nos resultados obtidos, os autores sugerem que a GST é um regulador negativo da resposta de defesa da planta a patógenos.

Os nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.) são parasitas presentes no solo que causam danos graves às plantas cultivadas, já que drenam os seus nutrientes e afetam o seu desenvolvimento. Vários genes identificados como tendo suas proteínas expressas na glândula esofágica do nematoide são descritos como essenciais para que o parasitismo tenha sucesso. Neste contexto, a ideia de gerar plantas transgênicas capazes de expressar moléculas de dsRNA para induzir o silenciamento de tais genes, perturbando assim o metabolismo e a sobrevivência do parasita, tem ampla aplicabilidade no desenvolvimento de cultivares com resistência ampla aos nematoides de galha (Huang et al., 2006).

Usando uma estratégia similar, mas visando insetos, Mao et al. (2011) geraram plantas transgênicas de algodão capazes de expressar um dsRNA dirigido contra um gene (*CYP6AE14*) da praga *Helicoverpa armigera*, cujo produto viabiliza a sua alimentação em dietas contendo gossipol, um composto secundário com atividade repelente e tóxica a insetos. O gene *CYP6AE14* codifica uma mono-oxigenase que permite a este lepidóptero se alimentar do algodoeiro e tolerar níveis elevados de gossipol. As plantas transgênicas de algodão foram significativamente menos afetadas pelo ataque das lagartas que o controle não transgênico. Resultados semelhantes foram obtidos para controle de um coleóptero (*Diabrotica virgifera virgifera*) que ataca as raízes de milho. Plantas transgênicas de milho, expressando um dsRNA contra um gene que codifica uma ATPase do inseto (V-ATPase A), e cuja letalidade

foi testada em dieta artificial, apresentaram baixíssimo dano nas raízes em comparação a plantas não transformadas (Baum et al., 2007).

Deleção de Alergênicos

Não são raros os casos de alergias devido à hipersensibilidade a diferentes componentes dos alimentos, normalmente proteínas que causam fortes respostas imunológicas, geralmente mediadas por imunoglobulinas E (IgE) (Johansson et al., 2004). Apesar de a maioria causar sintomas leves e facilmente controlados, em poucos casos, a resposta pode ser exacerbada, podendo ser até fatal. Apesar de não haver cura para as alergias alimentares, a identificação e eliminação dos principais alérgenos associados a determinados alimentos empregando processos biotecnológicos representa uma saída interessante para possibilitar a utilização destes na dieta de pessoas sensíveis.

Existem oito tipos de alimentos que são responsáveis por até 90% dos casos de alergias, sendo eles: amendoim, nozes (nozes, castanha do Brasil, castanha de caju, etc.), soja, trigo, leite, ovos, peixes e mariscos (Zuidmeer et al., 2008; Sicherer e Sampson, 2010). Plantas transgênicas, utilizando a técnica de RNAi, foram desenvolvidas para minimizar os efeitos alergênicos de algumas espécies cultivadas na população em geral. Por exemplo, Herman et al. (2003) utilizaram a técnica de RNAi em soja para evitar o acúmulo da proteína P34, que é o principal alérgeno presente nas sementes de soja. A eliminação deste alérgeno não provocou alterações estruturais ou na composição proteica das sementes transgênicas quando comparadas com as sementes controle.

A alergia ao amendoim (*Arachis hypogaea L.*) é uma das mais sérias e problemáticas. A tecnologia de RNAi foi utilizada nesta espécie para aliviar a resposta alérgica exacerbada determinada pelo produto do gene *Ara h 2*, uma glicoproteína imunodominante e causadora de mais de 85% das reações alérgicas do amendoim. As plantas de amendoim transgênico foram transformadas usando *A. tumefaciens*, contendo um cassete de silenciamento capaz de gerar um hpRNA (hairpin RNA) contra o gene *Ara h 2*. A alergenicidade das sementes de amendoim livres de *Ara h 2* foi avaliada por ELISA, e uma redução significativa do potencial alergênico de tais sementes foi observada (Dodo et al., 2008).

Alteração da Produção de Metabólitos Secundários

Desde os tempos remotos, as plantas têm sido utilizadas pela humanidade em função dos seus efeitos terapêuticos, contra doenças infecciosas e parasitárias, problemas crônico-degenerativos, emagrecimento, regulação da menstruação, procedimento abortivo, além de serem empregadas também como antídoto ao veneno de cobra (Garcia, 1995).

Os metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especiais, são produzidos pelos vegetais, que podem acumular inúmeras substâncias que não são diretamente responsáveis pela manutenção da vida do organismo, mas garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema. Essas substâncias podem apresentar atividades farmacológicas (ou comporem a base para a produção de medicamentos), sendo usadas também como fragrâncias, pigmentos aditivos alimentares e pesticidas. Entre os anos de 1981 e 2002, 28% dos medicamentos disponibilizados no mercado possuíam princípios ativos isolados de produtos naturais ou produtos de semisíntese, e 24% eram fármacos sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais (Newman et al., 2000, 2003). Na classe dos medicamentos anticancerígenos, por exemplo, um terço do mercado

em 2002 foi representado por apenas dois grupos de quimioterápicos derivados de produtos naturais: os taxanos e os derivados da camptotecina (Thayer et al., 2003; Oberlis e Kroll, 2004; Chin et al., 2006).

Em função de sua importância, alguns pesquisadores já buscam alterar a produção desses metabólitos usando RNAi. O objetivo é aumentar o rendimento da substância com atividade farmacológica pelo silenciamento de genes que suprimem a produção dos metabólitos secundários, ou inibir as vias alternativas que diminuem a concentração destes. Essa abordagem é possível graças à possibilidade de se silenciar inúmeros genes da mesma via metabólica empregando RNAi (Gomez-Galera et al., 2007; Borgio 2009).

Com tal perspectiva, Allen et al. geraram em 2004 uma planta transgênica de ópio (*Papaver somniferum L.*), cujo silenciamento do gene que codifica a codeína redutase, propiciou um aumento na acumulação da (s)-reticulina, um composto-chave na produção de alguns alcaloides em plantas, tais como codeína e morfina. Em um trabalho similar de engenharia metabólica, a via de síntese de flavonoides em tabaco foi modificada pelo silenciamento do gene *FLS* (que codifica uma flavonol sintase) para aumentar a produção de catequina (51% a 93%) e epicatequina (18% a 27%), dois potentes antioxidantes (Mahajan et al., 2012).

A batata (*Solanum tuberosum L.*) tem sido amplamente utilizada como biorreator para produção de proteínas humanas, porém algumas proteínas de reserva presentes no tubérculo dificultam a purificação das proteínas recombinantes. Para sanar esse problema, foi obtida uma planta transgênica de batata em que a expressão dessas glicoproteínas endógenas foi silenciada por RNAi, facilitando e barateando a purificação das proteínas humanas, e tornando a batata um sistema de expressão mais eficiente (Kim et al., 2008).

De maneira geral, as técnicas que possibilitam o incremento da produção do metabólito de interesse, ou a diminuição da produção de um metabólito que influencia e dificulta a purificação do metabólito farmacologicamente ativo, podem ser de extrema importância no desenvolvimento e produção de medicamentos e insumos para saúde baseados em produtos naturais.

Bibliografia

- Ali, N., Datta, S. K. and Datta, K. 2010. RNA interference in designing transgenic crops. *GM Crops* 1(4):207-13. PMID:21844675. <http://dx.doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13344>
- Allen, R. S., Millgate, A. G., Chitty, J. A., Thisleton, J., Miller, J. A. C., Fist, A. J., Gerlach, W. L. and Larkin, P. J. 2004. RNAi mediated replacement of morphine with the non-narcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat Biotechnol* 22:1559-66. PMID:15543134. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1033>
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. and Roberts, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol.* 25:1322-1326. PMID:17982443. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1359>
- Borgio, J. F. 2009. RNA interference (RNAi) technology: a promising tool for medicinal plant research. *J Medicinal Plant Res* 3:1176-1183.
- Brown, M. E. and Funk, C. C. 2008. Climate: food security under climate change. *Science* 319:580-581. PMID:18239116. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1154102>
- Camp, W. V. 2005. Yield enhancement genes: seeds for growth. *Curr Opin Biotechnol* 16:147-153. PMID:15831379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.002>
- Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B. and Kinghorn, D. 2006. Drug discovery from natural sources. *AAPS J*8:239-253.

- Coles, J. P., Phillips, A. L., Croker, S. J., Garcia-Lepe, R., Lewis, M. J. and Hedden, P. 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* 17:547-556. PMID:10205907. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00410.x>
- Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3:117-124. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00052-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00052-7)
- Da-Hong, L., Hui, L., Yan-li, Y., Ping-ping, Z. and Jian-sheng, L. 2009. Downregulated expression of RACK1 gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice. *Rice Sci* 16:14-20. [http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6308\(08\)60051-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6308(08)60051-7)
- Davuluri, G. R., Van Tuinen, A., Fraser, P. D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D. A., King, S. R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P. M., Pennings, H. M. and Bowler, C. 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol* 23(7):890-5. PMID:15951803. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1108>
- Dodo, H. W., Konan, K. N., Chen, F. C., Egnin, M. and Viquez, O. M. 2008. Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. *Plant Biotech J* 6:135-145. PMID:17784907. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00292.x>
- Dorlodo, S., Forster, B., Pages, L., Price, A., Tuberosa, R. and Draye, X. 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* 12:474-481. PMID:17822944. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.012>
- Eck, J. V., Conlin, B., Garvin, D. F., Mason, H., Navarre, D. A. and Brown, C. R. 2007. Enhanced beta-carotene content in potato via RNAi silencing of the beta-carotene hydroxylase gene. *Am J Potato Res* 84:331-342. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02986245>
- Fairbairn, D. J., Cavallaro, A. S., Bernard, M., Mahalinga-Iyer, J., Graham, M. W. and Botella, J. R. 2007. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasitic nematodes. *Planta* 226:1525-1533. PMID:17653759. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-007-0588-x>
- Garcia, E. S. 1995. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. *Cad Saúde Pública* 11:495-500. PMID:12973629. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1995000300025>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. Z., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. and Toulmin, C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327:812-818. PMID:20110467. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1185383>
- Gomez-Galera, S., Pelacho, A. M., Gene, A., Capell, T. and Christou, P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep* 26:1689-1715. PMID:17609957. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-007-0384-x>
- Hedden, P. and Phillips, A. L. 2000. Manipulation of hormone biosynthetic genes in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 11:130-137. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00071-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00071-9)
- Herman, E. M., Helm, R. M., Jung, R. and Kinney, A. J. 2003. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol* 132:36-43. PMID:12746509 PMID:1540313. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.021865>
- Hernández, I., Chacón, O., Rodríguez, R., Portieles, R., Pujol, Y. L. M. and Borrás-Hidalgo, O. 2009. Black shank resistant tobacco by silencing of glutathione S-transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 387:300-304. PMID:19577539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.003>
- Hirschi, K. 2008. Nutritional improvements in plants: time to bite on biofortified foods. *Trends Plant Sci* 13:459-463. PMID:18635389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.05.009>
- Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J. and Hussey, R. S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14302-14306. PMID:16985000 PMID:1570184. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0604698103>
- Jagtap, U. B., Gurav, R. G. and Bapat, V. A. 2011. Role of RNA interference in plant improvement. *Naturwissenschaften* 98(6):473-92. Epub 2011 Apr 19. Review. PMID:21503773. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-011-0798-8>
- Jian, X., Zhang, L., Li, G., Zhang, L., Wang, X., Cao, X., Fang, X. and Zha, F. C. 2010. Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. *Genomics* 95:47-50. PMID:19796675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.08.017>

- Johansson, S. G., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P. S., Lanier, B. Q., Lockey, R. F., Motala, C., Ortega Martell, J. A., Platts-Mills, T. A., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P. and Williams, H. C. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the nomenclature review committee of the world allergy organization. *J Allergy Clin Immunol* 113:832-836. PMID:15131563. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.591>
- Khush, G. S. 1999. Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* 42:646-655. PMID:10464789. <http://dx.doi.org/10.1139/g99-044>
- Kim, Y. S., Lee, Y. H., Kim, H. S., Kim, M. S., Hahn, K. W., Ko, J. H., Joung, H. and Jeon, J. H. 2008. Development of patatin knockdown potato tubers using RNA interference (RNAi) technology, for the production of human-therapeutic glycoproteins. *BMC Biotechnol* 8:36. PMID:18384693 PMID:2335101. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-8-36>
- Liu, Q., Singh, S. P. and Green, A. G. 2002. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated posttranscriptional gene silencing. *Plant Physiol* 129:1732-1743. PMID:12177486 PMID:166761. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.001933>
- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P. and Naylor, R. L. 2008. Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science* 319:607-610. PMID:18239122. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1152339>
- Mahajan, M., Joshi, R., Gulati, A. and Yadav, S. K. 2012. Increase in flavan-3-ols by silencing flavonol synthase mRNA affects the transcript expression and activity levels of antioxidant enzymes in tobacco. *Plant Biol* 14(5):725-733. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00550.x>
- Mao, Y. B., Tao, X. Y., Xue, X. Y., Wang, L. J. and Chen, X. Y. 2011. Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Res* 20:665-673. PMID:20953975 PMID:3090577. <http://dx.doi.org/10.1007/s11248-010-9450-1>
- Miller, E. C., Hadley, C. W., Schwartz, S. J., Erdman, J. W., Boileau, T. W. M., Clinton, S. K. 2002. Lycopene, tomato products, and prostate cancer prevention. Have we established causality? *Pure Appl Chem* 74:1435-1441. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274081435>
- Missiou, A., Kalantidis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M. and Tsagris, M. 2004. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol Breeding* 14:185-19. <http://dx.doi.org/10.1023/B:MOLB.0000038006.32812.52>
- Mittler, R. and Blumwald, E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Ann Rev Plant Biol* 61:443-462. PMID:20192746. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112116>
- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 17: 215-234. PMID:10888010. <http://dx.doi.org/10.1039/a902202c>
- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Nat Prod Rep* 66:1022-1037. PMID:12880330. <http://dx.doi.org/10.1021/np030096l>
- Nunes, A. C., Vianna, G. R., Cuneo, F., Amaya-Farfán, J., De Capdeville, G., Rech, E. L. and Aragão, F. J. 2006. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132. PMID:16395584. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-005-0201-0>
- Oberlis, N. H. and Kroll, D. J. 2004. Camptothecin and taxol: historic achievements in products research. *J Nat Prod* 67:129-135. PMID:14987046. <http://dx.doi.org/10.1021/np030498t>
- Pardo, J. M. 2010. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Curr Opin Biotechnol* 21:1-12. PMID:20189794. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.005>
- Qiao, F., Yang, Q., Wang, C., Fan, Y., Wu, X. and Zhao, K. 2007. Modification of plant height via RNAi suppression of OsGA20ox2 gene in rice. *Euphytica* 158:35-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-007-9422-6>
- Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. 2006. High amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3546-3551. PMID:16537443 PMID:1450120. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510737103>
- Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Ling, S., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. 2010. Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *J Exp Bot* 61:1469-1482. PMID:20156842 PMID:2837261. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq011>

- Rodríguez-Hernández, A. M., Gosalvez, B., Sempere, R. N., Burgos, L., Aranda, M. A. and Truniger, V. 2012. Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for Cm-eIF4E show broad virus resistance. *Mol Plant Pathol* 13(7):755-63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00785.x>
- Ross, J. A. and Kasum, C. M. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34. PMID:12055336. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>
- Segal, G., Song, R. and Messing, J. 2003. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference inducing transgene. *Genetics* 165:387-397. PMID:14504244 PMCid:1462732
- Sharma, H. C., Crouch, J. H., Sharma, K. K., Seetharama, N. and Hash, C. T. 2002. Applications of biotechnology for crop improvement: prospects and constraints. *Plant Sci* 163:381-395. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00133-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00133-4)
- Shepherd, D. N., Martin, D. P. and Thomson, J. A. 2009. Transgenic strategies for developing crops resistant to geminivirus. *Plant Sci* 176:1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.08.011>
- Sicherer, S. H. and Sampson, H. A. 2010. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 125:116-125. PMID:20042231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>
- Sunkar, R. and Zhu, J. K. 2004. Novel and stress-regulated micro RNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16:2001-2019. PMID:15258262 PMCid:519194. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.022830>
- Tang, G., Galili, G. and Zhuang, X. 2007. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolic engineering. *Metabolomics* 3:357-369. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0073-3>
- Thayer, A. 2003. Bristol-Myers to settle suits. *Chem Eng News* 81:6-11. <http://dx.doi.org/10.1021/cen-v081n035.p006>
- Tester, M. and Langridge, P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327:818-822. PMID:20150489. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1183700>
- Thayer, A. 2003. Bristol-Myers to settle suits. *Chem Eng News* 81:6-11. <http://dx.doi.org/10.1021/cen-v081n035.p006>
- Tucker, G. 2003. Nutritional enhancement of plants. *Curr Opin Biotechnol* 14:221-225. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00031-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00031-4)
- Wang, Y. and Li, J. 2006. Genes controlling plant architecture. *Curr Opin Biotechnol* 17:123-129. PMID:16504498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.004>
- Wang, Y. and Li, J. 2008. Molecular basis of plant architecture. *Ann Rev Plant Biol* 59:253-279. PMID:18444901. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092902>
- Waterhouse, P. M., Graham, W. M. B. and Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13959-13964. PMID:9811908 PMCid:24986. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.23.13959>
- Xiong, A., Yao, Q., Peng, R., Li, X., Han, P. and Fan, H. 2005. Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Rep* 23:639-646. PMID:15503033. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-004-0887-7>
- Zhang, X., Sato, S., Ye, X., Dorrance, A. E., Morris, T. J., Clemente, T. E. and Qu, F. 2011. Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene. *Phytopathology* 101:1264-1269. PMID:21999157. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-02-11-0056>
- Zhao, J., Wang, C., Bedair, M., Welti, R., Sumner, L. W., Baxter, I. and Wang, X. 2011. Suppression of phospholipase Dys confers increased aluminum resistance in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 6(12):e28086. PMID:22163277 PMCid:3233545. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028086>
- Zhou, H., He, S. J., Cao, Y., Chen, T., Du, B., Chu, C., Zhang, J. and Chen, S. 2006. OsGLU1, a putative membrane bound endo-1, 4-b-D-glucanase from rice, affects plant internode elongation. *Plant Mol Biol* 60:137-151. PMID:16463105. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-005-2972-x>
- Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R. J., Gislason, D., Madsen, C., Summers, C., Sodergren, E., Dahlstrom, J., Lindner, T., Sigurdardottir, S. T., McBride, D. and Keil, T. 2008. The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 121:1210-1218. PMID:18378288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.019>

Aplicações Biotecnológicas da RNAi em Animais

Capítulo

3

Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes¹ e Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões²

¹*Depto. de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFScar)*

²*Depto. de Biologia, FFCLRP, USP*

Introdução

A RNAi tem sido amplamente utilizada nas mais diversas espécies, principalmente em organismos “não modelos”, nos quais os métodos de manipulação genética são limitados. Nesses organismos, o emprego da técnica de RNAi vem permitindo avanços sem precedentes na investigação da função de um número ilimitado de genes, especialmente aqueles ligados ao desenvolvimento, fisiologia endócrina, reprodução, comportamento e imunologia (Bellés, 2010). Dentre as potenciais aplicações, o silenciamento de genes virais se destaca como estratégia terapêutica promissora na veterinária, particularmente quando confere resistência a doenças em animais de interesse econômico, sobretudo os de grande porte. Essa nova vertente da engenharia genética também emerge como ferramenta viável para aplicação em questões ligadas à produção alimentar sustentável e impacto ambiental (Long et al., 2010). Os avanços técnicos na área de RNAi na última década denotam seu caráter revolucionário no campo da genética, possibilitando resultados robustos, com custo e consumo de tempo menores do que usualmente são gastos com a produção de animais nocaute e transgênicos. Mesmo que os mecanismos moleculares envolvendo RNAi não estejam completamente elucidados, a comunidade científica utiliza-se das vantagens da técnica para desenvolver pesquisas básicas e aplicadas, conforme os exemplos que veremos a seguir.

Arterite Viral em Cavalos

A arterite viral equina é uma doença infecciosa detectada em cavalos de vários países, incluindo o Brasil (Lara et al., 2006; Bello et al., 2007). O vírus EAV (do inglês, *Equine Arteritis Virus*) se mantém no trato genital dos machos, sem afetar a

fertilidade. No entanto, fêmeas desenvolvem infecção aguda em resposta à presença do vírus, apresentando sintomas variados como: febre, quadro depressivo, conjuntivite severa, problemas respiratórios, edemas, diminuição de apetite, aborto. Estas fêmeas podem infectar outros cavalos por meio de secreção nasal e urina (Glaser et al., 1996). Diante disso, há prejuízos econômicos por causa de restrições internacionais ao tráfego e comercialização de animais e sêmen (Timoney e McCollum, 1988). As vacinas disponíveis no mercado não bloqueiam completamente a transmissão viral, o que instigou o uso de RNAi como caminho para o desenvolvimento de novas terapias contra o vírus EAV (Heinrich et al., 2009). Por não existir um animal modelo de pequeno porte e compatível para estudos *in vivo* de arterite viral, Heinrich et al. (2009) usaram culturas de células das linhagens APH-R (derivada de epitélio equino) e BHK-21 (derivada de fibroblasto de *hamster*), ambas susceptíveis ao EAV. Foram sintetizados oito siRNAs (do inglês, *small interfering RNAs*), contra três genes codificadores de proteínas estruturais e um gene codificador de uma proteína não estrutural. Os resultados demonstraram redução na infecção por EAV na linhagem APH-R, quando as células foram transfectadas com siRNAs relativos ao RNA codificador da proteína não estrutural. Os autores usaram estes siRNAs contendo duas mutações de ponto cada um e a proteção contra o vírus foi perdida, mostrando a importância da total complementaridade entre o siRNA e seu alvo. A transfecção de siRNAs contra os outros genes mostrou proteção fraca ou inexistente. Acredita-se que os genes para proteínas estruturais sejam mais expressos e, portanto, requerem doses maiores de siRNA para serem efetivamente silenciados. Por outro lado, altas doses podem desencadear efeitos colaterais. Outro ensaio consistiu na transfecção de células BHK-21 com vetores plasmidiais que expressam shRNA (do inglês, *small hairpin RNAs*, funcionalmente equivalente a um siRNA). Novamente, o controle da infecção foi observado apenas nas células que receberam shRNAs complementares ao RNA para proteína não estrutural, tornando-se este RNA (ou esta proteína) bom alvo para o desenvolvimento de terapias e drogas. Assim, como em outros estudos *in vitro* envolvendo infecção viral e RNAi, a proteção ocorre se as moléculas de RNA de fita dupla (siRNAs, dsRNAs ou shRNAs) são aplicados antes da infecção viral. Se aplicados junto com o vírus, ou após infecção, o efeito protetor tende a ser menos pronunciado ou ausente. Para fins de terapia *in vivo*, se um excesso de células não infectadas receberem siRNAs, estas estarão protegidas, bloqueando a propagação viral. Como os vírus em geral possuem altas taxas de mutação, sugere-se que sejam administrados muitos siRNAs contendo variações na sequência nucleotídica.

Príon e o Mal da Vaca Louca

Príon é uma partícula proteica (PrP^C) encontrada em células de vertebrados, com expressão significativa em tecido nervoso. Quando o príon tem a estrutura modificada (PrP^{Sc}), seu acúmulo causa doenças classificadas como encefalopatias espongiformes, com consequente morte de neurônios. Tal modificação pode ser herdada, adquirida ou transmitida entre animais da mesma espécie ou entre espécies. A doença da vaca louca ou encefalite espongiforme bovina é uma desordem neurodegenerativa fatal que ocorre no gado e é causada pelos príons PrP^{Sc}. Em decorrência da confirmação da doença, ou até mesmo da suspeita, animais são sacrificados, culminando em consideráveis prejuízos para a pecuária em todo o mundo. O uso de RNAi para inibição de PrP tem como objetivos: (i) desenvolver uma terapia contra a doença; (ii) produzir animais resistentes; e (iii) prevenir a transmissão da doença entre animais e para humanos. Algumas iniciativas usando RNAi *in vitro* e *in*

vivo foram bem sucedidas. Os níveis dos transcritos de PrP^C e PrP^{Sc} foram significativamente reduzidos em linhagens de neuroblastoma transfectadas com siRNAs (Daude et al., 2003; Kim et al., 2009) e shRNAs (Kim et al., 2009). No entanto, o efeito desses RNAs interferentes não foi estável. Estratégia mais promissora foi desenvolvida por Golding et al. (2006) quando criaram uma cabra transgênica que apresentou redução drástica de PrP. Vetores lentivirais foram usados como veículo para expressão transgênica de shRNA em uma linhagem celular de fibroblastos de cabra adulta. Cerca de 30% das células infectadas integraram o lentivírus recombinante. Essas células foram usadas para transferência nuclear a fim de produzir clones transgênicos de embriões de cabras. Oito fêmeas receberam embriões clonados e apenas uma gravidez foi bem sucedida (um sucesso baixo, porém compatível com estudos similares). O feto foi cirurgicamente retirado com 81 dias de gestação e comparado com um controle de mesma idade derivado de um acasalamento natural. Análise de PCR confirmou a presença do shRNA relativo ao mRNA de Prion em todos os tecidos analisados. No tecido cerebral do feto transgênico observou-se uma redução superior a 90% nos níveis da proteína PrP. Os autores também injetaram lentivírus recombinantes no espaço perivitelínico de 139 óvulos bovinos. Esses óvulos foram fertilizados e cultivados *in vitro*. Dos 42 óvulos que se desenvolveram até blastocistos, 32 (76%) expressaram shRNA contra os transcritos de PrP. Pfeifer et al. (2006) mostraram que a injeção intracranial de lentivírus contendo shRNA contra o PrP causou a diminuição dos transcritos alvo em camundongos transgênicos com múltiplas cópias do gene PrP. Esses pesquisadores também geraram camundongos saudáveis que expressavam shRNA contra PrP, os quais apresentaram sobrevivência prolongada após infecção por PrP^{Sc}.

Febre Aftosa em Rebanhos

A febre aftosa é uma doença infectocontagiosa que atinge animais de casco fendido, como bovinos, suínos, caprinos e ovinos. O agente etiológico é o vírus FMDV (do inglês, *foot-and-mouth disease virus*), veiculado pelo ar, água, alimentos, entre outros. Em geral, a doença acomete todo o rebanho, podendo causar perda de apetite e peso, diminuição da produção de leite, lesões cardíacas, aborto, infertilidade e morte. Por consequência, há necessidade de sacrifício de animais, interdição da propriedade e proibição de transporte de animais e consumo de seus produtos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil registrou, em 2011, um dos maiores rebanhos bovinos (212,8 milhões de cabeças) e suínos (39,3 milhões) do mundo (fonte: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm>). Surtos importantes de febre aftosa ocorrem no Brasil desde 1999, especialmente no Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. Para evitar prejuízos, os pecuaristas vacinam seus rebanhos. As vacinas disponíveis atualmente são eficazes na prevenção da doença, mas apresentam risco de inativação incompleta do vírus e não induzem resposta imune num período curto após a aplicação. A fim de se evitar surtos recorrentes da doença, novas terapias antivirais são necessárias. Nesse sentido, Chen et al. (2004) inibiram a replicação do vírus FMDV *in vitro* e *in vivo*. O alvo para construção de siRNAs foi a proteína estrutural VP1, fundamental na fixação do vírus nas células do hospedeiro. Duas construções (21 e 63 nucleotídeos, respectivamente) foram individualmente inseridas em vetores plasmidiais de expressão, os quais foram usados para transfectar células BHK-21. Ambas as construções plasmidiais reduziram em 80% a 90% a expressão de VP1 em 24 horas após a transfecção. No entanto, 48 horas após o tratamento, a carga viral das células tratadas e controles foi equivalente, o que mostra uma proteção transiente. Mais de 70% dos camundongos recém-

nascidos que receberam injeção subcutânea de ambos os plasmídios expressando siRNAs sobreviveram até 5 dias após a infecção viral, enquanto nenhum animal do grupo controle sobreviveu após 36 horas. Essa estratégia baseada em RNAi promove uma resposta antiviral rápida, o que não é o caso das terapias tradicionais, que se mostram, portanto, complementares. Resultados muito similares foram obtidos por Pengyan et al. (2008), que usaram vetores de expressão contendo shRNAs correspondentes a regiões conservadas entre 7 sorotipos de FMDV para transfecção de células BHK-21 e injeção em camundongos recém-nascidos. Outra estratégia contra a febre aftosa foi avaliada *in vitro* e *in vivo*. Chen et al. (2006) construíram dois adenovírus que expressam shRNAs, os quais têm como alvos a proteína estrutural 1D e a polimerase 3D do vírus FMDV. A linhagem celular IBRS-2 proveniente de rim suíno foi completamente protegida da infecção viral por ambas as construções. Injeção desses adenovírus em cobaias (*Cavia porcellus*) gerou animais menos suscetíveis à infecção, bem como a injeção de uma mistura de ambos adenovírus em suínos adultos conferiu proteção contra a febre aftosa.

Colapso em Abelhas

Desde 2006 apicultores e pesquisadores de abelhas do gênero *Apis*, talvez o mais importante inseto polinizador na natureza, começaram a observar um fenômeno curioso e preocupante: o desaparecimento em massa de operárias adultas nos Estados Unidos, no Canadá, na Europa, na China, no Japão, na América Latina e em outras localidades. No entanto, não são encontrados vestígios de insetos mortos e, estranhamente, não se observam sinais nas colônias abandonadas; nelas há alimento estocado e crias em desenvolvimento, aparentemente normais. A síndrome foi batizada de “desordem de colapso de colônia” (em inglês, *Colony collapse disorder* (CCD)) e vem causando prejuízos econômicos para agricultores e apicultores. A causa, ainda incerta, tem sido atribuída a uma série de fatores que se combinam: alimentação pouco variada, pesticidas, fungos, ácaros e vírus. Uma análise metagenômica indicou o vírus IAPV (do inglês, *Israeli acute paralysis virus*) como um dos responsáveis pelo colapso (Cox-Foster et al., 2007). Com o intuito de desenvolver um protocolo de controle desse vírus, Maori et al. (2009) alimentaram abelhas adultas com dois tipos de dsRNA misturados em xarope de sacarose. Os dsRNAs usados tinham como alvo: (i) um gene estrutural do vírus que se integra ao genoma da abelha; e (ii) uma outra região intergênica (que provavelmente transcreve um RNA não codificador) apontada como marcador de linhagens afetadas pelo colapso. Os dsRNAs produzidos possuíam 433 pb e 426 pb, respectivamente. O estudo demonstrou uma diminuição significativa da carga viral e redução da mortalidade no grupo de abelhas infectadas com IAPV que ingeriram dsRNAs derivados de sequências desse vírus, em comparação ao grupo controle de abelhas infectadas que não ingeriram dsRNAs. Os autores sugerem que a ferramenta pode ser usada em campo para controle simultâneo de múltiplos vírus e consequente proteção do componente viral associado ao colapso.

Controle da Doença da Mancha Branca em Camarões

A criação de camarões em cativeiro (carcinicultura) é uma atividade econômica crescente no Brasil. Teve seu auge em 2003, quando foram produzidas 90 mil toneladas.

A partir de então, a produção camaroeira no Brasil registra queda (Rocha, 2011) e esta coincide com a detecção do vírus da mancha branca ou vírus WSSV (do inglês, *White Spot Syndrome Virus*) no País. Dos cerca de 20 vírus que acometem camarões, o WSSV é o que causa maior impacto na criação mundial de camarão em termos de distribuição, perdas econômicas e prejuízos ambientais. Quando doentes, os camarões apresentam letargia, baixo consumo alimentar, manchas brancas, devido ao acúmulo anormal de sais de cálcio sob o exoesqueleto. A mortalidade pode atingir 100% dos indivíduos em até sete dias (Zhan e Wang, 1998). Em linhas gerais, os invertebrados carecem de um sistema imune adaptativo típico, o que é pré-requisito para a eficácia de vacinas proteicas (Kimbrell e Beutler, 2001). Por exemplo, camarões *Penaeus monodon* infectados por WSSV foram oralmente vacinados com bactérias que expressavam duas proteínas componentes do envelope desse vírus, VP19 e VP28. Comparando-os ao grupo de camarões não vacinados, observou-se que a vacina conferiu uma sobrevivência relativa de 77% até o sétimo dia após vacinação. No entanto, essa proteção foi reduzida para 29% quando avaliada no 21º dia (Witteveldt et al., 2004). Vacinas de DNA também foram testadas e mostraram-se mais eficientes que vacinas proteicas, conferindo proteção contra o vírus WSSV por até sete semanas (Rout et al., 2007). Imunoestimulantes, probióticos e birremediação têm sido usados, mas apresentam limitações em termos de eficácia, praticidade e custo (Krishnan et al., 2009b). O emprego de RNAi no combate ao WSSV tem se mostrado promissor. Robalino et al. (2004) usaram sequências sem homologia a genes do camarão para construir longos dsRNAs, que variaram de 309 a 1184 pb. Tais sequências derivaram de imunoglobulinas de pato-real (*Anas platyrhynchos*) e de javali (*Sus scrofa*), de região não codificadora do genoma de bagre-americano (*Ictalurus punctatus*) e do vetor bacteriano (pBeloBAC11). O tratamento com os diferentes dsRNAs foi realizado anterior ou concomitantemente à infecção de camarões *Litopenaeus vannamei* com o vírus WSSV, ambos via injeção intramuscular no segmento abdominal. Cada um desses dsRNAs inespecíficos induziu imunidade antiviral generalizada, sequência-independente. Essa resposta inespecífica ao vírus WSSV foi novamente observada em outro camarão (*Penaeus monodon*) por Westenberg et al. (2005). Estes pesquisadores injetaram siRNAs de 21 nt contra os genes do vírus que codificam as proteínas VP15 (ligante de DNA) e VP28 (vide página anterior). Tanto os siRNAs específicos quanto os inespecíficos (contra GFP, *green fluorescent protein*) proporcionaram aumento na taxa de sobrevivência, sem diferenças significativas entre eles. Novamente, longos dsRNAs, específicos e inespecíficos, protegeram o camarão *Penaeus chinensis* contra a infecção por WSSV (Kim et al., 2007). Outra estratégia bem sucedida contra o vírus WSSV foi o uso de construções de DNA que expressam hpRNAs (do inglês, *long hairpin RNAs*). Os hpRNAs são similares aos shRNAs, exceto no tamanho do fragmento inserido. Uma vantagem é a produção de múltiplos siRNAs a partir de um único precursor, uma maneira robusta de impedir o escape viral (Krishnan et al., 2009b). Krishnan et al. (2009a) observaram que a expressão de hpRNA, contendo um fragmento de 326 pb do gene codificador de VP28, conferiu sobrevivência de 75% dos camarões *Penaeus monodon* infectados e redução de 81% no número de transcritos. A construção foi capaz de reduzir a carga viral de 10 mil para 100 cópias. Uma construção inespecífica de hpRNA, contendo um fragmento de GFP, também promoveu sobrevivência e silenciamento de genes virais, embora seu efeito generalizado tenha sido 60% menor. A resistência à infecção viral promovida por moléculas inespecíficas, ainda que menos pronunciada que aquela conferida por moléculas específicas, sugere uma ativação muito peculiar do sistema imune nesses invertebrados (Robalino et al., 2007; Krishnan et al., 2009b).

Análise do Comportamento e Determinação do Sexo em Abelhas

A biologia reprodutiva das abelhas *Apis mellifera* impossibilita a produção e manutenção de transgênicos. O uso de RNAi tem sido cada vez maior para investigação funcional de genes nessas abelhas, com enfoque especial em questões relativas ao comportamento social, determinação de sexo e de castas, longevidade, metamorfose, aprendizagem e memória, as quais continuam despertando o interesse científico. Trabalhos pioneiros fizeram uso de longas moléculas de dsRNA (> 300 pb) para injetar embriões pré-blastodérmicos destas abelhas e silenciar a expressão de genes de interesse ao longo do desenvolvimento (Beye et al., 2002; Amdam et al., 2003). Foi observado também que a aplicação de dsRNA em abelhas silencia os genes de interesse não apenas na região da injeção, mas também em tecidos distantes dali (Aronstein e Saldívar, 2005), com efeitos a longo prazo (Amdam et al., 2003). O silenciamento gênico nessas abelhas também se mostrou eficiente quando moléculas de dsRNA foram oferecidas na dieta de larvas jovens, posteriormente mantidas em laboratório (Aronstein et al., 2006; Patel et al., 2007) ou em suas colônias de origem (Nunes e Simões, 2009). Até maio de 2012, foram publicados 42 artigos usando RNAi em abelhas, dos quais 14 tiveram como alvo o gene codificador de vitelogenina. Na maioria dos insetos, a vitelogenina, que pertence à família das proteínas ligantes de lipídios, é uma importante reserva energética dos ovos. Em abelhas, a vitelogenina se expressa em rainhas, as quais produzem centenas de ovos diariamente. No entanto, esse gene adquiriu funções não vitelogênicas, uma vez que também se expressa em indivíduos que não produzem ovos, as operárias e os zangões (Amdam e Omholt, 2003). A injeção intra-abdominal de dsRNA em operárias adultas silencia os transcritos de vitelogenina e resulta no aumento de hormônio juvenil, um composto lipofílico do grupo dos sesquiterpenoides (Guidugli et al., 2005). Essa descoberta mostra a vitelogenina como uma importante reguladora da fisiologia e organização social (divisão de trabalho) nessas abelhas. Na primeira metade da fase adulta (cerca de 15 dias), as abelhas cumprem atividades dentro das colônias, como a alimentação da cria. A partir de então, as abelhas forrageiam, ou seja, saem da colônia em busca de néctar, pólen, água e resinas. Foi observado que as operárias “mutantes” para vitelogenina forrageiam mais cedo e têm a longevidade reduzida (Nelson et al., 2007). Esse grupo de pesquisadores havia mostrado que abelhas que naturalmente expressam menos vitelogenina são mais suscetíveis a estresse oxidativo, um indicador de envelhecimento (Seehuus et al., 2006). Essa mudança no comportamento de forrageamento foi mensurado com maior detalhe por Marco Antonio et al. (2008). Os autores mostraram que o silenciamento da vitelogenina induziu as operárias a se tornarem forrageiras precocemente, antecipando significativamente os voos de forrageamento de longa duração (> 10 minutos) nos primeiros 5 dias, em comparação aos controles não injetados. Mudanças bruscas no fenótipo também foram observadas em trabalhos de RNAi em *A. mellifera*. Nestas abelhas, a determinação de sexo é haplodiploide, ou seja, fêmeas se originam de ovócitos fertilizados (portanto diploides) e os machos (zangões) de ovócitos não fertilizados (haploides). A alimentação diferencial de larvas diploides jovens é responsável pela diferenciação dos dois fenótipos femininos: rainha e operária. Ao silenciar transcritos do gene TOR (do inglês, *target of rapamycin*) nas larvas diploides já definidas como sendo rainhas, observou-se atraso no desenvolvimento e reduções no crescimento larval, no tamanho final dos adultos e no número de ovariolos, ou seja, adquiriram fisiologia e morfologia de operárias (Patel et al., 2007). No que tange à determinação de sexo, as fêmeas são heterozigotas para o gene *csd* (do inglês, *complementary sex determiner*), e os machos, por serem haploides, são hemizigotos. A indução do silenciamento desse gene em ovos diploides (que normalmente originam fêmeas) resultou em 92% de larvas com gônadas masculinas (Beye et al., 2003). Em seguida, o mesmo

grupo descreveu um novo componente da cascata de determinação de sexo, o gene *fem* (do inglês, *feminizer*), que gera variantes sexo-específicas resultantes de *splicing* alternativo. Ovos diploides que receberam dsRNA para a variante fêmea-específica (*fem^F*) ou para *csd* desenvolveram-se em, respectivamente, 78% e 75% de adultos com cabeças típicas de machos (Hasselmann et al., 2008). Em trabalho subsequente, o grupo repetiu os ensaios de RNAi para *csd* e *fem^F* em ovos haploides e diploides a fim de examinar com maior detalhes as mudanças fenotípicas. A repressão tanto de *fem^F* quanto de *csd* nos diploides resultou em pupas de operárias apresentando caracteres masculinos (74% e 76%, respectivamente): gônadas inteiramente diferenciadas em um par de testículos, glândula de muco, endofalo e pernas posteriores típicas de zangões. Os mesmos experimentos realizados em ovos haploides não apresentaram modificações fenotípicas, ou seja, esses ovos se desenvolveram normalmente em zangões (Gempe et al., 2009).

Produção Alimentar

No campo da produção alimentar, o uso de RNAi deverá, nos próximos anos, concorrer em igualdade de condições ou até substituir a seleção genética clássica. Enquanto os programas de seleção levam à perda de diversidade biológica e surgimento de caracteres indesejados, o silenciamento de genes específicos tem indicado fortemente que poderá conferir valor agregado a produtos animais de interesse econômico. A miostatina, por exemplo, é um regulador negativo de crescimento muscular. Animais que possuem esse gene mutado apresentam aumento dramático de massa muscular. Porém, apresentam distúrbios como: hipertrofia e hiperplasia das fibras musculares, redução da fertilidade feminina e menor viabilidade da prole (McPherron e Lee, 1997). Resultados preliminares mostram que o uso de quatro construções diferentes de shRNAs em cultura de células de caprinos reduzem em cerca de 50% os transcritos de miostatina (Long et al., 2010). Esse estudo está agora sendo direcionado para aplicação *in vivo*, com o intuito de aumentar a massa muscular dos animais, evitando-se os distúrbios.

RNAi Parental

Uma poderosa ferramenta que tem sido cada vez mais explorada em artrópodes é a capacidade de transferência dos agentes silenciadores entre gerações (Bucher et al., 2002). Esse fenômeno, chamado de RNAi parental (pRNAi), já foi observado na vespa *Nasonia vitripennis* (Lynch e Desplan, 2006), no gafanhoto *Locusta migratoria* (He et al., 2006), no ácaro *Tetranychus urticae* (Khila e Grbić, 2007), no grilo *Gryllus bimaculatus* (Mito et al., 2008) e no besouro *Tribolium castaneum* (Aranda et al., 2008; Farzana e Brown, 2008). Na maioria dos casos, os alvos de silenciamento são genes do desenvolvimento embrionário e o que se observa são defeitos na formação de estruturas e plano corporal. A idade em que as fêmeas recebem dsRNA é crucial para que os efeitos nos fenótipos da prole sejam mais pronunciados (Aranda et al., 2008). A médio e longo prazos, as vantagens do pRNAi poderão ser aplicadas na entomologia para viabilizar o controle de vetores de doenças e pragas agrícolas.

Environmental RNAi

Uma propriedade associada à RNAi que também atrai entomologistas é a capacidade de muitos insetos captarem dsRNAs que, de alguma forma, estão disponíveis no ambiente (Huvenne e Smagghe, 2010). Na literatura, esse mecanismo é chamado de *dsRNA uptake* ou *environmental RNAi* (Jose e Hunter, 2007; Whangbo e Hunter, 2008; Nunes e Simões, 2009), que aqui designaremos por enRNAi. Em geral, o conceito é apropriado quando moléculas de dsRNA são oferecidas na dieta. Nessa linha, testando-se RNAi como inseticida, observou-se elevada letalidade em operárias do cupim *Reticulitermes flavipes*, que se alimentaram voluntariamente com altas doses de dsRNA, contra dois genes (celulase e hexamerina) (Zhou et al., 2008). Acredita-se que a capacidade de absorção do intestino, suas microvilosidades e capacidade endocítica fazem desse tecido um excepcional “sequestrador” de dsRNAs (Huvenne e Smagghe, 2010). Winston et al. (2007) identificaram o gene codificador de SID-2, uma proteína transmembrana do lúmen intestinal que funciona como receptor de dsRNAs vindos do meio. Embora, por razões ainda desconhecidas, nem todas as moléculas de dsRNAs sejam incorporadas a partir do intestino, as que o são conseguem causar silenciamento sistêmico e prolongado (Nunes e Simões, 2009). Em *Caenorhabditis elegans* e outros invertebrados, a ingestão de bactérias que expressam dsRNA (ou a simples imersão em solução com estas moléculas) é capaz de disparar enRNAi num primeiro conjunto de células e, em seguida, esses sinais se espalham para tecidos distantes. Jose e Hunter (2007) hipotetizaram que um gene pode ser silenciado mesmo em células sem dsRNA específico por vias de sinalização intracelular ainda pouco exploradas na área de RNAi, como a endocitose. As propriedades do enRNAi abrem oportunidades inovadoras, simples e de baixo custo para o controle de pragas agrícolas e terapias em mamíferos (Whangbo e Hunter, 2008).

Considerações Finais

O número cada vez maior de genomas sequenciados não apenas permite o estudo de função gênica em organismos específicos como também análises comparativas para obter informações sobre processos celulares e biológicos. RNAi é uma metodologia que vem permitindo rápidos avanços nesse sentido. Atualmente existem bibliotecas de dsRNA que viabilizam o silenciamento, individual ou em larga escala, de, aproximadamente, 17.000 genes do verme *C. elegans* (Kamath e Ahringer, 2003) e de ~14.000 genes da mosca *Drosophila melanogaster* (Boutros et al., 2004). Estas bibliotecas permitem identificar fenótipos letais ou visíveis. Encontram-se disponíveis na internet bases de dados e ferramentas relacionadas às bibliotecas de RNAi do verme (WormBase - <http://www.wormbase.org>) e da mosca (*Drosophila* RNAi Screening Center (DRSC) - <http://www.flyrnai.org/>). Buscas por palavras-chave no NCBI-PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) indicaram que, de 1998 até o momento (maio de 2012), foram publicados quase 12 mil trabalhos envolvendo RNAi. Destes, quase 90% são artigos e os demais são revisões. Em animais, estão registrados 5.664 artigos sobre RNAi, dos quais 4% são relativos a aplicação, 4% a biotecnologia e 2% a veterinária. Esse cenário mostra a relevância dos animais para a compreensão dos mecanismos de silenciamento gênico e, ainda que em menor escala, o desenvolvimento e amadurecimento de tecnologias de RNAi que já permitem aplicabilidade e um futuro promissor.

Referências

- Amdam, G. V. and Omholt, S. W. 2003. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: The double repressor hypothesis. *J Theor Biol* 223 (4):451-464. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Guidugli, K. R., Norberg, K. and Omholt, S. W. 2003. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* 3:1. PMID:12546706 PMCID:149360. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-3-1>
- Aranda, M., Marques-Souza, H., Bayer, T. and Tautz, D. 2008. The role of the segmentation gene hairy in *Tribolium*. *Dev Genes Evol* 218(9):465-477. PMID:18679713 PMCID:2522291. <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-008-0240-1>
- Aronstein, K., Pankiw, T. and Saldivar, E. 2006. Sid-I is implicated in systemic gene silencing in the honey bee. *J Apic Res* 45 (1):20-24.
- Aronstein, K. and Saldivar, E. 2005. Characterization of a honey bee toll related receptor gene Am18w and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie* 36 (1):3-14. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2004062>
- Bellés, X. 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annu Rev Entomol* 55:111-128. PMID:19961326. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085301>
- Bello, A. C. P. P., Cunha, A. P., Braz, G. F., Lara, M. C. S. H., Reis, J. K. P., Haddad, J. P. H., Rocha, M. A. and Leite, R. C. 2007. Frequency of equine viral arteritis in Minas Gerais State, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59(4):1077-1079. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000400039>
- Beye, M., Hartel, S., Hagen, A., Hasselmann, M. and Omholt, S. W. 2002. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol Biol* 11 (6):527-532. PMID:12421410. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00361.x>
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E. and Omholt, S. W. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114(4):419-429. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00606-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00606-8)
- Boutros, M., Kiger, A. A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S. A., Paro, R., Perrimon, N. and Heidelberg Fly Array Consortium. 2004. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science* 303(5659):832-835. PMID:14764878. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1091266>
- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol* 12(3):R85-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00666-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00666-8)
- Chen, W., Liu, M., Jiao, Y., Yan, W., Wei, X., Chen, J., Fei, L., Liu, Y., Zuo, X., Yang, F., Lu, Y. and Zheng, Z. 2006. Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J Virol* 80(7):3559-3566. PMID:16537624 PMCID:1440392. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.7.3559-3566.2006>
- Chen, W., Yan, W., Du, Q., Fei, L., Liu, M., Ni, Z., Sheng, Z. and Zheng, Z. 2004. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *J Virol* 78(13):6900-6907. PMID:15194766 PMCID:421660. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.13.6900-6907.2004>
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P. L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., Van Engelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., Egholm, M., Pettis, J. S. and Lipkin, W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848):283-287. PMID:17823314. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146498>
- Daude, N., Marella, M. and Chabry, J. 2003. Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci* 116:2775-2779. PMID:12759373. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00494>
- Farzana, L. and Brown, S. J. 2008. Hedgehog signaling pathway function conserved in *Tribolium* segmentation. *Dev Genes Evol* 218(3-4):181-192. PMID:18392879 PMCID:2292471. <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-008-0207-2>

- Gempe, T., Hasselmann, M., Schiøtt, M., Hause, G., Otte, M. and Beye, M. 2009. Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biol* 7(10):e1000222. PMID:19841734 PMCID:2758576. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000222>
- Glaser, A. L., De Vries, A. A., Rottier, P. J., Horzinek, M. C. and Colenbrander, B. 1996. Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet Q* 18(3):95-99. PMID:8903141. <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.1996.9694625>
- Golding, M. C., Long, C. R., Carmell, M. A., Hannon, G. J. and Westhusin, M. E. 2006. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(14):5285-5290. PMID:16567624 PMCID:1459347. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600813103>
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. and Hartfelder, K. 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Lett* 579(22):4961-4965. PMID:16122739. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.085>
- Hasselmann, M., Gempe, T., Schiøtt, M., Nunes-Silva, C. G., Otte, M. and Beye, M. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454(7203):519-522. PMID:18594516. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07052>
- He, Z. B., Cao, Y. Q., Yin, Y. P., Wang, Z. K., Chen, B., Peng, G. X. and Xia, Y. X. 2006. Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Dev Growth Differ* 48(7):439-445. PMID:16961591. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00881.x>
- Heinrich, A., Riethmüller, D., Gloger, M., Schusser, G. F., Giese, M. and Ulbert, S. 2009. RNA interference protects horse cells in vitro from infection with Equine Arteritis Virus. *Antiviral Res* 81(3):209-216. PMID:19007819. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.004>
- Huvenne, H. and Smaghe, G. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J Insect Physiol* 56(3):227-235. PMID:19837076. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.004>
- Jose, A. M. and Hunter, C. P. 2007. Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annu Rev Genet* 41:305-330. PMID:17645412. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130216>
- Kamath, R. S. and Ahringer, J. 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30(4):313-321. [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00050-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00050-1)
- Khila, A. and Grbić, M. 2007. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the Distal-less gene. *Dev Genes Evol* 217(3):241-251. PMID:17262226. <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-007-0132-9>
- Kim, Y., Han, B., Titlow, W., Mays, C. E., Kwon, M. and Ryou, C. 2009. Utility of RNAi-mediated prnp gene silencing in neuroblastoma cells permanently infected by prions: potentials and limitations. *Antiviral Res* 84(2):185-193. PMID:19748523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.09.002>
- Kimbrell, D. A. and Beutler, B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Gen* 2:256-267. PMID:11283698. <http://dx.doi.org/10.1038/35066006>
- Krishnan, P., Babu, P. G., Saravanan, S., Rajendran, K. V. and Chaudhari, A. 2009a. DNA constructs expressing long-hairpin RNA (lhRNA) protect *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus. *Vaccine* 27(29):3849-3855. PMID:19490985. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.011>
- Krishnan, P., Gireesh-Babu, P., Rajendran, K. V. and Chaudhari, A. 2009b. RNA interference-based therapeutics for shrimp viral diseases. *Dis Aquat Organ* 86(3):263-272. PMID:20066961. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02126>
- Lara, M. C. S., Furman, K. E., Barros-Filho, I. R., Villalobos, E. M. C., Cunha, E. M. S., Deconto, I., Bonacim, J., Utime, R. A. and Biondo, A. W. 2006. Detection of antibodies against equine viral arteritis virus (EVAV) and equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in cart horses from Curitiba and surroundings, southern Brazil. *Arch Vet Sci* 11(3):11-14.
- Long, C. R., Tessanne, K. J. and Golding, M. C. 2010. Applications of RNA interference-based gene silencing in animal agriculture. *Reprod Fertil Dev* 22(1):47-58. PMID:20003845. <http://dx.doi.org/10.1071/RD09211>

- Lynch, J. A. and Desplan, C. 2006. A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nat Protoc* 1(1):486-494. PMID:17406271. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.70>
- Maori, E., Paldi, N., Shafir, S., Kalev, H., Tsur, E., Glick, E. and Sela, I. 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol Biol* 18(1):55-60. PMID:19196347. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00847.x>
- Marco Antonio, D. S., Guidugli-Lazzarini, K. R., Nascimento, A. M., Simões, Z. L. P. and Hartfelder, K. 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 95(10): 953-961. PMID:18545981. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-008-0413-9>
- McPherron, A. C. and Lee, S. J. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(23):12457-12461. PMID:9356471 PMCID:24998. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457>
- Mito, T., Ronco, M., Uda, T., Nakamura, T., Ohuchi, H. and Noji, S. 2008. Divergent and conserved roles of extradenticle in body segmentation and appendage formation, respectively, in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Biol* 313(1):67-79. PMID:18036518. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.060>
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E. and Amdam, G. V. 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol* 5(3):e62. PMID:17341131 PMCID:PMC1808115. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Nunes, F. M. F. and Simões, Z. L. P. 2009. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem Mol Biol* 39(2):157-160. PMID:19049870. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.011>
- Patel, A., Fondrk, M. K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K. and Amdam, G. V. 2007. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development. *PLoS One* 2(6):e509. PMID:17551589 PMCID:PMC1876819. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000509>
- Pengyan, W., Yan, R., Zhiru, G. and Chuangfu, C. 2008. Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication in vitro and in vivo by small interfering RNA. *Virol J* 5:86. PMID:18652701 PMCID:2515107. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-5-86>
- Pfeifer, A., Eigenbrod, S., Al-Khadra, S., Hofmann, A., Mitteregger, G., Moser, M., Bertsch, U. and Kretschmar, H. 2006. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* 116(12):3204-3210. PMID:17143329 PMCID:1679709. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI29236>
- Robalino, J., Bartlett, T. C., Chapman, R. W., Gross, P. S., Browdy, C. L. and Warr, G. W. 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: Inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter responses. *Dev Comp Immunol* 31:539-547. PMID:17109960. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.08.011>
- Robalino, J., Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P. and Warr, G. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J Virol* 78(19):10442-10448. PMID:15367610 PMCID:516398. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.19.10442-10448.2004>
- Rocha, I. P. 2011. Current status and trends in Brazilian shrimp farming. *INFOFISH Int* 5:24-28.
- Rout, N., Kumar, S., Jaganmohan, S. and Murugan, V. 2007. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* 25(15):2778-2786. PMID:17267079. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.056>
- Seehaus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. and Amdam, G. V. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (4):962-967. PMID:16418279 PMCID:1347965. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Timoney, P. J. and McCollum, W. H. 1988. Equine viral arteritis: epidemiology and control. *J Equine Vet Sci* 8(1):54-59. [http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806\(88\)80112-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806(88)80112-6)
- Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D. and Vlaskovits, J. M. 2005. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Res* 114(1-2):133-139. PMID:16043253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2005.06.006>

- Whangbo, J. S. and Hunter, C. P. 2008. Environmental RNA interference. *Trends Genet* 24(6):297-305. PMID:18450316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.007>
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H. and Hunter, C. P. 2007. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(25):10565-10570. PMID:17563372 PMCID:1965553. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611282104>
- Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M. and Van Hulst, M. C. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol* 78(4):2057-2061. PMID:14747570 PMCID:369486. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.4.2057-2061.2004>
- Zhan, W. B. and Wang, Y. H. 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J Aquat Anim Health* 10:405-410. [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667\(1998\)010%3C0405:WSSVIO%3E2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8667(1998)010%3C0405:WSSVIO%3E2.0.CO;2)
- Zhou, X., Wheeler, M. M., Oi, F. M. and Scharf, M. E. 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem Mol Biol* 38(8):805-815. PMID:18625404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.05.005>

Aplicações Médicas da RNAi

Capítulo

4

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira¹ e Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes²

¹*Depto. de Biologia, FFCLRP, USP*

²*Depto. de Genética Médica, FCM, UNICAMP*

Introdução

Ensaio clínico visando a utilização terapêutica experimental em humanos iniciaram-se por volta de 2004 (Check, 2004a, 2004b), sendo que os primeiros trabalhos científicos relatando os resultados foram publicados apenas a partir de 2007 (Koldehoff et al., 2007; Kleinman et al., 2008; Koldehoff e Elmaagacli, 2009; Leachman et al., 2010; Davis et al., 2010). Vários dos trabalhos iniciais envolviam o combate a tumores, porém foi o grupo de Davis et al. (2010) que comprovou, em nível molecular, a ocorrência do processo de RNAi *in vivo* em humanos, ganhando, portanto, maior notoriedade.

Não obstante, inúmeras outras aplicações biomédicas do silenciamento gênico têm sido contempladas em modelos animais, com perspectiva de aplicação médica. Apresentaremos aqui uma *breve compilação* de algumas das principais, nas seguintes categorias: (i) controle de patógenos; (ii) tratamento de doenças genéticas; (iii) combate a tumores; (iv) tratamento ou controle de doenças complexas; (v) modulação do comportamento e dor; e (vi) potenciais aplicações adicionais.

Combate a Patógenos

O combate a um patógeno baseia-se no conceito de silenciar um gene essencial deste organismo ou de um fator do hospedeiro que seja necessário para sua replicação.

Príons são agentes patogênicos incomuns, atualmente definidos como proteínas que naturalmente são codificadas por mamíferos (PrP^C) ou leveduras, mas que, quando enoveladas erroneamente (PrP^{Sc}), levam à formação de agregados intracelulares induzindo a morte neuronal. Aparentemente, PrP^{Sc} é capaz de converter PrP^C em PrP^{Sc}, sendo este o mecanismo proposto para a *replicação* do prion. Entre as doenças causadas

Cópia gratuita - venda proibida

por príons em humanos estão: Insônia Familiar Fatal (FFI), *kuru*, doença de *Creutzfeldt-Jakob* (CJD) e doença de *Gerstmann-Straussler-Scheinker* (GSS).

Assim, o combate a príons pode ser feito silenciando o gene que codifica a proteína PrP^c (Pfeifer et al., 2006; White et al., 2008) ou de um elemento do hospedeiro necessário para sua replicação, como o receptor da laminina (Leucht et al., 2003). No primeiro caso, como a proteína príon celular exerce um papel no hospedeiro, as implicações de seu silenciamento devem ser consideradas de acordo com o tipo celular (Bodrikov et al., 2011).

Um dos exemplos da pesquisa nesta área envolveu a produção de camundongos quiméricos através da transdução de células-tronco embrionárias com vetores lentivirais expressando um shRNA contra PrP^c. Animais com níveis diversos de quimerismo foram obtidos, sendo que aqueles com maior grau de células cerebrais expressando o shRNA apresentaram uma taxa de sobrevivência estendida diante da infecção com PrP^{Sc} (Pfeifer et al., 2006).

O combate a vírus através da RNAi é um processo que apresenta mais possibilidades. Isto porque os vírus apresentam uma grande variedade de potenciais alvos (genes) envolvidos em diferentes etapas de seu ciclo de replicação. Pelo fato de os vírus necessariamente exporem seu material genético no ambiente celular, tornam-se alvos frágeis do sistema de RNAi. Independente do tipo de genoma (fita simples ou dupla; DNA ou RNA) todo e qualquer vírus é susceptível, a princípio, ao silenciamento gênico, uma vez que todos expressam a informação gênica na forma de RNA. Contudo, é importante notar que há vírus que codificam supressores de PTGS (RNAi), sendo então capazes de burlar o sistema (Burguán, 2008; Rawlings et al., 2011).

siRNAs contra vírus têm menores chances de promoverem um silenciamento cruzado atingindo alvos celulares (*off-targeting effect*), uma vez que as sequências virais são muito distintas das do hospedeiro. Por outro lado, as elevadas taxas de mutação de muitos vírus podem permitir o escape de linhagens variantes durante o tratamento, evento já observado em laboratório (Gitlin et al., 2002; Konishi et al., 2006). O ressequenciamento do vírus permite o desenho de novos siRNAs funcionais, contudo este processo pode se repetir indefinidamente *a priori*. Uma alternativa para este problema é o uso de coquetéis de siRNAs: um conjunto de moléculas direcionadas contra vários alvos do vírus simultaneamente (Grimm e Kay, 2007; Zhou et al., 2011). Tal estratégia exerceria uma pressão seletiva tão forte que dificultaria grandemente o surgimento de linhagens resistentes (Figura 1).

O silenciamento de receptores celulares é também uma abordagem muito interessante, impedindo a entrada do vírus nas células. Como o receptor é codificado pelo hospedeiro, a taxa de mutação é muito menor e não haveria os problemas apresentados anteriormente. Contudo, as implicações biológicas do silenciamento de um receptor celular devem ser bem analisadas para se evitar efeitos indesejados no hospedeiro.

As bactérias formam uma classe de patógenos mais dificilmente combatidos por RNAi devido a um ponto central: ao contrário dos vírus, elas não expõem seu material genético no ambiente celular, isto é, não estão sujeitas à RNAi do hospedeiro. Adicionalmente, os procariotos não apresentam a via de PTGS (RNAi). Paradoxalmente, alguns trabalhos relatam o silenciamento bem sucedido de genes bacterianos através da introdução de dsRNAs (Churikov et al., 2000; Yanagihara et al., 2006). No momento, a única forma consolidada de combate a bactérias é a indireta, silenciando genes do hospedeiro, necessários para sua aderência, entrada na célula ou replicação (Rickettsias, nos dois últimos casos) (Chan et al., 2009; Schubert-Unkmeir et al., 2010).

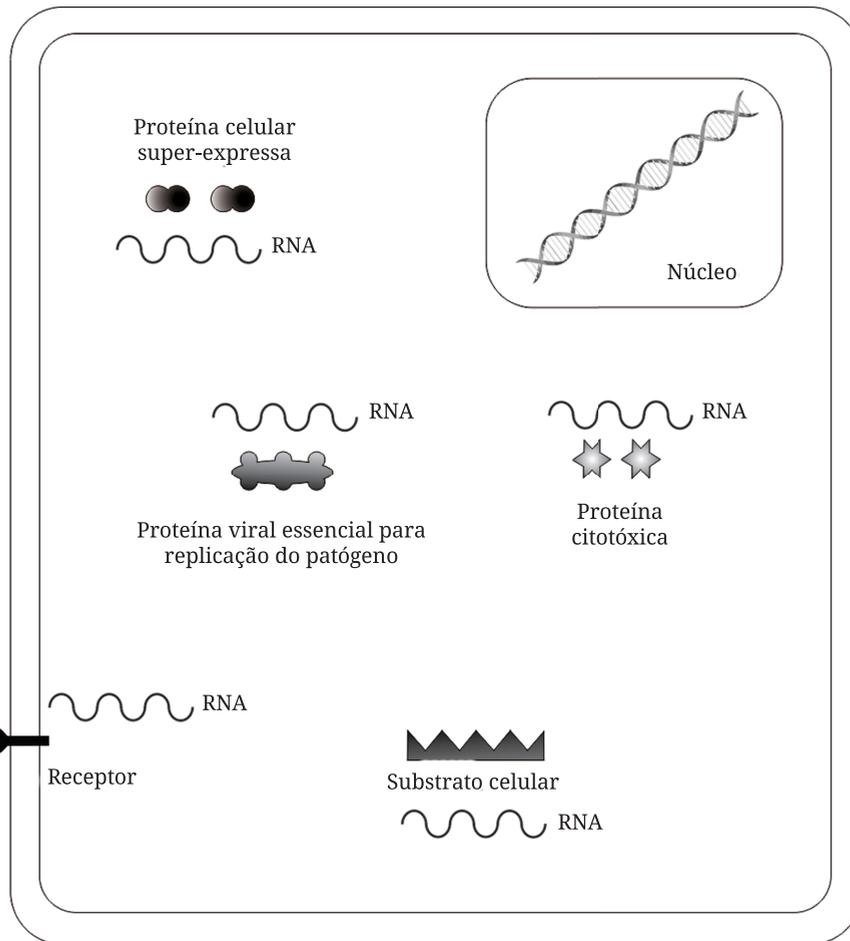


Figura 1. Estratégia de combate a vírus via RNAi. siRNAs contra diversos transcritos alvos podem ser administrados simultaneamente, objetivando gerar uma pressão seletiva tão forte que dificulte o surgimento de variantes resistentes. Exemplos de RNAs alvos são: (i) genes do hospedeiro associados com a entrada do patógeno (receptores); (ii) replicação (substratos celulares); (iii) proteínas virais citotóxicas; e (iv) proteína celular cuja superexpressão em resposta ao vírus pode gerar efeitos danosos. Todos estes RNAs alvos correspondentes podem ser silenciados por RNAi.

As leveduras e fungos, por outro lado, podem ser diretamente combatidos através da inoculação de dsRNAs contra genes essenciais do seu metabolismo. Neste caso, a maquinaria de silenciamento do patógeno agiria contra ele mesmo (Khatri e Rajam, 2007; Panepinto et al., 2009). O *knockdown* de alvos no hospedeiro também pode ser utilizado para impedir a entrada do patógeno (Chen et al., 2011; Huang et al., 2011; Long et al., 2012).

O combate a protozoários e outros parasitas é teoricamente ainda mais simples porque, além de fatores do hospedeiro (Okumura et al., 2008), esses patógenos apresentam genomas muito maiores (portanto, ricos em potenciais genes alvo) (Abdulla et al., 2008; Pereira et al., 2008); além disso, a taxa de mutação é menor que aquela apresentada pelos vírus.

Tratamento de Doenças Genéticas

As doenças genéticas, por muito tempo, permaneceram como uma classe de enfermidades para as quais, de uma forma geral, não havia cura ou tratamentos.

Grande parte das mutações descritas nas doenças genéticas levam a uma inativação gênica, *i.e.*, perda de função. Contudo existem algumas classes de mutação que podem, a princípio, ser tratadas com a RNAi, são elas: (i) mutações do tipo *ganho de função*; e (ii) mutações com efeito *dominante negativo*.

Mutações de ganho de função são aquelas nas quais o alelo mutado apresenta: (i) uma superexpressão, exemplificada pela síndrome de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (devido à duplicação do gene PMP22); ou (ii) uma *performance* acentuada, como a Hemoglobina Kempsey e acondroplasia.

Mutações do tipo dominante negativo são aquelas nas quais o alelo mutado é funcionalmente inativo e, através de mecanismos distintos, impede a atividade do alelo normal. Exemplos: a doença de *Creutzfeldt-Jakob* (CJD), doença de *Huntington*, *Alzheimer* e ataxias espinocerebelares.

Apenas recentemente alternativas potencialmente revolucionárias surgiram neste campo, com a utilização da RNAi. O conceito, neste caso, consiste em silenciar o alelo mutante, permitindo a expressão do alelo funcional em um ambiente celular favorável.

Testes preliminares em camundongos revelaram que a utilização de siRNAs trouxe uma melhora evidente nos quadros de *Huntington* (Franich et al., 2008; DiFiglia et al., 2007; Harper et al., 2005), esclerose lateral amiotrófica (Raoul et al., 2005; Ralph et al., 2005) e ataxias espinocerebelares (Xia et al., 2004).

Combate a Tumores

Tumores surgem em decorrência de uma série acumulativa de mutações que, em última instância, leva a uma proliferação celular descontrolada. Devido a sua natureza, os tumores podem ser combatidos via RNAi em diferentes frentes, silenciando genes essenciais no processo de: controle da proliferação (Su et al., 2009; Hagemann et al., 2012), angiogênese (Kargiotis et al., 2008; Salva et al., 2012), invasão (Wang et al., 2009), metástase (Huang et al., 2009), quimiossensibilização (Niu et al., 2008), dentre outras possibilidades.

Com os recentes avanços no sequenciamento de tecidos tumorais (Maher et al., 2009), novos alvos poderão ser descobertos e investigados no tratamento para cada tipo específico de câncer.

Doenças Complexas

Doenças complexas são aquelas que apresentam *componentes genéticos* (predisposição hereditária) e *componentes ambientais desencadeadores* (dieta inadequada, sedentarismo, tabagismo, exposição excessiva ao sol). Além do próprio câncer, outros exemplos de doenças de natureza complexa são: obesidade, diabetes, epilepsia, psoríase, depressão e hipertensão.

Uma doença complexa apenas se manifestará se um determinado indivíduo apresentar a predisposição genética e estiver exposto ao fator ambiental desencadeador. Neste sentido, as doenças podem ser controladas (ou prevenidas) através da intervenção no componente genético via RNAi, por exemplo: hipertensão (He et al., 2009) e depressão (Thakker et al., 2005).

Modulação do Comportamento e da Dor

A RNAi também pode ser utilizada no campo do comportamento. A modulação da atividade alimentar (Hommel et al., 2006; Sheng et al., 2006; Yang et al., 2009; De Backer et al., 2010), sexual (Musatov et al., 2006), consumo de etanol (Lasek et al., 2007), hiperlocomoção derivada do uso de cocaína (Boyer e Dreyer, 2008), além do comportamento social juvenil e ansiedade (Jessen et al., 2010) podem ser conduzidos.

A modulação da dor (anestesia) também pode ser realizada através do silenciamento de receptores para dor (Garraway et al., 2009). Tal procedimento se assemelha à ação dos anestésicos convencionais por ter efeito temporário, com as vantagens de ser uma molécula orgânica (RNA) e potencialmente mais específica que os anestésicos atuais.

Outras Potenciais Aplicações

Há muitos anos se sabe que a inativação de determinados genes leva a considerável extensão da longevidade em diversas espécies de leveduras (Fabrizio et al., 2001), vermes (Kimura et al., 1997), moscas (Lin et al., 1998) e camundongos (Holzenberger et al., 2003). Como o processo de inativação gênica, nestes casos, envolve a manipulação do genoma através de técnicas de engenharia genética, trata-se de um processo caro, demorado e eticamente questionável em humanos.

Contudo, a RNAi pode promover o mesmo efeito em animais (Budovskaya et al., 2008). Em especial, como o processo é temporário e não envolve modificações no genoma, ele poderia ser considerado, no futuro, em situações específicas. Neste caso, injeções contínuas de um siRNA na corrente sanguínea, alcançando todos os tecidos, poderia promover extensão da longevidade.

Por fim, o desenvolvimento de espermicidas, anticoncepcionais e anticaspas baseados em RNA seria uma entre muitas outras potenciais aplicações. É importante ressaltar que, como todo desenvolvimento tecnológico, a RNAi também poderia ser usada de forma inadequada, no *dopping* genético por exemplo, objetivando um aumento muscular (dupla musculatura, Grobet et al., 1997).

Bibliografia

- Abdulla, M. H., O'Brien, T., Mackey, Z. B., Sajid, M., Grab, D. J. and McKerrow, J. H. 2008. RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L Affects Disease Progression in a Mouse Model. *PLoS Negl Trop Dis* 2(9):e298. PMID:18820745 PMCID:2553486. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000298>
- Bodrikov, V., Solis, G. P. and Stuermer, C. A. 2011. Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. *J Neurosci* 31(49):18013-25. PMID:22159115. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4729-11.2011>
- Boyer, F. and Dreyer, J. L. 2008. The role of gamma-synuclein in cocaine-induced behaviour in rats. *Eur J Neurosci* 27(11):2938-51. PMID:18588534. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06198.x>
- Budovskaya, Y. V., Wu, K., Southworth, L. K., Jiang, M., Tedesco, P., Johnson, T. E. and Kim, S. K. 2008. An *elt-3/elt-5/elt-6* GATA transcription circuit guides aging in *C. elegans*. *Cell* 134(2):291-303. PMID:18662544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.044>
- Burguán, J. 2008. Role of silencing suppressor proteins. *Methods Mol Biol* 451:69-79. PMID:18370248. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4_5

- Chan, Y. G., Cardwell, M. M., Hermanas, T. M., Uchiyama, T. and Martinez, J. J. 2009. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol* 11(4):629-44. PMID:19134120 PMCID:2773465. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x>
- Check, E. 2004a. Firm sets sights on gene silencing to protect vision. *Nature* 430(7002):819. PMID:15318183. <http://dx.doi.org/10.1038/430819b>
- Check, E. 2004b. RNA therapy beckons as firms prepare for clinical trials. *Nature* 429(6994):792. PMID:15215824. <http://dx.doi.org/10.1038/429792b>
- Chen, Y., Chen, J., Wen, H., Gao, P., Wang, J., Zheng, Z. and Gu, J. 2011. S100A10 downregulation inhibits the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by murine brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog* 51:96-100. PMID:21621598. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2011.05.003>
- Churikov, N. A., Chistiakova, L.G., Zavi'gel'skiĭ, G. B. and Manukhov, I. V. 2000. [RNA interference in *Escherichia coli* cells: the expression of molecules that are complementary to the lon gene mRNA in parallel orientation]. *Genetika* 36(1):23-7. In Russian. PMID:10732276.
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D. and Ribas, A. 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464(7291):1067-70. PMID:20305636 PMCID:2855406. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08956>
- De Backer, M. W., Brans, M. A., Van Rozen, A. J., Van der Zwaal, E. M., Luijendijk, M. C., Garner, K. G., De Krom, M., Van Beekum, O., La Fleur, S. E. and Adan, R. A. 2010. Suppressor of cytokine signaling 3 knockdown in the mediobasal hypothalamus: counterintuitive effects on energy balance. *J Mol Endocrinol* 45(5):341-53. PMID:20819948. <http://dx.doi.org/10.1677/JME-10-0057>
- DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Manoharan, M., Sah, D. W., Zamore, P. D. and Aronin, N. 2007. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(43):17204-9. PMID:17940007 PMCID:2040405. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708285104>
- Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M. and Longo, V. D. 2001. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292(5515):288-90. PMID:11292860. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1059497>
- Franich, N. R., Fitzsimons, H. L., Fong, D. M., Klugmann, M., During, M. J. and Young, D. 2008. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther* 16(5):947-56. PMID:18388917. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2008.50>
- Garraway, S. M., Xu, Q. and Inturrisi, C. E. 2009. siRNA-Mediated Knockdown of the NR1 Subunit Gene of the NMDA Receptor Attenuates Formalin-Induced Pain Behaviors in Adult Rats. *J Pain* 10(4):380-90. PMID:19185544 PMCID:2699265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2008.09.013>
- Gitlin, L., Karelsky, S. and Andino, R. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* 418(6896):430-4. PMID:12087357. <http://dx.doi.org/10.1038/nature00873>
- Grimm, D. and Kay, M. A. 2007. Combinatorial RNAi: a winning strategy for the race against evolving targets? *Mol Ther* 15(5):878-88. PMID:17311009.
- Grobet, L., Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménéssier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. and Georges, M. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat Genet* 17(1):71-4. PMID:9288100. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0997-71>
- Hagemann, S., Kuck, D., Stresemann, C., Prinz, F., Brueckner, B., Mund, C., Mumberg, D. and Sommer, A. 2012. Antiproliferative Effects of DNA Methyltransferase 3B Depletion Are Not Associated with DNA Demethylation. *PLoS One* 7(5):e36125. PMID:22563479 PMCID:3341356. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036125>

- Harper, S. Q., Staber, P. D., He, X., Eliason, S. L., Martins, I. H., Mao, Q., Yang, L., Kotin, R. M., Paulson, H. L. and Davidson, B. L. 2005. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(16):5820-5. PMID:15811941 PMCID:556303. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501507102>
- He, J., Bian, Y., Gao, F., Li, M., Qiu, L., Wu, W., Zhou, H., Liu, G. and Xiao, C. 2009. RNA interference targeting the ACE gene reduced blood pressure and improved myocardial remodelling in SHR. *Clin Sci (Lond)* 116(3):249-55. PMID:18605985. <http://dx.doi.org/10.1042/CS20080048>
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Gélóën, A., Even, P. C., Cervera, P. and Le Bouc, Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421(6919):182-7. PMID:12483226. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01298>
- Hommel, J. D., Trinko, R., Sears, R. M., Georgescu, D., Liu, Z. W., Gao, X. B., Thurmon, J. J., Marinelli, M. and DiLeone, R. J. 2006. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51(6):801-10. PMID:16982424. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.023>
- Huang, Y. H., Bao, Y., Peng, W., Goldberg, M., Love, K., Bumcrot, D. A., Cole, G., Langer, R., Anderson, D. G. and Sawicki, J. A. 2009. Claudin-3 gene silencing with siRNA suppresses ovarian tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(9):3426-30. PMID:19208807 PMCID:2651300. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0813348106>
- Huang, S. H., Long, M., Wu, C. H., Kwon-Chung, K. J., Chan, Y. C., Chi, F., Lee, S. and Jong, A. 2011. Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3). *J. Biol. Chem* 286:34761-34769. PMID:21693704 PMCID:3186382. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.219378>
- Jessen, H. M., Kolodkin, M. H., Bychowski, M. E., Auger, C. J. and Auger, A. P. 2010. The nuclear receptor corepressor has organizational effects within the developing amygdala on juvenile social play and anxiety-like behavior. *Endocrinology* 151(3):1212-20. PMID:20051490 PMCID:2840691. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0594>
- Kargiotis, O., Chetty, C., Gondi, C. S., Tsung, A. J., Dinh, D. H., Gujrati, M., Lakka, S. S., Kyritsis, A. P. and Rao, J. S. 2008. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against MMP-2 mRNA results in impaired invasion and tumor-induced angiogenesis, induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth in vivo in glioblastoma. *Oncogene* 27(35):4830-40. PMID:18438431 PMCID:2574662. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.122>
- Khatrri, M. and Rajam, M. V. 2007. Targeting polyamines of *Aspergillus nidulans* by siRNA specific to fungal ornithine decarboxylase gene. *Med Mycol* 45(3):211-20. PMID:17464842. <http://dx.doi.org/10.1080/13693780601158779>
- Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y. and Ruvkun, G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277(5328):942-6. PMID:9252323. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5328.942>
- Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., Albuquerque, R. J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Karikó, K., Ambati, B. K., Wilgus, T. A., DiPietro, L. A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J. R., Taylor, E. W. and Ambati, J. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452(7187):591-7. PMID:18368052 PMCID:2642938. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06765>
- Koldehoff, M. and Elmaagacli, A. H. 2009. Therapeutic targeting of gene expression by siRNAs directed against BCR-ABL transcripts in a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Methods Mol Biol* 487:451-66. PMID:19301661. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-547-7_22
- Koldehoff, M., Steckel, N. K., Beelen, D. W. and Elmaagacli, A. H. 2007. Therapeutic application of small interfering RNA directed against *bcr-abl* transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Clin Exp Med* 7(2):47-55. PMID:17609876. <http://dx.doi.org/10.1007/s10238-007-0125-z>

- Konishi, M., Wu, C. H., Kaito, M., Hayashi, K., Watanabe, S., Adachi, Y. and Wu, G.Y. 2006. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. *J Viral Hepat* 13(11):756-61. PMID:17052275. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00752.x>
- Lasek, A. W, Janak, P. H, He, L, Whistler, J. L. and Heberlein, U. 2007. Downregulation of mu opioid receptor by RNA interference in the ventral tegmental area reduces ethanol consumption in mice. *Genes Brain Behav* 6(8):728-35. PMID:17428267. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00303.x>
- Leachman, S. A., Hickerson, R. P., Schwartz, M. E., Bullough, E. E., Hutcherson, S. L., Boucher, K. M., Hansen, C. D., Eliason, M. J., Srivatsa, G. S., Kornbrust, D. J., Smith, F. J., McLean, W. I., Milstone, L. M. and Kaspar, R. L. 2010. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. *Mol Ther* 18(2):442-6. PMID:19935778 PMCID:2839285. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.273>
- Leucht, C., Simoneau, S., Rey, C., Vana, K., Rieger, R., Lasmézas, C. I. and Weiss, S. 2003. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* 4(3):290-5. PMID:12634848 PMCID:1315896. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.embor768>
- Lin, Y. J., Seroude, L. and Benzer, S. 1998. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 282(5390):943-6. PMID:9794765. <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5390.943>
- Long, M., Huang, S. H., Wu, C. H., Shackelford, G. M. and Jong, A. 2012. Lipid raft/caveolae signaling is required for *Cryptococcus neoformans* invasion into human brain microvascular endothelial cells. *J Biomed Sci* 19:19. PMID:22316086 PMCID:3308189. <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-19-19>
- Maher, C. A., Kumar-Sinha, C., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Jing, X., Sam, L., Barrette, T., Palanisamy, N. and Chinnaiyan, A. M. 2009. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458(7234):97-101. PMID:19136943 PMCID:2725402. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07638>
- Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D. W., Kaplitt, M. G. and Ogawa, S. 2006. RNAi-mediated silencing of estrogen receptor {alpha} in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(27):10456-60. PMID:16803960 PMCID:1502479. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0603045103>
- Niu, J., Li, X. N., Qian, H. and Han, Z. 2008. siRNA mediated the type 1 insulin-like growth factor receptor and epidermal growth factor receptor silencing induces chemosensitization of liver cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(4):503-13. PMID:17901981. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-007-0314-x>
- Okumura, C. Y., Baum, L. G. and Johnson, P. J. 2008. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* 10(10):2078-90. PMID:18637021. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01190.x>
- Panepinto, J., Komperda, K., Frases, S., Park, Y. D., Djordjevic, J. T, Casadevall, A. and Williamson, P. R. 2009. Sec6-dependent sorting of fungal extracellular exosomes and laccase of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 71(5):1165-76. PMID:19210702. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06588.x>
- Pereira, T. C., Pascoal, V. D., Marchesini, R. B., Maia, I. G., Magalhães, L. A., Zanotti-Magalhães, E. M. and Lopes-Cendes, I. 2008. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Exp Parasitol* 118(4):619-23. PMID:18237732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.017>
- Pfeifer, A, Eigenbrod, S, Al-Khadra, S, Hofmann, A, Mitteregger, G, Moser, M, Bertsch, U. and Kretzschmar, H. 2006. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest* 116(12):3204-10. PMID:17143329 PMCID:1679709. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI29236>

- Ralph, G. S., Radcliffe, P. A., Day, D. M., Carthy, J. M., Leroux, M. A., Lee, D. C., Wong, L. F., Bilsland, L. G., Greensmith, L., Kingsman, S. M., Mitrophanous, K. A., Mazarakis, N. D. and Azzouz, M. 2005. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 11(4):429-33. PMID:15768029. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1205>
- Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J. C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C. E. and Aebischer, P. 2005. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11(4):423-8. PMID:15768028. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1207>
- Rawlings, R. A., Krishnan, V. and Walter, N. G. 2011. Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete Dicer and RISC via multiple turnover. *J Mol Biol* 408(2):262-76. PMID:21354178 PMCid:3073027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.038>
- Salva, E., Kabasakal, L., Eren, F., Ozkan, N. Cakalağaoğlu, F. and Akbuğa, J. 2012. Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer *in vivo*. *Nucleic Acid Ther* 22(1):40-8. PMID:22217324.
- Schubert-Unkmeir, A., Konrad, C., Slanina, H., Czapek, F., Hebling, S. and Frosch, M. 2010. Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. *PLoS Pathog* 6:e1000874. PMID:20442866 PMCid:2861698. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000874>
- Sheng, G., Chang, G. Q., Lin, J. Y., Yu, Z. X., Fang, Z. H., Rong, J., Lipton, S. A., Li, S. H., Tong, G., Leibowitz, S. F. and Li, X. J. 2006. Hypothalamic huntingtin-associated protein 1 as a mediator of feeding behavior. *Nat Med* 12(5):526-33. PMID:16604089. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1382>
- Su, J., Chen, X. and Kanekura, T. 2009. A CD147-targeting siRNA inhibits the proliferation, invasiveness, and VEGF production of human malignant melanoma cells by down-regulating glycolysis. *Cancer Lett* 273(1):140-7. PMID:18778892. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.07.034>
- Thakker, D. R., Natt, F., Hüsken, D., Van der Putten, H., Maier, R., Hoyer, D. and Cryan, J. F. 2005. siRNA-mediated knockdown of the serotonin transporter in the adult mouse brain. *Mol Psychiatry* 10(8):782-9, 714.
- Wang, Y. H., Wang, Z. X., Qiu, Y., Xiong, J., Chen, Y. X., Miao, D. S. and De, W. 2009. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of insulin-like growth factor-1 receptor inhibits growth, reduces invasion, and enhances radiosensitivity in human osteosarcoma cells. *Mol Cell Biochem* 327(1-2):257-66. PMID:19229591. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-009-0064-y>
- White, M. D., Farmer, M., Mirabile, I., Brandner, S., Collinge, J. and Mallucci, G. R. 2008. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(29):10238-43. PMID:18632556 PMCid:2474561. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802759105>
- Xia, H., Mao, Q., Eliason, S. L., Harper, S. Q., Martins, I. H., Orr, H. T., Paulson, H. L., Yang, L. and Kotin, R. M. and Davidson, B. L. 2004. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 10(8):816-20. PMID:15235598. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1076>
- Yanagihara, K., Tashiro, M., Fukuda, Y., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Tomono, K., Mizuta, Y., Tsukamoto, K. and Kohno, S. 2006. Effects of short interfering RNA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 57(1):122-6. PMID:16344286. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki416>
- Yang, L., Scott, K. A., Hyun, J., Tamashiro, K. L., Tray, N., Moran, T. H. and Bi, S. 2009. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci* 29(1):179-90. PMID:19129396 PMCid:2742174. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009>
- Zhou, J., Neff, C. P., Liu, X., Zhang, J., Li, H., Smith, D. D., Swiderski, P., Aboellail, T., Huang, Y., Du, Q., Liang, Z., Peng, L., Akkina, R. and Rossi, J. J. 2011. Systemic administration of combinatorial dsRNAs via nanoparticles efficiently suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Mol Ther* 19(12):2228-38. PMID:21952167 PMCid:3242666. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2011.207>

Moléculas Utilizadas em RNAi e Métodos de Obtenção

Capítulo

5

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira¹

¹Depto. de Biologia, FFCLRP, USP

Introdução

Dois tipos de moléculas são as mais referenciadas em estudos utilizando RNAi: i) siRNAs e ii) dsRNAs. Apesar de serem as principais desencadeadoras do processo de silenciamento gênico, existem alternativas que podem ser úteis em cenários experimentais específicos. Abordaremos aqui 11 tipos: i) dsRNA; ii) hpRNA; iii) siRNA; iv) siRNAs bifurcados; v) substrato de dicer; vi) esiRNA; vii) shRNA; viii) shRNAs multiméricos; ix) aiRNA; x) siRNA de 16 pb; e xi) siRNAs coesivos. Adicionalmente serão apresentadas algumas formas de obtenção, possíveis modificações químicas visando maior estabilidade, assim como estratégias para produção de bibliotecas de shRNA.

Moléculas Extensas de RNA de Dupla Fita (dsRNAs)

O *double-stranded RNA* (dsRNA) foi o primeiro tipo de molécula a ser utilizado em experimentos de RNAi, classicamente apresentando de 300 pb a 800 pb (Figura 1) (Fire et al., 1998). Moléculas menores que 300 pb também são funcionais, embora nem sempre tão eficientes (Andersson et al., 2006).

Apesar de funcionais, moléculas de dsRNA muito longas (acima de 800 pb) também podem ser um problema, agora por outra questão: silenciamento cruzado (*off-targeting*). A chance de um dsRNA longo demais (*e.g.*, 2000 pb) apresentar segmentos com identidade (ainda que pequena) com outros genes é considerável, o que poderia levar ao silenciamento não intencional deste(s) outro(s) transcrito(s), comprometendo a análise (Ma et al., 2006). DsRNAs são as moléculas de escolha para quase todos os organismos (exceto mamíferos), pois praticamente sempre levam ao silenciamento gênico potente.

Elas geralmente são produzidas por transcrição *in vitro* (IVT) de cDNAs modificados via PCR (Figura 2) (Goto et al., 2003) ou clonados em vetores que apresentam promotores em oposição (Fire et al., 1998; Timmons e Fire, 1998) (Figura 3A).

Cópia gratuita - venda proibida

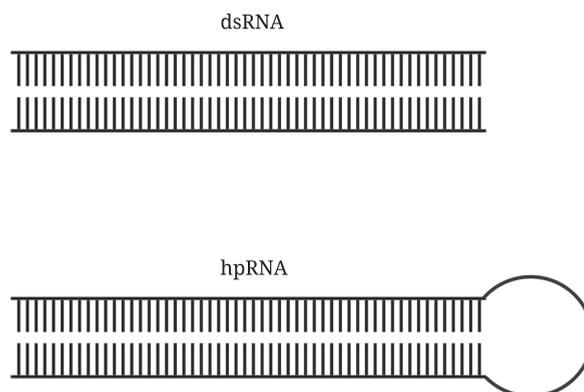


Figura 1. Estrutura do dsRNA e hpRNA. Estas moléculas são as mais utilizadas para desencadear RNAi na maioria das espécies, exceto mamíferos.

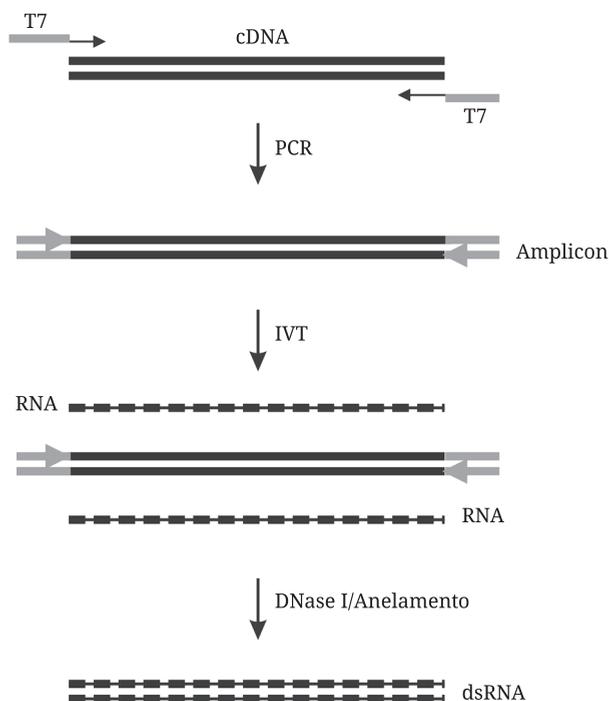


Figura 2. Produção de dsRNAs por meio da transcrição *in vitro* de um molde modificado por PCR. O cDNA do gene de interesse é submetido a uma PCR com *primers* quiméricos: parte complementar ao alvo, parte não complementar ao alvo (correspondente ao promotor da T7 RNA polimerase). O amplicon gerado, contendo o promotor T7, pode então ser submetido à transcrição *in vitro* para síntese de dsRNA. As setas mais largas representam as sequências promotoras inseridas no amplicon. A linha irregular representa o RNA gerado pela transcrição.

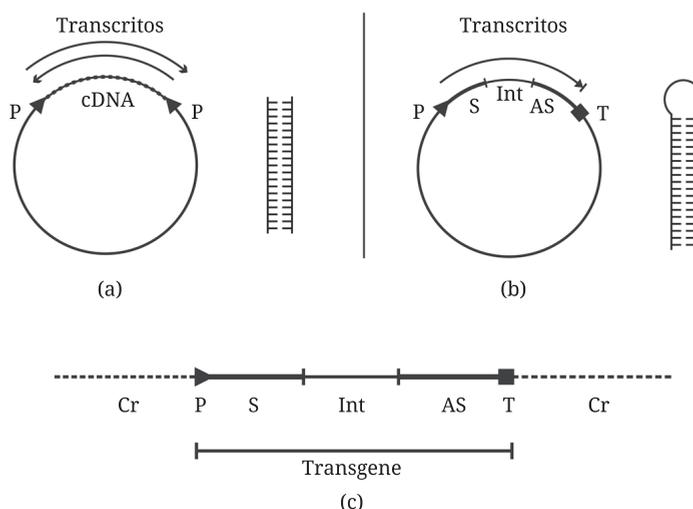


Figura 3. Síntese de dsRNA e hpRNAs. A produção de dsRNA (A) e hpRNAs (B) por meio de transcrição *in vitro* de seqüências clonadas em vetores ou transgenes (C). Note que no caso dos transgenes, a construção pode ser tanto no formato de promotores em oposição (dsRNA), quanto no formato com um único promotor (hpRNA, representado). P: promotor; T: terminador; S: seqüência senso; Int: íntron; AS: seqüência antissenso; Cr: cromossomo.

Todos os métodos requerem o cDNA do gene de interesse, obtido via RT-PCR convencional. A seguir, este cDNA é submetido a uma PCR com *primers* quiméricos de 40 nucleotídeos de extensão. Os 20 nucleotídeos (nt) da extremidade 5' correspondem a uma seqüência do promotor da T7 RNA polimerase; os 20 nt da extremidade 3' são complementares ao cDNA (Tabela 1) (Yu et al., 2002; Donzé e Picard 2002). Portanto, o amplicon gerado será 40 pb mais extenso que o cDNA original, contendo o promotor T7 (20 pb) em cada extremidade. Esta molécula deve ser precipitada da reação de PCR (via etanol ou isopropanol) para então ser submetida à transcrição *in vitro*. Entre os vários *kits* comercialmente disponíveis para este fim, destaca-se o *AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit*, da Epicentre, que produz até 7,5 mg de RNA.

Tabela 1. Seqüência nucleotídica do promotor T7 e de um exemplo de *primer* quimérico. É importante observar que a seqüência do *primer* quimérico não deve apresentar estruturas secundárias. N₂₀ corresponde à seqüência de aproximadamente vinte nucleotídeos do *primer* específico para o gene alvo.

Tipo	Seqüência nucleotídica
promotor T7	5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'
<i>primer</i> quimérico	5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG N ₂₀ 3'

Grupo de RNA (hpRNA)

Os *long hairpin RNAs* (hpRNAs ou lhRNA) são funcionalmente semelhantes aos dsRNAs, porém apresentam uma seqüência espaçadora (alça - *loop*) que liga covalentemente ambas as fitas (senso e antissenso) em uma única molécula, semelhante a um grampo de cabelo (do

inglês *hairpin*) (Figura 1). A alça mantém as duas sequências senso e antissenso fisicamente unidas, facilitando seu anelamento.

HpRNAs podem ser gerados por meio da clonagem de cDNAs em vetores plasmidiais/virais (Figura 3B) (Huang et al., 2007) ou transgênese (Figura 3C) (Kennerdell e Carthew, 2000; Kim et al., 2008; Soler et al., 2012), sendo a alça, geralmente, constituída por uma sequência intrônica de algumas centenas de nucleotídeos.

Pequeno RNA de Interferência (siRNA)

Depois de sua descoberta, o silenciamento gênico desencadeado por dsRNAs, foi reproduzido e confirmado em vários laboratórios de todo o mundo, a expectativa de aplicá-lo em mamíferos foi imensa. Contudo havia uma questão essencial: dsRNAs maiores que 30 pb ativam a RNase L (que promove a degradação generalizada de RNAs) (Player e Torrence, 1998) e a proteína quinase R (PKR), que fosforila e inativa o fator de iniciação de tradução eIF2 α , levando à parada generalizada da tradução e conseqüente à morte celular (Clemens e Elia, 1997).

Durante algum tempo determinadas estratégias tentaram contornar esse problema em mamíferos com o uso de células que não apresentam a via de PKR ativa (como oócitos, células embrionárias ou tumorais) (Svoboda et al., 2000, 2001; Ui-Tei et al., 2000; Billy et al., 2001). Contudo um verdadeiro *breakthrough* seria necessário para estender de maneira ampla o uso da RNAi em mamíferos.

Baseados em uma série de evidências de que o processo de RNAi envolvia também pequenos duplexes de RNA (Hamilton e Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000; Yang et al., 2000; Parrish et al., 2000; Thomas et al., 2001; Zamore et al., 2000), um grupo do Instituto *Max Planck* demonstrou em 2001 pela primeira vez que, de fato, eles eram capazes de promover RNAi em células de drosófila (Elbashir et al., 2001b) e também em células humanas, sem ativar a PKR (Elbashir et al., 2001a).

Desde então, os siRNAs (do inglês: *small interfering RNAs* - pequenos RNAs de interferência) são as moléculas de escolha para mamíferos (Orvedahl et al., 2011; Pieraets et al., 2012) e podem ser adquiridos comercialmente por uma grande variedade de empresas, em diversas escalas de síntese e com diversas modificações químicas possíveis. O siRNA apresenta algumas características clássicas: i) é um duplex de RNA composto por fitas de 21 nt; ii) dois nt livres na extremidade 3' OH; e iii) extremidade 5' com um grupo fosfato (Figura 4).

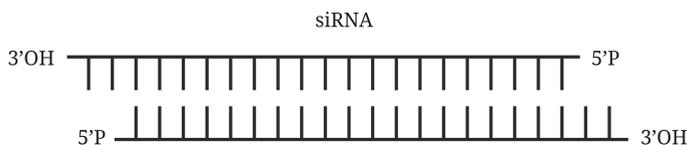


Figura 4. Estrutura molecular do siRNA. Devido ao pareamento desalinhado, a região de dupla fita corresponde apenas a 19 pb.

Há, contudo, uma considerável limitação: siRNAs distintos contra um mesmo alvo não são igualmente eficazes em promover RNAi (Holen et al., 2002), podendo, cada um deles, levar a níveis de silenciamento que variam de 0% a 99%. Vários são os fatores que definem a eficiência de um determinado siRNA, entre os quais: i) características termodinâmicas (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003); ii) estrutura secundária do transcrito alvo (Brown et al., 2005), estrutura secundária do oligo guia (Patzel et al., 2005), entre outros, muitas delas ainda desconhecidos. É devido ao fato de que um dsRNA será processado em um conjunto de siRNAs (e que pelo menos parte deles será eficaz) é que dsRNAs sempre são funcionais, ao passo que siRNAs usados individualmente não necessariamente são eficientes.

Desta forma, a escolha de um siRNA não deve ser aleatória, mas seguir um caminho racional. Deve-se procurar se já há siRNAs *funcionais* publicados na literatura ou em bancos de “siRNAs experimentalmente *validados*”, fornecidos por empresas comerciais. Apenas em caso negativo, deve-se utilizar *softwares* para a escolha de alvos dentro do gene alvo de interesse.

Os siRNAs produzidos por síntese química e disponíveis comercialmente em diversas escalas constituem atualmente a principal forma de obtenção destas moléculas. É possível, contudo, produzir siRNAs em laboratório por meio de transcrição *in vitro* seguida obrigatoriamente por tratamento com fosfatase (Donzé e Picard, 2002; Yu et al., 2002; Kim et al., 2004). Esta prática, porém, está em extinção por ser laboriosa, apresentar o risco de ativação da via de interferon e por não ser economicamente competitiva com os siRNAs comerciais.

siRNA Bifurcado

Uma das principais características de um siRNA funcional é sua instabilidade termodinâmica na extremidade 5' da fita antissenso (oligo guia). Assim, em uma visão simplista, a porção 5' deve ser rica em A e T, ao passo que a porção 3', rica em C e G (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al., 2003).

Os siRNAs bifurcados [*fork(ed)* siRNAs ou *frayed* siRNAs] utilizam-se desta premissa: a porção 5' da fita antissenso apresenta pareamentos errados (A:G; C:T; G:T; etc.), tornando-a artificialmente ainda mais instável (Figura 5) (Schwarz et al., 2003; Hohjoh, 2004; Ohnishi et al., 2005). Obviamente, os pareamentos errados originam-se de modificações de nucleotídeos na fita senso, que não será necessária no processo de identificação do transcrito alvo. A fita antissenso permanece inalterada.

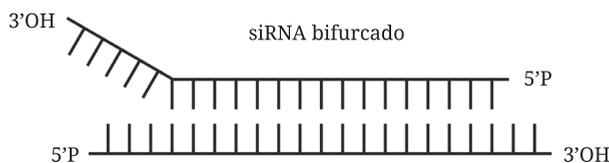


Figura 5. Estrutura molecular do siRNA bifurcado. A instabilidade termodinâmica acentuada da porção 5' do oligo guia (fita inferior) é artificialmente promovida por pareamentos incorretos.

Apesar de funcionais, tais moléculas não são amplamente utilizadas, provavelmente devido a falta de conhecimento e à necessidade de alterar nucleotídeos no oligo passageiro (fita senso) durante o *design*. Não se sabe o quanto esses pareamentos imperfeitos comprometem o reconhecimento do siRNA bifurcado pelas proteínas da via de PTGS. Adicionalmente, uma dúvida sobre a importância da instabilidade termodinâmica em mamíferos, conseqüentemente sobre os siRNA bifurcados nestas espécies, foi lançada recentemente (Hong et al., 2008).

Substrato de Dicer

Dentro da célula, o dsRNA é naturalmente processado em siRNAs por dicer, enzima esta que também conduz o oligo guia para o complexo RISC (revisto em Tijsterman e Plasterk, 2004). Postula-se que a administração na célula de siRNAs maduros (duplexes de 21 nt) contornem alguns desses passos, gerando um silenciamento subótimo.

Em 2005 foi apresentado um novo conceito de molécula desencadeadora, a *dicer substrate* (Figura 6): um duplex de RNA de 27 pb que seria *reconhecido, processado e conduzido* a RISC por intermédio de dicer, otimizando assim o silenciamento, e sem a ativação de PKR (Kim et al., 2005; Kubo et al., 2012).

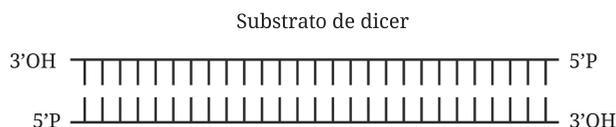


Figura 6. Estrutura molecular do substrato de dicer. Esta molécula se distingue do siRNA convencional por apresentar 27 pb e extremidades abrupatas.

Em alguns casos, os substratos de dicer podem ser até 100 vezes mais eficientes que siRNAs convencionais, porém são obviamente mais caros. Modificações nas sequências destas moléculas podem levar a uma clivagem direcional, permitindo a produção de um siRNA específico, entre os vários possíveis (Rose et al., 2005), reduzindo, assim, eventuais problemas de *off-targeting*.

siRNAs Preparados por Endoribonuclease (esiRNAs)

Esta abordagem baseia-se em gerar um *pool* de siRNAs a partir do processamento *in vitro* de dsRNAs (*dicing*) (Figura 7). Os esiRNAs (do inglês: *endoribonuclease-prepared siRNAs*, esiRNAs) constituem uma resposta interessante à questão da eficiência variável de siRNAs distintos, pois seu silenciamento é tão garantido quanto o de um dsRNA (Figura 8). Contudo, compartilha a mesma problemática referente a possíveis efeitos inespecíficos de um dsRNA longo (Ma et al., 2006).

A produção destas moléculas é mais laboriosa, pois necessita de alguns passos: i) clonagem do cDNA alvo em um sistema com 2 promotores em oposição; ii) transcrição *in vitro* (IVT) para produção do dsRNA; iii) *dicing in vitro*; e iv) purificação (Huang et al., 2011); contudo gera resultados satisfatórios. Dois tipos de endoribonucleases podem ser utilizados para produção de esiRNAs: i) RNase III de *E. coli*, que gera esiRNAs de aproximadamente 18 pb a 25 pb (Yang et al., 2002; Calegari et al., 2002); e ii) dicer humana recombinante, que gera esiRNAs de aproximadamente 21 pb e, portanto, *potencialmente*, mais eficientes (Gimenez-Barcons et al., 2007).

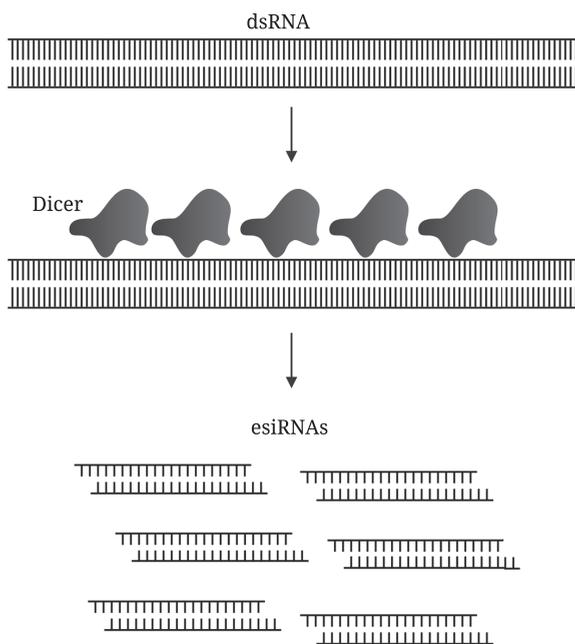


Figura 7. Síntese de esiRNAs. O dsRNA é produzido por uma das formas convencionais (fig. 2 e 3) e posteriormente sofre *dicing in vitro* (processamento por dicer), gerando um *pool* de esiRNAs.

Há empresas que comercializam tanto estas enzimas separadamente quanto *kits* completos com o sistema para IVT, *dicing* e purificação. Os esiRNAs são especialmente interessantes no controle de infecções virais em mamíferos (Gimenez-Barcons et al., 2007; Tan et al., 2007; Meng et al., 2008) por três importantes questões: i) o silenciamento é garantido; ii) não há ativação de PKR; e iii) mesmo tratando-se de um *pool* de siRNAs, os riscos de *off-targeting* são mínimos pela baixíssima similaridade entre sequências humanas e virais. Contudo, sua utilização em *screening* de genes envolvidos em processos específicos também é realizada (Słabicki et al., 2010).

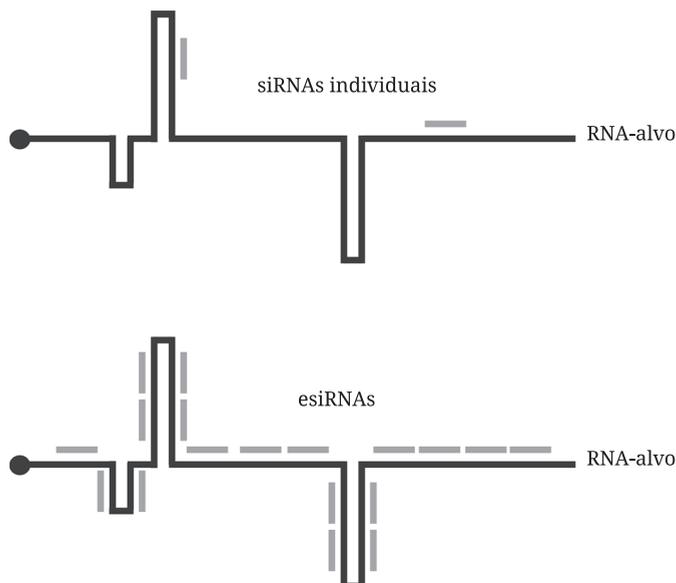


Figura 8. Comparação entre siRNAs e esiRNAs. siRNAs individuais podem ou não ser funcionais, devido a inúmeros fatores que não podem ser totalmente preditos. As imagens a seguir representam a estrutura secundária de um mesmo RNA alvo. Um siRNA (imagem superior, traço cinza à esquerda) que se pareie, por exemplo, em uma região inacessível no RNA alvo pode ser não funcional; o outro (imagem superior, direita) seria funcional. No caso de um *pool* de siRNAs, mesmo que parte dos duplexes não seja funcional (por questões de acessibilidade, termodinâmica, %GC ou outros) o *conjunto* será funcional, promovendo o silenciamento gênico.

Pequeno Grupo de RNA (shRNA)

O shRNA (do inglês: *short harpin RNA*) está para o siRNA assim como o hpRNA está para o dsRNA. A única diferença está na alça: neste caso seu tamanho varia geralmente de 5 nt a 9 nt de uma sequência aleatória de nucleotídeos (Figura 9) (Brummelkamp et al., 2002). Os sistemas que utilizam shRNAs sob controle de promotores da RNA polimerase III não devem possuir sequências de 4 uridinas em lugar algum, pois elas agem como sinais de terminação da transcrição para estas polimerases.

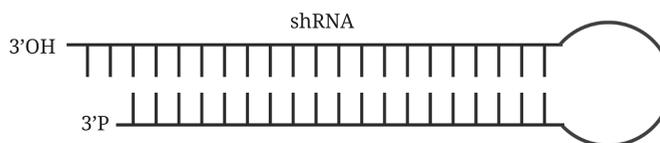


Figura 9. Estrutura molecular do shRNA, com uma alça de 5 nt a 9 nt.

Dentro do citoplasma, os duplexes de RNA permanecem em um contínuo processo de associação e dissociação, dependente diretamente da temperatura de *melting* (T_m) da molécula. Quando dissociam, as fitas podem não se reencontrar com tanta rapidez, diminuindo assim temporariamente a concentração do duplex dentro da célula. A alça do shRNA limita espacialmente o processo de dissociação, mantendo assim, *a priori*, o estado associado em maior proporção do que seria encontrado em siRNAs.

Os shRNAs podem ser produzidos por transcrição *in vitro* (Yu et al., 2002), mas comumente são gerados por meio de vetores plasmidiais (Zeitelhofer et al., 2008), virais (Anesti et al., 2008; Herold et al., 2008, Onder et al., 2012) ou transgênese (Delic et al., 2008; Singer et al., 2006). Alternativamente, pequenos cassetes de expressão de shRNAs também podem ser obtidos por meio de estratégias baseadas em PCR (Gou et al., 2003).

shRNAs Multiméricos

Em 2006, um grupo norte-americano apresentou uma maneira simples e engenhosa de produzir, em laboratório, shRNAs em larga escala e baixo custo. Esse processo baseia-se na transcrição *in vitro* (IVT) de um molde circular *sem promotor*, gerando shRNAs multiméricos (Figura 10C) (Seyhan et al., 2006; Abe et al., 2012).

De forma simplificada, a IVT gera um determinado número de moléculas de RNA por tempo de reação. A estratégia do círculo rolante gera transcritos que são shRNAs multiméricos, ou seja, um mesmo transcrito (>150 nt) é constituído por vários shRNAs, tornando, assim, o rendimento da reação economicamente interessante (Figura 10B).

O molde é, em essência, um oligo linear de DNA de aproximadamente 70 nt com 4 regiões distintas: i) sequência senso de 29 nt; ii) uma alça de 10 nt; iii) sequência antissenso de 29 nt; e iv) uma segunda alça de 5 nt (Figura 10A). Por sua alta complementaridade interna, este molde dobra-se formando uma estrutura no formato de um halter. A circularização deste molde é realizada por uma reação de ligação (Figura 10A, representada pelo círculo pequeno no meio da sequência senso).

Depois da transcrição *in vitro*, os shRNAs multiméricos são processados por dicer *in vitro* (ou *in vivo*) (Figura 10B, C e D), não ativam a PKR e promovem um silenciamento gênico eficiente em células de mamíferos. Eles não são frequentemente utilizados, pois dependem de um molde de DNA relativamente caro, que deverá ser circularizado, submetido à transcrição e, então, desfosforilados (Kim et al., 2004). Sua utilização mais adequada é em estudos *in vivo* (*i.e.*, camundongos), nos quais as massas necessárias de shRNAs são elevadas. A IVT sem promotor é um processo possível devido a características da T7 RNA polimerase (Seyhan et al., 2006), contudo a inserção de um promotor T7 de 20 nt no molde, potencialmente, elevaria o rendimento.

Novas Possibilidades

Novas classes de moléculas foram desenvolvidas nos últimos anos, apresentando resultados promissores. Abordaremos aqui algumas delas, contudo suas eficiências ainda não estão amplamente comprovadas.

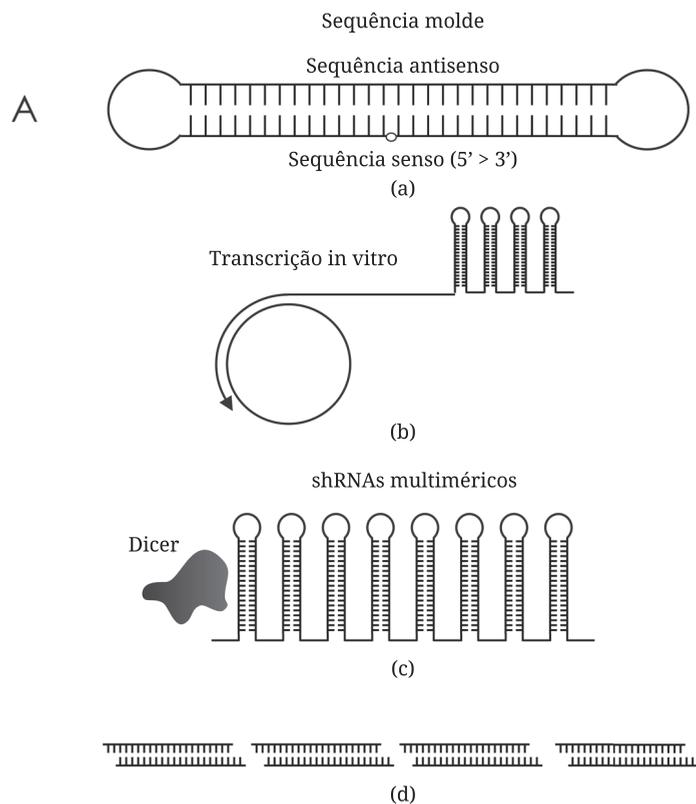


Figura 10. Produção de shRNAs multiméricos por meio da transcrição *in vitro* no mecanismo círculo rolante. O molde original apresenta um formato de *halter* devido à complementaridade interna (A). A transcrição no estilo *círculo rolante* é esquematizada em B, na qual o molde é representado por um círculo gerando centenas de shRNAs multiméricos que, posteriormente, são processados por dicer (C) em siRNAs (D). O pequeno círculo no centro da sequência senso em "A" representa a ligação enzimática necessária entre as duas extremidades (3'OH e 5'P) do oligo original para sua circularização e posterior transcrição.

siRNAs Assimétricos (aiRNA)

Um dos mais recentes formatos de moléculas desencadeadoras de RNAi são os chamados siRNAs assimétricos (aiRNA, para *asymmetric small interfering RNA*) (Figura 11) (Sun et al., 2008). Sua estrutura molecular é bem distinta dos siRNAs convencionais: um oligo guia de 21 nt anelado a um oligo passageiro de 15 nt na região central. Assim, esta molécula é constituída por 3 nt livres nas 2 extremidades (5' e 3') da fita antissenso, dramaticamente distinta da característica assinatura molecular dos siRNAs (2 nt livres nas 2 extremidades 3').

Apesar disto, o aiRNA mostrou-se altamente eficiente em promover o silenciamento gênico (Lv et al., 2011), tendo sido comprovadamente incorporado por RISC e promovendo uma clivagem do RNA alvo de forma semelhante ao siRNA. Estes dois últimos aspectos demonstram tratar-se de um processo de RNAi. Apesar de o mecanismo pelo qual isto é possível permanecer desconhecido, o uso de aiRNAs apresenta algumas vantagens sobre os siRNAs convencionais: i) menor custo; e ii) redução de efeitos inespecíficos eventualmente causados pela fita senso.

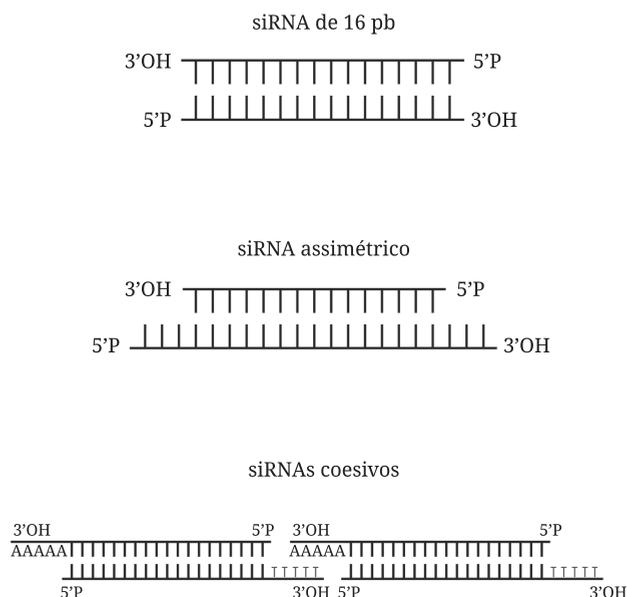


Figura 11. Estruturas de moléculas alternativas para o desencadeamento de RNAi.

siRNAs de 16 Pares de Base

Ainda em 2008, um segundo tipo de molécula foi apresentado: o siRNA de 16 pb (Figura 11), que demonstrou-se mais eficiente que um siRNA convencional dentro das condições testadas (Chu e Rana, 2008). A funcionalidade de siRNAs tão pequenos vai totalmente contra a corrente atual de pensamento, mas é corroborada pelo relato do aiRNA (Sun et al., 2008). Seu tamanho extremamente reduzido levaria a custos ainda menores.

siRNA Coesivos (ssiRNA)

Um dos principais agentes de transfecção é o *cationic polymer polyethylenimine* (PEI). Visando melhor estabilização do complexo siRNA/PEI, um grupo de pesquisadores franceses apresentou siRNAs cujas extremidades livres 3' eram coesivas: 5 a 8 adenosinas em uma extremidade, 5 a 8 timidinas na outra extremidade (Bolcato-Bellemin et al., 2007; Bonnet et al., 2008). Estes ssiRNAs (do inglês: *sticky siRNA*) naturalmente se concatemerizam (Figura 11), formando estruturas maiores, mais estavelmente complexadas ao agente de transfecção e aumentam em até 10 vezes a taxa de absorção pela célula. No citoplasma estes ssiRNAs se desassociam em siRNAs, promovendo o silenciamento gênico sem ativar interferon.

Uma alternativa recente, porém relativamente semelhante ao ssiRNA, constitui-se dos *siRNAs multiméricos* (distintos dos shRNA multiméricos) (Mok et al., 2010). Uma comparação geral entre todos os tipos apresentados de moléculas pode ser feita (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre os diversos tipos de moléculas desencadeadoras de RNAi.

Molécula	Tamanho / estrutura	Uso em mamíferos	Custo**	Processo mais comum de obtenção	Tempo para obtenção da molécula†	Chance de silenciamento	Uso na literatura
dsRNA	300 – 800 pb	não*	N.A.	RT-PCR + IVT	moderado	alta	amplo
hpRNA	300 – 800 pb	não*	N.A.	clonagem do cDNA em vetor	moderado	alta	amplo
siRNA	2 fitas de 21 nt	sim	++	compra	rápido	dependentet	amplo
siRNA bifurcado	2 fitas de 21 nt	sim	++	compra	rápido	dependentet	muito reduzido
substrato de dicer	27 pb	sim	+++	compra	rápido	dependentet	reduzido
esiRNAs	pool de siRNAs	sim	+++	RT-PCR + IVT + <i>dicing</i> + purificação***	moderado	alta	reduzido
shrRNA	19 pb + alça	sim	+++	clonagem da construção em vetor****	moderado	dependentet	amplo
shrRNA multimérico	concatâmeros de shrRNAs	sim	+++	compra de oligo de DNA + ligação + IVT	moderado	dependentet	muito reduzido
aiRNA	1 fita de 21 nt e 1 fita de 15 nt	sim	+	compra	rápido	dependentet	reduzido
siRNA de 16 pb	16 pb	sim	+	compra	rápido	dependentet	reduzido
siRNAs coesivos	2 fitas de 24 nt	sim	++	compra	rápido	dependentet	reduzido
siRNA de fita simples	1 fita de ~21 nt	sim	+++	compra	rápido	alta	descrito 2012

* Há exceções, como no caso de células que não apresentam a via de PKR ativa.

** Estimativa do custo final da molécula, considerando-se aquisição direta ou produção em laboratório (oligos, plasmídeos, kits, etc.).

*** há empresas que fornecem estes produtos prontos.

† Excluem-se os casos de transgênese.

‡ Dependente de *design* racional, descrição prévia na literatura ou existência em empresas com bancos de siRNAs validados.

N.A.: não se aplica – molécula não disponível comercialmente.

IVT: reação de transcrição *in vitro*.

siRNAs de Fita Simples (ss-siRNA)

A mais recente molécula descrita é o *single stranded siRNA* (ss-siRNA) (Lima et al., 2012; Yu et al., 2012). Trata-se de um oligo de RNA antissenso de aproximadamente 21 nt, mas que apresenta uma série de modificações químicas que o faz ser incorporado por RISC e promover a clivagem do RNA alvo. Portanto, apesar de ser muito semelhante a um “oligo antissenso convencional” (que leva à inibição da tradução), as modificações inseridas no ss-siRNA fazem com que ele entre na via de silenciamento gênico pós-transcricional e guie *slicer* para a destruição do transcrito alvo, diferenciando-o, assim, de um “RNA antissenso”.

Uma grande vantagem desta molécula é a impossibilidade de ocorrer *off-targeting* mediado pelo oligo senso, que é inexistente neste caso. Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram a eficiência do ss-siRNA, mas seu uso ainda é limitado por ser uma molécula muito nova.

Possíveis Modificações Químicas

Todas as moléculas que podem ser adquiridas comercialmente (si-, ai-, ssi-, siRNA bifurcado e substrato de dicer) podem conter modificações químicas específicas visando sua maior *estabilidade* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Na maioria das vezes, estas modificações elevam o preço final das moléculas, o que torna este tipo de processo não tão amplamente utilizado.

A mais simples e comum modificação química (e provavelmente a única que reduz o custo final), é a substituição dos 2 ribonucleotídeos em ambas as extremidades 3' por desoxirribonucleotídeos (Elbashir et al., 2001a). Essa modificação parece dificultar a atividade de ribonucleases, prolongando assim a meia-vida dos siRNAs.

Algumas modificações mais sofisticadas envolvem introdução de *phosphorothioate* (Braasch et al. 2003, 2004), 4' thioribose (Dande et al. 2006), *locked nucleic acids* (LNAs; Braasch et al. 2003; Elmén et al. 2005), ou múltiplas modificações 2' (Amarzguioui et al. 2003; Harborth et al. 2003; Holen et al. 2002, 2003). Os efeitos destas modificações no nível do silenciamento, estabilidade e preço final são variáveis, sendo que muitas outras modificações estão disponíveis comercialmente.

Produção Enzimática de Bibliotecas de shRNA a Partir de cDNAs

Estudos de genômica funcional usando RNAi exigem estratégias rápidas e custo-efetivas para análises em larga escala. Neste sentido, três grupos desenvolveram em 2004 abordagens semelhantes para a rápida produção de bibliotecas de shRNA a partir de cDNAs, denominadas: **EPRIL** (*Enzymatic Production of RNAi Libraries*; Shirane et al., 2004), **SPEED** (*Small interfering RNA Production by Enzymatic Engineering of DNA*; Luo et al., 2004) e **REGS** (*Restriction Enzyme-Generated siRNA vectors and libraries*; Sen et al., 2004). Importante ressaltar que métodos alternativos ainda têm sido desenvolvidos (Fukano et al., 2006; Fukano e Suzuki, 2008).

As três baseiam-se em um conceito simples: a enzima de restrição *Mme* I reconhece um sítio no DNA, porém, ao contrário da maioria das enzimas de uso rotineiro, realiza a

clivagem em outro sítio, *i.e.* a 20 nt ou 21 nt de distância da sequência de reconhecimento, gerando uma extremidade semelhante à de um siRNA (2 nt livres 3').

A produção de uma biblioteca de shRNAs na estratégia EPRIL (a mais simples delas) envolve as seguintes etapas: primeiro, uma biblioteca de cDNA deve ser digerida com *DNase I*, que realiza cortes aleatórios dentro de cada clone, gerando fragmentos menores. As extremidades destes fragmentos são ligadas a adaptadores no formato de um grampo (*hairpin*) e que apresentam o sítio para *Mme I*. A digestão com esta enzima gera fragmentos ainda menores e que apresentam extremidades 3' com 2 nt livres. Segue-se então uma ligação com um segundo adaptador na extremidade processada; que permitirá o anelamento de *primers* para a produção da segunda fita do DNA. Este dsDNA agora é novamente digerido para retirada destes adaptadores secundários e posterior ligação em vetores de expressão de shRNAs, que formam a nova biblioteca (para uma visualização do processo vide Shirane et al., 2004).

A construção final apresenta a seguinte sequência: cDNA(direto)::sítio *MmeI*::cDNA(reverso); sendo que o sítio *MmeI* funciona agora como a alça (*loop*) do shRNA produzido.

Bibliografia

- Abe, N., Abe, H. and Ito, Y. 2012. Synthesis of dumbbell-shaped cyclic RNAs for RNA interference. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem Mar*;Chapter 16:Unit 16.4.1-11.
- Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. and Prydz, H. 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res* 31:589-595. PMID:12527766 PMCID:140512. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg147>
- Andersson, M., Melander, M., Pojmark, P., Larsson, H., Bulow, L. and Hofvander, P. 2006. Targeted gene suppression by RNA interference: an efficient method for production of high-amylose potato lines. *J Biotechnol* 123(2):137-48. PMID:16466822. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.11.001>
- Anesti, A. M., Peeters, P. J., Royaux, I. and Coffin, R. S. 2008. Efficient delivery of RNA Interference to peripheral neurons in vivo using herpes simplex virus. *Nucleic Acids Res* 36(14):e86. PMID:18583367 PMCID:2504301. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn371>
- Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Müller, U. and Filipowicz, W. 2001. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(25):14428-33. PMID:11724966 PMCID:64698. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.261562698>
- Bolcato-Bellemin, A. L., Bonnet, M. E., Creusat, G., Erbacher, P. and Behr, J. P. 2007. Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(41):16050-5. PMID:17913877 PMCID:2042160. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0707831104>
- Bonnet, M. E., Erbacher, P. and Bolcato-Bellemin, A. L. 2008. Systemic Delivery of DNA or siRNA Mediated by Linear Polyethylenimine (L-PEI) Does Not Induce an Inflammatory Response. *Pharm Res* 25(12):2972-82. PMID:18709489. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-008-9693-1>
- Braasch, D. A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M. A. and Corey, D. R. 2003. RNA interference in mammalian cells by chemically modified RNA. *Biochemistry* 42:7967-7975. PMID:12834349. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0343774>
- Braasch, D. A., Paroo, Z., Constantinescu, A., Ren, G., Oz, O. K., Mason, R. P. and Corey, D. R. 2004. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1139-1143. PMID:14980652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.12.074>
- Brown, K. M., Chu, C. Y. and Rana, T. M. 2005. Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12(5):469-70. PMID:15852021. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb931>

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296(5567):550-3. PMID:11910072. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068999>
- Calegari, F., Haubensak, W., Yang, D., Huttner, W. B. and Buchholz, F. 2002. Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(22):14236-40. PMID:12391321 PMCid:137867. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.192559699>
- Chu, C. Y. and Rana, T. M. 2008. Potent RNAi by short RNA triggers. *RNA* 14(9):1714-9. PMID:18658119 PMCid:2525957. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1161908>
- Clemens, M. J. and Elia, A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* 17(9):503-24. PMID:9335428. <http://dx.doi.org/10.1089/jir.1997.17.503>
- Dande, P., Prakash, T. P., Sioufi, N., Gaus, H., Jarres, R., Berdeja, A., Swayze, E. E., Griffey, R. H. and Bhat, B. 2006. Improving RNA interference in mammalian cells by 4'-thio-modified small interfering RNA (siRNA): effect on siRNA activity and nuclease stability when used in combination with 2'-O-alkyl modifications. *J Med Chem* 49:1624-1634. PMID:16509579. <http://dx.doi.org/10.1021/jm050822c>
- Delic, S., Streif, S., Deussing, J. M., Weber, P., Ueffing, M., Hölter, S M., Wurst, W. and Kühn, R. 2008. Genetic Mouse Models for Behavioral Analysis through Transgenic RNAi Technology. *Genes Brain Behav* 7(7):821-30. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00412.x>
- Donzé, O. and Picard, D. 2002. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 30(10):e46. PMID:12000851 PMCid:115300. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.10.e46>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494-8. PMID:11373684. <http://dx.doi.org/10.1038/35078107>
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15(2):188-200. PMID:11157775 PMCid:312613. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.862301>
- Elmén, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Ørum, H., Koch, T. and Wahlestedt, C. 2005. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 33:439-447. PMID:15653644 PMCid:546170. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki193>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11. PMID:9486653. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
- Fukano, H., Hayatsu, N., Goto, R. and Suzuki, Y. 2006. A technique to enzymatically construct libraries which express short hairpin RNA of arbitrary stem length. *Biochem Biophys Res Commun* 347(3):543-50. PMID:16872922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.124>
- Fukano, H. and Suzuki, Y. 2008. Enzymatic conversion of long DNA to small DNA fragments for the construction of short hairpin RNA expression libraries. *Anal Biochem* 385(1):80-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.026>
- Gimenez-Barcons, M., Clotet, B. and Martinez, M. A. 2007. Endoribonuclease-prepared short interfering RNAs induce effective and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 81(19):10680-6. PMID:17652404 PMCid:2045487. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00950-07>
- Goto, A., Blandin, S., Royet, J., Reichhart, J. M. and Levashina, E. A. 2003. Silencing of Toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into *Drosophila* adult flies. *Nucleic Acids Res* 31(22):6619-23. PMCid:275548. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg852>
- Gou, D., Jin, N. and Liu, L. 2003. Gene silencing in mammalian cells by PCR-based short hairpin RNA. *FEBS Lett* 548(1-3):113-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00630-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00630-6)
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286(5441):950-2. PMID:10542148. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5441.950>

- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404(6775):293-6. PMID:10749213. <http://dx.doi.org/10.1038/35005107>
- Harborth, J., Elbashir, S. M., Vandeburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S. A., Weber, K. and Tuschl, T. 2003. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 13:83-105. PMID:12804036. <http://dx.doi.org/10.1089/108729003321629638>
- Herold, M. J., van den Brandt, J., Seibler, J. and Reichardt, H M. 2008. Inducible and reversible gene silencing by stable integration of an shRNA-encoding lentivirus in transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(47):18507-12. PMID:19017805 PMCid:2587564. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806213105>
- Hohjoh, H. 2004. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes. *FEBS Lett* 557(1-3):193-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01492-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01492-3)
- Holen, T., Amarzguoui, M., Babaie, E. and Prydz, H. 2003. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 31:2401-2407. PMID:12711685 PMCid:154224. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg338>
- Holen, T., Amarzguoui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E. and Prydz, H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 30(8):1757-66. PMID:11937629 PMCid:113209. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.8.1757>
- Hong, J., Wei, N., Chalk, A., Wang, J., Song, Y., Yi, F., Qiao, R. P., Sonnhammer, E. L., Wahlestedt, C., Liang, Z. and Du, Q. 2008. Focusing on RISC assembly in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 368(3):703-8. PMID:18252196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.116>
- Huang, H., Chang, Q., Sun, C., Yin, S., Li, J. and Xi, J. J. 2011. A polyacrylamide microbead-integrated chip for the large-scale manufacture of ready-to-use esiRNA. *Lab Chip* 11(6):1036-40. PMID:21274477. <http://dx.doi.org/10.1039/c0lc00564a>
- Huang, Y., Deng, F., Hu, Z., Vlak, J. M. and Wang, H. 2007. Baculovirus-mediated gene silencing in insect cells using intracellularly produced long double-stranded RNA. *J Biotechnol* 128(2):226-36. PMID:17112616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.09.016>
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 18(8):896-8. PMID:10932163. <http://dx.doi.org/10.1038/78531>
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2):209-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
- Kim, D. H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M. S., Choi, S. and Rossi, J. J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23(2):222-6. PMID:15619617. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1051>
- Kim, D. H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E. and Rossi, J. J. 2004. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22(3):321-5. PMID:14990954. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt940>
- Kim, N. S., Kim, T. G., Jang, Y. S., Shin, Y. J., Kwon, T. H. and Yang, M. S. 2008. Amylase gene silencing by RNA interference improves recombinant hGM-CSF production in rice suspension culture. *Plant Mol Biol* 68(4-5):369-77. PMID:18633717. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9376-7>
- Kubo, T., Yanagihara, K., Takei, Y., Mihara, K., Sato, Y. and Seyama, T. 2012. Lipid-Conjugated 27-Nucleotide Double-Stranded RNAs with Dicer-Substrate Potency Enhance RNAi-Mediated Gene Silencing. *Mol Pharm* 9(5):1374-83. PMID:22494497.
- Lima, W. F., Prakash, T. P., Murray, H. M., Kinberger, G. A., Li, W., Chappell, A. E., Li, C. S., Murray, S. F., Gaus, H., Seth, P. P., Swayze, E. E. and Crooke, S. T. 2012. Single-Stranded siRNAs Activate RNAi in Animals. *Cell* 150(5):883-94. PMID:22939618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.014>
- Luo, B., Heard, A. D. and Lodish, H. F. 2004. Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). *Proc Natl Acad Sci USA* 101(15):5494-9. PMID:15024103 PMCid:397411. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400551101>
- Lv, L., Xiao, X. Y., Gu, Z. H., Zeng, F. Q., Huang, L. Q. and Jiang, G. S. 2011. Silencing USP22 by asymmetric structure of interfering RNA inhibits proliferation and induces cell cycle arrest in bladder cancer cells. *Mol Cell Biochem* 346(1-2):11-21. PMID:20824490. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0585-4>

- Ma, Y., Creanga, A., Lum, L. and Beachy, P. A. 2006. Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature* 443(7109):359-63. PMID:16964239. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05179>
- Meng, Z., Xu, Y., Wu, J., Tian, Y., Kemper, T., Bleekmann, B., Roggendorf, M., Yang, D. and Lu, M. 2008. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by endoribonuclease-prepared siRNA. *J Virol Methods* 150(1-2):27-33. PMID:18378325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.008>
- Mok, H., Lee, S. H., Park, J. W. and Park, T. G. 2010. Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing. *Nat Mater* 9(3):272-8. PMID:20098433.
- Ohnishi, Y., Tokunaga, K. and Hohjoh, H. 2005. Influence of assembly of siRNA elements into RNA-induced silencing complex by fork-siRNA duplex carrying nucleotide mismatches at the 3'- or 5'-end of the sense-stranded siRNA element. *Biochem Biophys Res Commun* 329(2):516-21. PMID:15737617. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.012>
- Onder, T. T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A. U., Zhu, N., Bernt, K. M., Cahan, P., Marcarci, B. O., Unternaehrer, J., Gupta, P. B., Lander, E. S., Armstrong, S. A. and Daley, G. Q. 2012. Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 483(7391):598-602. PMID:22388813 PMID:3501145. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10953>
- Orvedahl, A., Sumpter Junior, R., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., Forst, C. V., Wrana, J. L., Zhang, Y E., Luby-Phelps, K., Xavier, R. J., Xie, Y. and Levine, B. 2011. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* 480(7375):113-7. PMID:22020285 PMID:3229641. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10546>
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. and Fire, A. 2000. Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 6(5):1077-87. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00106-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00106-4)
- Patzel, V., Rutz, S., Dietrich, I., Köberle, C., Scheffold, A. and Kaufmann, S. H. 2005. Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol* 23(11):1440-4. PMID:16258545. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1151>
- Pieraets, S., Cox, L., Gielen, O. and Cools, J. 2012. Development of a siRNA and shRNA screening system based on a kinase fusion protein. *RNA* 18(6):1296-306. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.030015.111>
- Player, M. R. and Torrence, P. F. 1998. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* 78(2):55-113. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00167-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00167-8)
- Rose, S. D., Kim, D. H., Amarzguioui, M., Heidel, J. D., Collingwood, M. A., Davis, M. E., Rossi, J. J. and Behlke, M. A. 2005. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res* 33(13):4140-56. PMID:16049023 PMID:1180746. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki732>
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115(2):199-208. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1)
- Sen, G., Wehrman, T S., Myers, J W. and Blau, H. M. 2004. Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet* 36(2):183-9. PMID:14704668. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1288>
- Seyhan, A. A., Vlassov, A. V. and Johnston, B. H. 2006. RNA interference from multimeric shRNAs generated by rolling circle transcription. *Oligonucleotides* 16(4):353-63. PMID:17155910. <http://dx.doi.org/10.1089/oli.2006.16.353>
- Shirane, D., Sugao, K., Namiki, S., Tanabe, M., Iino, M. and Hirose, K. 2004. Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nat Genet* 36(2):190-6. PMID:14704669. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1290>
- Singer, O., Tiscornia, G., Ikawa, M. and Verma, I. M. 2006. Rapid generation of knockdown transgenic mice by silencing lentiviral vectors. *Nat Protoc* 1(1):286-92. PMID:17406246. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.44>

- Słabicki, M., Theis, M., Krastev, D. B., Samsonov, S., Mundwiller, E., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Teyra, J., Heninger, A. K., Poser, I., Prieur, F., Truchetto, J., Confavreux, C., Marelli, C., Durr, A., Camdessanche, J. P., Brice, A., Shevchenko, A., Pisabarro, M. T., Stevanin, G. and Buchholz, F. 2010. A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biol* 8(6):e1000408. PMID:20613862 PMCid:2893954. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000408>
- Soler, N., Plomer, M., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R. and Peña, L. 2012. Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnol J* 10(5):597-608. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00691.x>
- Sun, X., Rogoff, H. A. and Li, C. J. 2008. Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 26(12):1379-82. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1512>
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H. and Schultz, R. M. 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127(19):4147-56. PMID:10976047.
- Svoboda, P., Stein, P. and Schultz, R. M. 2001. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 287(5):1099-104. PMID:11587535. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2001.5707>
- Tan, C., Xuan, B., Hong, J., Dai, Z., Hao, R., Li, Z. and Huang, W. 2007. RNA interference against hepatitis B virus with endoribonuclease-prepared siRNA despite of the target sequence variations. *Virus Res* 126(1-2):172-8. PMID:17399837. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2007.02.013>
- Thomas, C. L., Jones, L., Baulcombe, D. C. and Maule, A. J. 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* 25(4):417-25. PMID:11260498. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00976.x>
- Tijsterman, M. and Plasterk, R. H. 2004. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117(1):1-3. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00293-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00293-4)
- Timmons, L. and Fire, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395(6705):854. PMID:9804418. <http://dx.doi.org/10.1038/27579>
- Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y. and Saigo, K. 2000. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett* 479(3):79-82. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01883-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01883-4)
- Yang, D., Buchholz, F., Huang, Z., Goga, A., Chen, C. Y., Brodsky, F. M. and Bishop, J. M. 2002. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(15):9942-7. PMID:12096193 PMCid:126604. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.152327299>
- Yang, D., Lu, H. and Erickson, J. W. 2000. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 10(19):1191-200. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00732-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00732-6)
- Yu, D., Pendergraft, H., Liu, J., Kordasiewicz, H. B., Cleveland, D. W., Swayze, E. E., Lima, W. F., Crooke, S. T., Prakash, T. P. and Corey, D. R. 2012. Single-Stranded RNAs Use RNAi to Potently and Allele-Selectively Inhibit Mutant Huntingtin Expression. *Cell* 150(5):895-908. PMID:22939619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.002>
- Yu, J. Y., DeRuiter, S. L. and Turner, D. L. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9):6047-52. PMID:11972060 PMCid:122899. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.092143499>
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101(1):25-33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zeitelhofer, M., Karra, D., Vessey, J. P., Jaskic, E., Macchi, P., Thomas, S., Riefler, J., Kiebler, M. and Dahm, R. 2008. High-efficiency transfection of short hairpin RNAs-encoding plasmids into primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 87(1):289-300. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21840>

Desenho Racional de siRNAs

Capítulo 6

Prof. Dr. Guido Lenz¹ e Prof. Dr. Tiago Campos Pereira²

¹Depto. de Biofísica, UFRGS

²Depto. de Biologia, FFCLRP, USP

Introdução

Os siRNAs são duplas fitas de 19 a 25 nucleotídeos que possuem *overhangs* de 2 nt nas extremidades 3' OH, com fosfato na extremidade 5'. Como o RNA alvo geralmente é muito maior do que o siRNA, existe um número imenso de possíveis siRNAs para silenciar um determinado RNA alvo. A escolha de qual sequência de 19 nt a 25 nt usar pode ser fundamental no sucesso de um experimento de silenciamento. Para se ter uma ideia da variabilidade, uma varredura usando 180 siRNAs contra todas as regiões de dois mRNAs com 197 nt mostrou que sequências alvo, distantes somente duas bases uma da outra, podem ter diferenças muito grandes na eficiência do silenciamento. Neste estudo, apenas um em cada quatro siRNAs testados silenciaram mais do que 95%, mostrando a importância de selecionar o siRNA correto (Reynolds et al., 2004).

A alternativa inicial para se contornar esta variabilidade foi testar vários siRNAs e selecionar, empiricamente, a sequência que apresentasse melhor silenciamento. Atualmente a seleção dos siRNAs é feita com base em dados provenientes: i) do mecanismo molecular do silenciamento; ii) de estudos de triagem que compararam a eficiência de muitas sequências para descobrir quais eram mais eficientes; e iii) do sequenciamento e análise dos siRNAs endógenos, os miRNAs. Neste caso, a descoberta de muitos miRNAs permitiu estudar as características comuns que permitem o bom funcionamento destes. É importante ter consciência, no entanto, de que miRNAs, muitas vezes, evoluíram para silenciar muitos alvos e que, normalmente, o siRNA é desenhado para silenciar um alvo específico.

Apesar destes avanços, ainda não se atingiu um nível de compreensão suficiente que permita encomendar um siRNA que funcione com 100% de certeza. Por isto, embora o número de siRNAs que se tenha que comprar para se ter uma sequência que silencie de forma eficiente tenha diminuído, ainda é necessário trabalhar com mais do que um siRNA para fazer um bom experimento de silenciamento.

Embora a grande maioria dos siRNAs ou shRNAs sejam desenhados por programas que aplicam muitas das regras aqui apresentadas, é importante que o cientista tenha condições de entender os motivos pelos quais algumas sequências funcionam melhor do que outras. Os programas de desenho de siRNAs geralmente não permitem fazer opções como desenhar um siRNA especificamente para regiões conservadas ou para um determinado variante de processamento (*alternative splicing variants*). O que se sugere é que estes programas sejam usados para fornecer uma lista de possíveis siRNAs e que o pesquisador selecione os melhores, baseado neste capítulo e na literatura que avança numa velocidade enorme. Uma decisão similar normalmente tem que ser tomada quando se trabalha com uma biblioteca de shRNAs, que, geralmente, fornecem várias sequências para cada gene alvo. Principalmente quando os testes de eficiência são complexos, é interessante começar a testar aqueles si- ou shRNAs que têm mais chances de funcionar.

A seguir veremos vários aspectos dos siRNAs que afetam a eficiência e a especificidade do silenciamento. Cada um destes aspectos contribui pouco quando considerados isoladamente, mas, quando aplicados em conjunto, podem aumentar muito a eficiência e a especificidade do silenciamento. Por isto, um planejamento que envolva a sugestão de programas de desenho de sequências juntamente com uma análise manual detalhada muito provavelmente terá uma probabilidade grande de sucesso.

Sequências que Devem ser Evitadas

Antes de se preocupar com questões específicas da sequência de siRNA a ser usada, é necessário avaliar quais sequências podem produzir toxicidade ou outros efeitos indesejados. Entre estes efeitos estão: i) a indução da resposta do tipo interferon; ii) a ativação de receptores do tipo Toll; e iii) a saturação da maquinaria do RNAi.

A resposta do tipo interferon é um aumento na expressão de genes responsivos ao interferon. Esta resposta é induzida, principalmente, por dsRNAs maiores do que 30 pb, embora sequências pequenas possam ter um efeito similar, principalmente quando a quantidade de siRNA ou shRNA usada for muito grande. Neste caso, o possível acúmulo de duplexes não processados é o principal indutor deste efeito (Bridge et al., 2003). Uma triagem minuciosa revelou que a toxicidade do siRNA aumenta com o tamanho, sendo que, mesmo com concentrações baixas de 10 nM, a toxicidade já começou a aparecer em siRNAs com tamanho de 23 pb (Reynolds et al., 2006).

Estes problemas podem ser evitados pelo uso de sequências menores do que 30 pb e pelo uso da menor concentração efetiva possível. Outra forma de evitar a ativação da resposta do tipo interferon é adicionar ou retirar uma base na fita senso, que não será incorporado no complexo RISC, de tal forma que não se forme dsRNA com pareamento perfeito por mais de 11 pb. Este pequeno “erro” de pareamento, aparentemente, é suficiente para não induzir a sinalização da resposta do tipo interferon (Cullen, 2006b). Apesar de essa ser uma estratégia interessante e ocorrer nos miRNAs endógenos (que raramente possuem um pareamento perfeito longo), seu uso não é amplo na literatura. Também foram descritas modificações químicas nos RNAs, como 2'-F-RNA, 2'-O-Me-RNA ou alguns resíduos de DNA que reduziram consideravelmente a resposta do tipo interferon (Watts et al., 2008).

Uma triagem visando descobrir sequências tóxicas revelou que a presença do motivo de quatro bases 5'-UGGC-3' na fita guia possui uma toxicidade considerável. Apesar de o

mecanismo para esta toxicidade não estar claro, é interessante deixar de fora sequências alvo que apresentem o motivo 5'-GCCA-3' no RNA alvo. Além disto, foi observado também que sequências com pentâmeros ricos em AU podem induzir algum efeito tóxico (Fedorov et al., 2006).

Duplexes de RNA também podem ativar a resposta imunológica por meio dos receptores do tipo Toll, observada em leucócitos e células dendríticas plasmacitoides, o que restringe este efeito a estudos com estes tipos celulares ou para estudos *in vivo*. Esta ativação também parece ser causada por sequências específicas, como 5'-UGUGU-3' ou 5'-GUCCUCAA-3', mas a possibilidade de outras sequências terem este efeito não pode ser excluída (Cullen, 2006a; Hornung et al., 2005; Judge et al., 2005).

Características Gerais dos siRNAs

Tamanho Ideal

A restrição de tamanho do siRNA é dada, no limite inferior, pela funcionalidade e, no limite superior, pela resposta do tipo interferon. Como visto anteriormente, duplexes maiores do que 30 pb são fortes indutores da resposta do tipo interferon, e devem ser evitados. Os duplexes um poucos mais longos (até 29 pb) aparentemente são mais facilmente transfectáveis e, portanto, podem ser usados em concentrações menores, e exatamente por estarem mais próximos do limite para indução da resposta do tipo interferon devem ser usadas na menor concentração possível.

Quanto à eficiência, não existe um consenso de qual o melhor tamanho, mas considerando: i) que o tamanho de dsRNAs produzidos a partir do processamento dos miRNAs tem entre 21 nt a 25 nt; ii) o custo da síntese do duplex de RNA; e iii) a toxicidade, é razoável afirmar que o tamanho ideal de cada fita de RNA esteja entre 19 e 25 nt, sendo que o siRNA com fitas de 21 nt é, provavelmente, o melhor tamanho para a maioria das aplicações.

Aspectos de Termodinâmica

Somente uma das duas fitas do siRNA é transferida para o complexo RISC. Esta fita é chamada de oligo guia (*guide strand*), pois direciona RISC para o RNA alvo com sequência complementar. A outra fita é degradada, sendo designada “oligo passageiro” (*passenger strand*). Para que um siRNA seja funcional, é fundamental que a fita antissenso (com complementaridade com o RNA alvo) seja a fita guia.

Adicionalmente, a incorporação da fita senso por RISC leva a dois problemas: (i) não há o silenciamento do transcrito alvo e (ii) eventuais transcritos com pareamento com a fita senso serão silenciados, levando a resultados equivocados.

Estudos utilizando sequências com variações nas extremidades 5' e 3' foram os principais responsáveis por evidenciar que a fita a ser carregada para dentro do complexo RISC é a que tem maior conteúdo de Adenosinas e Uridinas (AUs) na parte 5' (i.e., menor estabilidade termodinâmica) (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003), como evidenciado na Figura 1B. No siRNA mostrado, a fita de baixo seria preferencialmente usada, pois o 5' desta fita apresenta a sequência ACAUA, enquanto a outra fita apresenta CCGUA no seu 5'. Se este duplex fosse usado, ele silenciaria um mRNA alvo mostrado na Figura 1A. Para

Cópia gratuita - venda proibida

consideração prática, quando se está trabalhando a sequência do mRNA alvo, sempre procurar por sequências alvo que tenham mais CGs no 5' do que no 3'. Em uma triagem ampla para averiguar a eficiência de sequências, foi observado que nenhuma sequência contendo somente CGs nas cinco últimas posições do mRNA senso alvo foi capaz de produzir silenciamento, sendo sugerido um mínimo de três AUs nesta região (Reynolds et al., 2004).

Digamos que não seja possível encontrar uma sequência que atenda a este requisito ou, por alguma razão, existe a obrigatoriedade de usar uma determinada região do mRNA alvo. Neste caso, é possível manipular qual sequência será incorporada no complexo RISC adicionando uma base que não pareia no 3' da fita senso (passageira) do siRNA, com isto, produzido um fraco pareamento na parte 5' da fita guia (vide cap. 5 - siRNA bifurcado). No exemplo da Figura 1C, a fita de cima seria incorporada, por ter um par de base não pareada (C:A) no seu 5' (Schwarz et al., 2003).

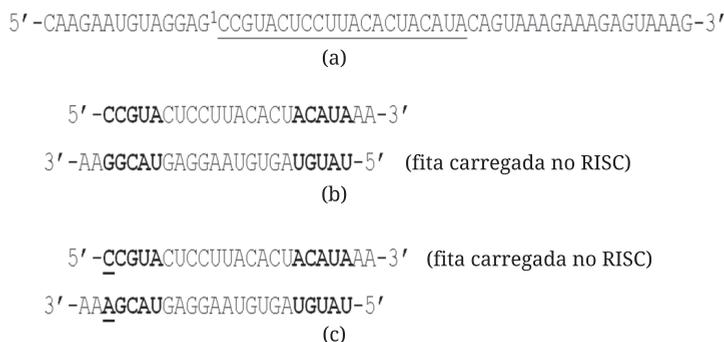


Figura 1. Assimetria do siRNA afeta a escolha da fita a ser carregada pelo complexo RISC. A. mRNA hipotético, com o alvo do siRNA sublinhado; B. Fita com menos CGs no 5' será mais carregada no complexo RISC – esta silenciaria o mRNA alvo mostrado em A; C. Inversão da fita a ser incorporada no RISC pela adição de uma base não pareada (sublinhada). Neste caso, o mRNA mostrado em A não seria silenciado.

Quanto à composição do siRNA, sequências com conteúdo de CG entre 36% e 52% parecem mais eficazes, pois duplexes com composição de CGs muito grande são mais dificilmente separados para transferência para o complexo RISC. Já se o conteúdo de CG for muito pequeno, a estabilidade do siRNA:RNA alvo pode ser muito baixa e não produzir clivagem do RNA alvo. Além disto, é preferível que o centro do siRNA tenha um conteúdo de CGs menor do que o resto do siRNA (Pei e Tuschl, 2006). Também devem ser evitadas sequências palindrômicas que possam produzir um RNA com estruturas secundárias.

Em uma triagem ampla para encontrar siRNAs mais eficazes, foi encontrada uma sensibilidade por determinados nucleotídeos em posições específicas, que são: A na posição 3 e 19 (da fita senso); U na posição 10; ausência de G na posição 13; e ausência de C ou G na posição 19 (Reynolds et al., 2004). Claro que, respeitar estas posições e ainda conseguir uma sequência específica, nem sempre é possível. Portanto, obedecer a estas regras certamente é secundário, em comparação às demais regras vistas anteriormente.

Escolha da Região Alvo

Vários fatores devem ser levados em conta na escolha da região do RNA alvo a ser atingida. Primeiramente, é importante ter a sequência do RNA alvo completa contendo a região traduzida e as duas regiões não traduzidas (UTRs). Também é importante que a sequência seja confiável, pois, como veremos a seguir, uma base não pareada poderá reduzir enormemente a eficiência de silenciamento, fato que também é aplicável para variantes de polimorfismo. Para siRNAs desenhados para agir em células ou organismos de espécies diferentes, é necessário alinhar os RNAs destas espécies para poder escolher regiões conservadas. Também é importante que se conheça variantes de processamento (*splicing*), pois, a não ser que o objetivo seja silenciar especificamente uma variante, é importante escolher uma região presente em todas as variantes.

Eficiência do siRNA

Embora a RNAi seja um processo catalítico que evoluiu para degradar RNAs, este processo nem sempre é eficiente o suficiente para o sucesso do experimento. Geralmente, se inicia um experimento desejando obter próximo a 100% de silenciamento, mas isto muitas vezes não é necessário e nem desejável. Contudo, o que se almeja normalmente em um experimento de silenciamento é obter uma redução superior a 90%. Para genes cujo silenciamento total não é letal para a célula ou organismo, quanto maior o silenciamento, geralmente, mais claras serão as conclusões do experimento. Já para os genes cujo silenciamento total é letal, reduções parciais na expressão (silenciamento de 90%, 80%, 70%, etc) podem evitar a letalidade e ainda assim promover alterações fenotípicas que evidenciem as funções da proteína. Este gradiente de possíveis graus de silenciamento é uma vantagem adicional da RNAi em relação à técnica de knockout, na qual apenas 3 graus são possíveis: (i) selvagem (+/+ ; 0% de redução de transcritos), (ii) heterozigoto (+/- ; 50% de redução de transcritos) e o knockout em si (-/- ; redução total de transcritos). Um conjunto de siRNAs capaz de gerar um gradiente de níveis intermediários de silenciamento é conhecido como “série epialélica” e foi claramente demonstrado para o gene p53 em camundongos (Hemann et al., 2003).

Os miRNAs anelam com muito mais frequência na parte 3' do RNA (geralmente no 3'UTR), sugerindo que a eficiência de siRNAs aumenta com a localização mais para 3' do RNA alvo. Em alguns organismos, como plantas, fungos e nematoides esta observação pode ser explicada por um processo de amplificação, no qual uma RdRP (*RNA-directed RNA Polymerase*) usa o siRNA como um iniciador para fazer duplas fitas do RNA alvo. Esta síntese obviamente é de 5' para 3' da fita que está sendo sintetizada e de 3' para 5' da fita que está servindo como molde. Portanto, siRNAs que ligam no 3' do RNA alvo produzem um RNA de dupla fita secundário muito mais longo. Os siRNAs produzidos destes RNAs de dupla fita produzem mais amplificação, numa retroalimentação positiva. Mas a população de siRNAs vai se deslocando para o 5' do RNA alvo de acordo com a progressão desta retroalimentação. Desta forma, quanto mais 3' do RNA alvo o processo tiver iniciado, mais tempo ele ficará ativo (Bergstrom et al., 2003). Mas este processo tem uma desvantagem, pois siRNAs que anelam na parte 3' produzirão uma quantidade considerável de siRNAs secundários, que poderão produzir silenciamento em alvos similares ao mRNA, desta forma aumentando a chance de silenciamento de alvos não desejados. Portanto, teoricamente, quanto mais 3' o siRNA alinhar, mais eficiente será, embora também haja maior possibilidade de poder afetar outros alvos devido aos siRNAs secundários (vide RNAi transitivo em “Riscos associados ao uso da RNAi”, cap. 11). Importante mencionar que em *Drosophila* e mamíferos não foi

encontrada RdRP similar à encontrada em plantas, fungos e no *C. elegans*, sugerindo que este mecanismo é restrito a espécies que expressam a RdRP (Wassenegger e Krczal, 2006).

Em mamíferos, também existe uma clara preferência dos miRNAs pela parte 3'UTR, distante pelo menos 15 nt do códon de terminação e não no meio de 3'UTR longos (Grimson et al., 2007). Os siRNAs que agem na região 3'UTR parecem ser mais eficientes quando comparados com siRNAs similares que agem no restante da sequência.

Quanto à termodinâmica da interação do complexo RISC-RNA com o RNA alvo, é importante considerar que o RNA pode ter estrutura secundária energeticamente estável. Avaliar a estrutura do RNA alvo ou usar programas que sugerem regiões mais acessíveis para o complexo RISC-RNA alvo podem melhorar o silenciamento consideravelmente (Tafer et al., 2008).

Uma vez feita a escolha dos siRNAs ou shRNAs, o teste mais rápido para verificar a sua eficiência consiste em cotransfectar o siRNA ou shRNA com o plasmídeo contendo o gene alvo, quando este estiver disponível, e testar para a expressão do mRNA e/ou proteína do gene recombinante. Como o mRNA é produzido já na presença do siRNA, o RNA alvo é rapidamente degradado e a proteína nem é sintetizada. Ao contrário, experimentos com o silenciamento do gene endógeno requerem o decaimento do mRNA e da proteína, que, dependendo do tempo de meia-vida do mRNA e da proteína, pode demorar até vários dias. Obviamente, um resultado positivo com o gene recombinante não é uma garantia de silenciamento do gene endógeno, tornando o teste com o endógeno fundamental.

Experimentos *in vivo*

Como será visto com mais detalhes em outros capítulos, experimentos *in vivo* requerem vários cuidados extras no planejamento e execução. No que tange ao desenho dos siRNAs, é fundamental que eles atinjam o tecido alvo. O principal desafio para isto é impedir que RNases degradem o duplex, além de fazê-lo fisicamente encontrar o alvo. Um dos primeiros estudos a fazer um silenciamento eficiente em animais de laboratório para um problema de saúde humana foi com o silenciamento da apolipoproteína B, visando reduzir o colesterol. Para evitar a degradação por RNases, foram usados duplexes de RNA contendo ligações fosforotioato entre as bases e grupos metila na posição 2' da ribose, o que aumentou o tempo médio de vida do siRNA intravenoso de 6 para 95 min. Para melhorar a biodisponibilidade, foi ligado colesterol à extremidade 3' da fita passageira. Estes Chol-siRNAs foram incorporados por células em cultura, sem a necessidade de reagentes de transfecção, e ligaram-se à albumina, com isto levando a uma biodistribuição melhor. Este siRNA modificado resultou numa redução no nível de colesterol e de LDL em torno de 40% (Soutschek et al., 2004).

Para o aumento da estabilidade do siRNA *in vivo*, a metilação na posição 2' da ribose é uma das mais usadas, normalmente afetando pouco a eficiência do silenciamento. Grupos mais volumosos do que metila na posição 2' também podem ser usados, embora, neste caso, seja mais comum a ocorrência de redução da eficiência de silenciamento. As modificações nas ligações fosfodiéster devem ser evitadas no centro da fita guia, mas são relativamente bem toleradas no restante do RNA (Watts et al., 2008), com preferência para a modificação fosforotioato. Os tipos de modificações que funcionam parecem ser muito dependentes da sequência do mRNA alvo e, certamente, devem ser adaptados para cada via de administração.

De qualquer forma, para experimentos *in vivo*, além das regras aplicáveis para células, precisa ser considerada a questão da estabilidade e biodisponibilidade dos dsRNAs.

Especificidade do siRNA

Um dos principais trunfos iniciais da RNAi foi a sua especificidade, pois se acreditava que apenas uma base de diferença entre o siRNA e um mRNA seria o suficiente para impedir a degradação, desta forma a distinção de alvo e não alvo seria fácil. Isto até é possível, sob determinadas condições, principalmente com a base não pareada localizada na parte central do siRNA, mas não é a regra. Por exemplo, foi possível diferenciar um oncogene RasV12 do seu proto-oncogene Ras, com apenas uma base de diferença (Brummelkamp et al., 2002a). Contudo, uma análise detalhada, usando um siRNA com mutações em 19 posições diferentes, mostrou que existem algumas posições em que uma base não pareada praticamente não tem efeito nenhum (posições 1, 6, 8) e várias outras posições em que uma base não pareada torna o siRNA totalmente incapaz de funcionar (posições 5, 9, 13 entre outras) (Schwarz et al., 2006). Este tipo de estudo provavelmente depende da sequência usada e é afetado pelas diferentes eficiências relativas das sequências utilizadas. Apesar disto, este estudo mostra a sensibilidade das diferentes posições à alteração de uma única base (Figura 2). Este resultado é tranquilizante tanto no que tange aos efeitos não específicos quanto à possibilidade, mencionada anteriormente, de poder distinguir entre duas sequências com apenas uma base de diferença, importante para estudos de polimorfismo de base única.

A RNAi manteve um *status* de totalmente ou muito específico nos primeiros anos após a sua descoberta, até que, em 2003, foram realizados os primeiros estudos usando arranjos de DNA para verificar os RNAs afetados por um determinado siRNA. O silenciamento do gene MAPK14 produziu um aumento na expressão de seis genes e a diminuição da expressão de 19 genes em 40 h. A diminuição do mRNA alvo foi muito maior do que a dos alvos inespecíficos, mas estes, aparentemente, foram afetados por silenciamento direto, e não por um efeito indireto do silenciamento do gene alvo (Jackson et al., 2003).

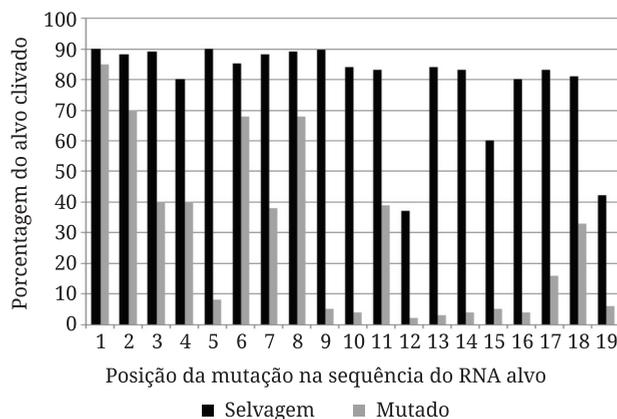
Existem dois tipos de alvo inespecíficos mais claramente identificáveis: i) aqueles que possuem uma região contígua e central igual ao siRNA; e ii) aqueles que apresentam apenas de seis a sete nucleotídeos com pareamento perfeito na região 2-7 ou 2-8 da fita guia, a chamada *sequência semente* (do inglês: *seed sequence*). O segundo caso parece ser o maior responsável por silenciamentos inespecíficos, embora o número real de alvos inespecíficos medidos por microarranjo tenha sido muito menor do que o predito computacionalmente. Isto sugere, como corroborado por vários outros estudos, que fatores adicionais ao pareamento perfeito na *sequência semente* são importantes no reconhecimento e degradação do RNA alvo (Pei e Tuschl, 2006).

Estudos relativos ao mecanismo de degradação do RNA alvo sugerem que a *sequência semente* é essencial para a ligação do RISC-RNA ao RNA alvo. Já a região 3' do siRNA ajuda na formação de uma estrutura helicoidal importante para a clivagem. Esta visão molecular ajuda a entender porque mutações na região 5' reduzem o silenciamento, uma vez que aumentam o K_m da ligação siRNA-RNA alvo, enquanto que mutações na 3' reduzem o V_{max} (Haley e Zamore, 2004). Isto quer dizer que siRNAs com mutações no seu 5' podem se tornar funcionais em altas concentrações e siRNAs com mutações no 3' podem levar ao silenciamento, mas com uma velocidade menor, ou alcançar um estado estacionário numa concentração de mRNA maior.

P01: 5' @CAAGUCUCCAACAUGCdUdTdT 3'
 P02: 5' C@CAAGUCUCCAACAUGCdTdT 3'
 P03: 5' GC@CAAGUCUCCAACAUGCdTdT 3'
 P04: 5' UGC@CAAGUCUCCAACAUGdTdT 3'
 P05: 5' UUGC@CAAGUCUCCAACAUGdTdT 3'
 P06: 5' AUUGC@CAAGUCUCCAACAdTdT 3'
 P07: 5' CAUUGC@CAAGUCUCCAACdTdT 3'
 P08: 5' ACAUUGC@CAAGUCUCCAAdTdT 3'
 P09: 5' CACAUUGC@CAAGUCUCCAAdTdT 3'
 P10: 5' UCACAUUGC@CAAGUCUCCdTdT 3'
 P11: 5' GUCACAUUGC@CAAGUCUcdTdT 3'
 P12: 5' AGUCACAUUGC@CAAGUCUdTdT 3'
 P13: 5' CAGUCACAUUGC@CAAGUCdTdT 3'
 P14: 5' GCAGUCACAUUGC@CAAGUdTdT 3'
 P15: 5' AGCAGUCACAUUGC@CAAGdTdT 3'
 P16: 5' CAGCAGUCACAUUGC@CAAdTdT 3'
 P17: 5' UCAGCAGUCACAUUGC@CAdTdT 3'
 P18: 5' GUCAGCAGUCACAUUGC@CdTdT 3'
 P19: 5' UGUCAGCAGUCACAUUGC@dTdT 3'

3'...UGGUAGAAACAGUCGUCAGUGUAACGGGUUCAGAGGUUGUACGGA...5' mRNA mutante de SOD1
 3'...UGGUAGAAACAGUCGUCAGUGUAACGGGUUCAGAGGUUGUACGGA...5' mRNA tipo selvagem de SOD1

(a)



(b)

Figura 2. Efeito de uma base não pareada sobre a eficiência do silenciamento. (A) Foram testadas 19 seqüências, cada qual começando em um ponto diferente do RNA alvo e tendo a mesma base não pareada (G:G), mas em posições diferentes. **(B)** A degradação do RNA alvo foi medida em um lisado de embrião de *Drosophila*. Adaptado de Schwarz et al., 2006. Região “semente” em cinza.

Com base nestes dados, é recomendável que pelo menos três bases não pareadas (*mismatches*) estejam presentes entre as posições 2 e 19 em todos os RNAs não alvos e que não se tenha mais do que oito bases conservadas contínuas, principalmente se estas se encontram na região semente da fita guia e/ou no 3' UTR do mRNA alvo (Pei e Tuschl, 2006). A maioria dos programas que fazem análise de siRNAs alvos já faz uma varredura para testar a existência de alvos não específicos para espécies com o genoma sequenciado. A melhor ferramenta para testar seqüências candidatas é o BLASTn (vide sítio na página inicial do capítulo).

Também existe o risco de bloqueio da tradução, mecanismo pelo qual agem muitos miRNAs com similaridade baixa com o alvo, e estes podem ocorrer com uma similaridade muito menor do que a degradação do mRNA alvo. Foi observado um silenciamento traducional para seqüências com similaridade nas regiões 2-7 e 13-16 da fita guia, mesmo que entre estas duas regiões houvesse uma parte sem semelhança e/ou uma alça de 3 nt a 4 nt (Grimson et al., 2007).

Cópia gratuita - venda proibida

Uma forma interessante de evitar estes efeitos indesejados é adicionar um grupo metil na posição 2' da ribose na segunda base da fita guia, que está no início da *sequência semente*. Isto não afetou o silenciamento específico do RNA alvo, mas reduziu consideravelmente o efeito do tipo miRNA, de bloqueio da tradução em alvos não específicos (Jackson et al., 2006).

Apesar de todas estas sugestões de cuidado, é importante que os pesquisadores nesta área não se tornem dogmáticos e deixem de usufruir do potencial da RNAi devido a estes fatores. Por exemplo, apesar dos riscos de alvos indesejados, muitos estudos que usaram bibliotecas de siRNAs ou shRNAs tiveram sucesso em encontrar genes alvos envolvidos no aspecto para o qual a triagem foi desenhada, apesar de estas bibliotecas raramente serem totalmente validadas. Obviamente que, nestes estudos de triagem, os genes alvos mais importantes devem ser verificados com mais do que um siRNA e com estratégias de reposição.

Experimentos de Reposição

Para se ter certeza se o efeito é realmente devido ao silenciamento de um determinado gene, experimentos nos quais este gene é recolocado na célula geralmente produzem as melhores evidências neste sentido. Obviamente, se isto é feito sem o devido planejamento, o siRNA contra o alvo endógeno também silenciará o gene recolocado na célula.

Existem várias formas de evitar que o siRNA desenhado contra um alvo silencie o mesmo gene, quando transfetado na célula. Uma destas estratégias é usar um siRNA contra a região 3' não traduzida (3' UTR) e expressar uma versão deste gene sem esta UTR em um plasmídeo. Também é possível fazer mutagênese sítio dirigida no plasmídeo contendo a sequência do gene de forma a produzir mutações silenciosas no centro da região alvo. Por fim, pode-se usar o gene de uma espécie diferente a da origem da célula ou organismo em estudo, mas que contenha alterações na região alvo do siRNA. Entre estas três opções, certamente a do 3'UTR é a que precisa menos testes tanto do silenciamento quanto da funcionalidade do gene, evidências que precisam ser testadas nas outras duas formas de reposição.

Conclusão

É praticamente impossível aplicar todas as regras citadas neste capítulo em uma única sequência (Tabelas 1 e 2). Por isto, deve-se incorporar o maior número de cuidados possíveis em cada sequência e usar pelo menos duas sequências, o que se tornou praticamente uma exigência de experimentos usando silenciamento.

Com a presença cada vez maior de programas e sítios da Internet que “planejam” os siRNAs que devem ser usados para um determinado alvo, é razoável que se comece com estes serviços para depois selecionar entre as sugestões apresentadas as sequências que se adequem ao maior número de regras. Além disso, fazer pequenas modificações nestas sequências a fim de permitir experimentos de recuperação ou carregamento mais eficiente da fita antissenso por introdução de bases não pareantes na fita senso. Esse é um mecanismo que, normalmente, os programas de predição não apresentam.

Considerando-se os custos e as dificuldades de um experimento de silenciamento, um bom planejamento é fundamental, o que se inicia com a escolha do melhor siRNA ou shRNA.

Tabela 1. Aspectos que devem ser evitados/observados.

Sequência	Motivos	Ref.
dsRNA com mais de 30 pb	Toxicidade por resposta do tipo interferon e ativação de receptores do tipo Toll.	Reynolds et al., 2006
GCCA ^a ou pentâmeros ricos em AU	Causador de toxicidade celular, sem mecanismo conhecido.	(Fedorov et al., 2006)
UGUGU ^a GUCCUCAA	Ativação de resposta imunológica em leucócitos e células dendríticas e <i>in vivo</i> .	(Hornung et al., 2005; Judge et al., 2005)
Altas concentrações de si- e shRNA	Saturação da maquinaria de silenciamento. Saturação da exportina 5 (apenas shRNAs).	(Grimm et al., 2006)
TTTT ^b	Age como sinal de terminação em shRNAs transcritos por RNA Pol III (promotores U6 ou H1).	(Brummelkamp et al., 2002b)
Regiões com presença de SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>) ^a	A existência de SNPs pode impedir a total complementaridade entre siRNA/RNA alvo. Clivagem reduzida sem o perfeito pareamento.	(Chin et al., 2008)
Existência de formas alternativas de <i>splicing</i>	Se a intenção for silenciar todas as formas alternativas de <i>splicing</i> , o siRNA deve ser comum a todas elas. Caso contrário, uma procura minuciosa deve ser feita para obter um siRNA específico.	(Wiestner et al., 2007)

a. Na sequência do mRNA alvo.

b. Na sequência do shRNA.

Tabela 2. Regras gerais para desenho de siRNAs.

Característica	Formato Padrão	Softwares
Estrutura geral	2 cadeias de 21 nt; 2 nt <i>overhang</i> nas extremidades 3'.	-
Extremidade	3' OH e 5' fostato.	-
Termodinâmica	Instabilidade na extremidade 5' da fita antissenso.	<i>Strand Analysis</i> *
Especificidade	Ausência de similaridade com outros genes não alvos.**	<i>Blast search for short exact near matches (NCBI)</i> ***
Estrutura secundária	Ausência de <i>hairpins</i> , alças, e outras estruturas.	<i>Gene Runner</i>
Conteúdo de CG	Aproximadamente 50% (entre 36% e 52%).	<i>Gene Runner</i>
Sítio alvo no gene	Sequências dentro do RNA maduro (regiões promotoras e íntrons não são utilizados). Geralmente escolhe-se a região codificadora do RNA, mas 5' e 3' UTRs também podem ser utilizadas.	-

* Pereira et al., 2007. *Software* distribuído gratuitamente pelos autores - tiagocampospereira@ffclrp.usp.br.

** Idealmente, o siRNA não deve ter similaridade alguma com genes não alvos. Isso é relativamente simples quando se desenha siRNAs contra vírus: dificilmente eles apresentarão identidade com sequências do hospedeiro. Mas isso pode ser uma tarefa extremamente difícil ao se desenhar siRNAs contra genes humanos. Alguns autores recomendam que a similaridade máxima com outro alvo seja de 14 nt, outros sugerem 11 nt ou 8 nt. Alguns sugerem simplesmente que não deve haver identidade na região *seed*. Portanto, uma similaridade máxima de 14 nt, fora da região *seed*, com outro gene não alvo parece ser razoável.

*** O programa BLAST sugerido é específico para busca por sequências curtas, como o caso de siRNAs. A fita antissenso é a que deve ser utilizada para fazer as buscas (*query*). A procura deve ser feita utilizando o database "*refseq_rna*", que é o banco de transcritos (transcriptoma) não redundantes de um organismo. Se o siRNA é desenhado contra um parasita, esta sequência deve ser feita para os transcriptomas do parasita e do hospedeiro. Se o siRNA é desenhado contra um espécie de vida livre, apenas seu transcriptoma deve ser avaliado.

Informações Adicionais

Em <http://www.ufrgs.br/labsinal/rnaiseq.htm> você encontra uma listagem de sítios da Internet e programas que auxiliam no desenho de siRNAs.

Agradecimentos

A Lucas Rizzo, Luis Felipe Campesato e Alessandra S. K. Tamajusuku pela leitura crítica do texto e sugestões.

Referências

- Bergstrom, C. T., McKittrick, E. and Antia, R. 2003. Mathematical models of RNA silencing: unidirectional amplification limits accidental self-directed reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11511-11516. PMID:12972639 PMCID:208789. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1931639100>
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. and Iggo, R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34:263-264. PMID:12796781. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1173>
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. 2002a. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2:243-247. [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00122-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00122-8)
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. 2002b. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553. PMID:11910072. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068999>
- Chin, L. J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R-U., Straka, E., Su, L., Burki, E. A., Crowell, R. E., Patel, R., Kulkarni, T., Homer, R., Zelterman, D., Kidd, K. K., Zhu, Y., Christiani, D. C., Belinsky, S. A., Slack, F. J. and Weidhaas, J.B. 2008. A SNP in a *let-7* microRNA complementary site in the *KRAS* 3' UTR increases Non-Small Cell Lung Cancer Risc. *Cancer Res* 68:6835-6842. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2129>
- Cullen, B. R. 2006a. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat Methods* 3:677-681. PMID:16929311. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth913>
- Cullen, B. R. 2006b. Induction of stable RNA interference in mammalian cells. *Gene Ther* 13:503-508 PMID:16195700. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302656>
- Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S. and Khvorova, A. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 12:1188-1196. PMID:16682561 PMCID:1484448. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.28106>
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. and Kay, M. A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441:537-541. PMID:16724069. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04791>
- Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P. and Bartel, D. P. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91-105. PMID:17612493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>
- Haley, B. and Zamore, P. D. 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11:599-606. PMID:15170178. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb780>
- Hemann, M. T., Fridman, J. S., Zilfou, J. T., Hernando, E., Paddison, P. J., Cordon-Cardo, C., Hannon, G. J. and Lowe, S. W. 2003. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet* 33:396-400. PMID:12567186. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1091>

- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., De Fougerolles, A., Endres, S. and Hartmann, G. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11:263-270. PMID:15723075. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1191>
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. and Linsley, P. S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635-637. PMID:12754523. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt831>
- Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J. M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W., Khvorova, A. and Linsley, P. S. 2006. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12:1197-1205. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.30706>
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. and MacLachlan, I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23:457-462. PMID:15778705. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1081>
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. D. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115:209-216. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
- Pei, Y. and Tuschl, T. 2006. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* 3:670-676. PMID:16929310. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth911>
- Pereira, T. C., Pascoal, V. D. B., Secolin, R., Rocha, C. S., Maia, I. G. and Iscia Lopes-Cendes. 2007. Strand Analysis, a free online program for the computational identification of the best RNA interference (RNAi) targets based on Gibbs free energy. *Genet Mol Biol* 30:1206-1208. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572007000600030>
- Reynolds, A., Anderson, E. M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W. S. and Khvorova, A. 2006. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *Rna* 12:988-993. PMID:16611941 PMCid:1464853. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2340906>
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. and Khvorova, A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330. PMID:14758366. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt936>
- Schwarz, D. S., Ding, H., Kennington, L., Moore, J. T., Schelter, J., Burchard, J., Linsley, P. S., Aronin, N., Xu, Z. and Zamore, P. D. 2006. Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *PLoS Genet* 2:e140. PMID:16965178 PMCid:1560399. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020140>
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1)
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavigne, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Kotliansky, V., Limmer, S., Manoharan, M., Vornlocher, H. P. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432:173-178. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03121>
- Tafer, H., Ameres, S. L., Obernosterer, G., Gebeshuber, C. A., Schroeder, R., Martinez, J. and Hofacker, I. L. 2008. The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nat Biotechnol* 26:578-583. PMID:18438400. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1404>
- Wassenegger, M. and Krczal, G. 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci* 11:142-151. PMID:16473542. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003>
- Watts, J. K., Deleavey, G. F. and Damha, M. J. 2008. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today* 13:842-855. PMID:18614389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2008.05.007>
- Wiestner, A., Tehrani, M., Chiorazzi, M., Wright, G., Gibellini, F., Nakayama, K., Liu, H., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Ott, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Vose, J., Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., Campo, E., Montserrat, E., Bosch, F., Smeland, E. B., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J., Fisher, R. I., Grogan, T. M., Miller, T. P., Wilson, W. H., Jaffe, E. S. and Staudt, L. M. 2007. Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood* 109: 4599-4608. PMID:17299095 PMCid:1885523. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-08-039859>

Desenho Racional de dsRNAs

Capítulo

7

Cláudia Carolina Silva Evangelista¹, Gustavo Borges² e Prof. Dr. Tiago Campos Pereira²

¹*Depto. de Genética, FMRP, USP*

²*Depto. de Biologia, FFCLRP, USP*

Introdução

Enquanto o desenho de siRNAs requer várias etapas tais como: (i) análise da funcionalidade (instabilidade da 5' da fita antissenso), (ii) ausência de estrutura secundária e (iii) especificidade; a escolha de dsRNAs é um processo bem mais simples. Isto ocorre porque o processamento de um dsRNA de 500 pb pode gerar aproximadamente 500 siRNAs distintos que, em conjunto, são funcionais. Portanto a única análise necessária é referente à especificidade.

Tamanho da Sequência

A literatura sugere que o dsRNA tenha um tamanho entre 300 pb e 800 pb. Sequências mais curtas seriam menos eficazes para desencadear a RNAi, as mais longas teriam mais chances de ser inespecíficas. Contudo, há relatos na literatura de uso de dsRNAs menores que 300 pb (Kandasamy et al., 2005) assim como mais extensos que 800 bp (Fire et al., 1998).

Em algumas situações muito especiais, o pesquisador pode se encontrar com uma sequência de apenas 100 pb. Uma estratégia para estes casos é a montagem de concatâmeros (repetições em tandem) até gerar um dsRNA >300 pb; uma construção semelhante pode ser vista no trabalho Alakonya et al. (2012).

A Região de Interesse

O início do desenho de dsRNAs se baseia na sequência alvo, que pode estar depositada em bancos públicos (como GenBank, bastando-lhe conhecer o número de acesso) ou ter sido originalmente descrita por seu grupo de pesquisa. Com a sequência (parcial ou completa) em mãos, cabe ao pesquisador escolher qual região irá utilizar: (i) apenas a porção 5' não

traduzida (5' UTR); (ii) apenas a 3' UTR; (iii) apenas a região codificadora (CDS); ou (iv) toda a sequência. Diferentes autores apresentam argumentações distintas. Alguns pesquisadores descrevem as porções UTR como as mais adequadas, pois não há uma pressão seletiva forte visando a conservação da sequência nucleotídica. Portanto, as UTRs são mais diversas e, conseqüentemente, dsRNAs contra estas regiões tenderiam a ser mais específicos. Outro argumento neste sentido é que grande parte dos microRNAs interage com a porção 3' UTR, evidenciando a funcionalidade da região. Entretanto, deve-se também lembrar que ambas as UTRs podem apresentar interações com uma ampla gama de proteínas, para a iniciação da tradução (5' UTR) e estabilização/regulação por miRNAs endógenos (3' UTR). Estes eventos reduziriam a acessibilidade destas regiões aos dsRNAs.

Outros estudiosos são favoráveis ao uso da sequência CDS por acreditarem que esta é mais acessível, devido aos motivos relativos às porções UTRs. Apesar de toda esta argumentação, há na literatura diversos papers com exemplos de dsRNAs contra a 5' UTR (Yuan et al., 2012), CDS (Buzzi et al., 2011) e 3' UTR (Alakonya et al., 2012), havendo uma preferência pela CDS e 3' UTR.

CDS: Procura por Domínios Conservados

Caso a CDS seja escolhida, um passo importante é a identificação de eventuais domínios conservados. Por exemplo, inúmeras enzimas têm o DNA como substrato (polimerases, nucleases, metiltransferases, etc.), portanto elas podem compartilhar domínios comuns de interação com o DNA. Neste sentido, um dsRNA que englobe este domínio pode promover o silenciamento de vários genes.

Para evitar este *knockdown* cruzado, uma análise é realizada em bancos especializados tais como o “*Conserved domains database*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). O resultado final indica quais posições da CDS apresentam domínios conservados com outras proteínas; utiliza-se então um região >300 pb sem domínios conservados para prosseguir com o desenho.

Análise de Especificidade (UTRs e CDS)

A etapa seguinte é a verificação de regiões de similaridade entre a sequência escolhida e transcritos no organismo alvo. Para tanto, se utiliza um programa específico do pacote BLAST do NCBI, denominado “*Search for short, nearly exact matches*” (informações do *site* ao final do capítulo).

Uma vez dentro do *site*, as etapas são:

- Depositar a sequência nucleotídica na janela da parte superior da página.
- Em *database*: escolher opção “*Reference RNA Sequences (REFSEQ_RNA)*”.
- Em *Organism*: digitar o nome científico do seu modelo.
- Clicar “*BLAST*” e aguardar o resultado.

Em resumo, o programa irá verificar se há regiões similares entre a sua sequência e o transcriptoma (REFSEQ_RNA) do seu organismo de estudo. Há algumas observações importantes a se fazer.

Cópia gratuita - venda proibida

A primeira é: a qual(is) organismo(s) a procura deve ser aplicada. Se o objetivo é usar a RNAi para identificar a função do gene “ABC” de planária, o parâmetro “*Organism*” deve ser preenchido simplesmente com *Polycelis felina*. Este procedimento avaliará se outros transcritos (não alvos) seriam silenciados em planária. Somente a inativação única e exclusiva do gene “ABC” permitirá fazer uma inferência inequívoca entre o fenótipo observado após o silenciamento e a função do gene “ABC”.

Por outro lado, se o objetivo é identificar a função do gene “TLC” de um de vírus que infecta plantas de tabaco, o dsRNA não pode inativar nenhum outro gene do patógeno, nem tampouco nenhum gene do hospedeiro. O silenciamento de outros genes (do vírus ou do tabaco) alteraria o resultado final, impossibilitando uma associação inequívoca entre o fenótipo observado através de RNAi e a função do gene “TLC”. Portanto, neste sentido, duas buscas independentes devem ser feitas: (i) uma preenchendo o parâmetro “*Organism*” com o nome científico do vírus e (ii) outra com *Nicotiana tabacum*.

Por fim, se o objetivo não for conhecer mais sobre a biologia do vírus (*i.e.*, identificar a função de certo gene), mas sim *combater* o patógeno, a inativação de um ou vários genes do vírus não é problemática (podendo até mesmo ser vantajosa). Portanto, nestas terceira situação, a procura pode ser feita apenas contra *Nicotiana tabacum*; mesmo que o dsRNA silencie outros genes do vírus isto não é um obstáculo para o objetivo final.

Quanto mais complexo for o sistema, mais profunda deve ser a análise. Suponha que a pesquisa visa produzir plantas transgênicas de batata, expressando um dsRNA para combater um nematoide. Neste caso, a análise de especificidade deve ser feita contra (i) a planta e (ii) cada uma das espécies que potencialmente se alimentam do nematoide ou da planta, inclusive o *Homo sapiens*.

Segunda observação: para os organismos cujos transcriptomas não estão definidos (ou apresentam poucas sequências conhecidas) a alternativa é fazer a análise utilizando o *database* “Nucleotide collection (nr/nt)”. O problema deste banco é sua redundância, *i.e.*, a mesma sequência pode ter sido depositada inúmeras vezes (dificultando a análise), além de apresentar sequências genômicas, que são irrelevantes para o processo de RNAi.

Por fim, quando não há sequências de sua espécie depositadas no banco (REFSEQ_RNA, EST ou nr/nt), sugere-se que se insira apenas o gênero (ou família) no parâmetro “*Organism*”. Note que esta abordagem é apenas uma estratégia para lhe conceder alguma informação sobre a especificidade, ela não gera dados definitivos.

Interpretação dos Resultados

De forma geral, ao se conduzir o BLAST com os parâmetros sugeridos (REFSEQ_RNA e organismo específico), o resultado se compõe de duas classes de *hits*: (i) uma linha vermelha, com o mesmo tamanho da sua sequência e (ii) uma série de pequenos traços pretos, distribuídos ao longo de grande parte da sua sequência (Figura 1).

Cópia gratuita - venda proibida

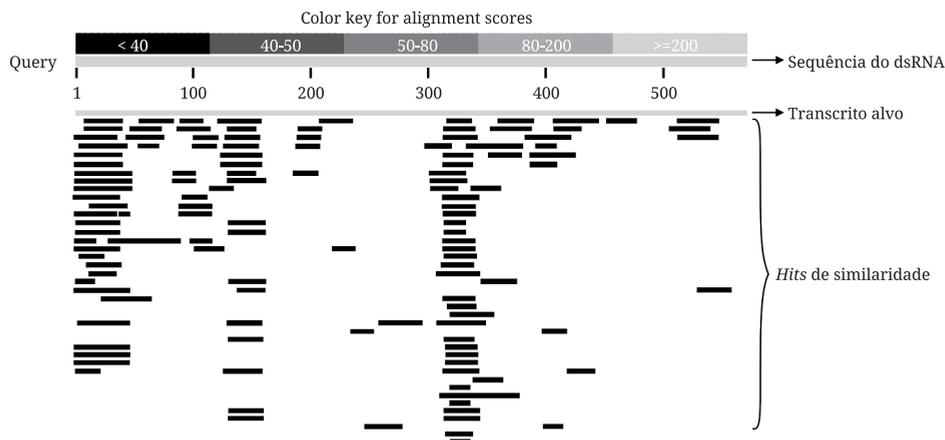


FIGURA 1. Resultado de BLAST. Usualmente, um resultado de BLAST *Search for short, nearly exact matches* gera este tipo de imagem. O “*query*” representa a sequência do dsRNA, o primeiro *hit* (que no *site* é vermelho) representa o próprio transcrito alvo. Os inúmeros *hits* menores (traços pretos) correspondem a diversas pequenas regiões de similaridade entre o dsRNA e transcritos não alvos. Se uma determinada região do dsRNA apresentar *hits* com tamanho igual ou maior que 21 nt de identidade contínua, ela deve ser excluída.

O primeiro resultado (linha vermelha) corresponde ao próprio transcrito alvo, como esperado. Cada um dos pequenos traços pretos corresponde a *hits* de similaridade entre seu dsRNA e outros transcritos não alvos. Resumidamente, estes *hits* podem apresentar, no máximo, 20 nucleotídeos contínuos idênticos com outros transcritos não alvos. Se houver *hits* com um número igual ou maior que 21 nt contínuos idênticos com outro transcrito não alvo deve-se excluir esta região. Note que *hits* com 24 nt idênticos em uma região de 25 nt (24/25) não apresentam identidade contínua, portanto não são problemáticos. Semelhantemente, *hits* como 20/21, 21/22, 23/27 não são problemáticos.

É importante lembrar que há outros fatores biológicos mais profundos a serem considerados como: (i) o transcrito não alvo é expresso no mesmo tecido e no mesmo período de desenvolvimento em que o dsRNA está sendo administrado? (ii) a similaridade é com a fita senso ou antissenso do transcrito? Estas questões, por sua vez, demandam análises e interpretações mais detalhadas através de estudos moleculares e computacionais.

Observações Finais

Em qualquer caso (dsRNA ou siRNA) é importante lembrar que a existência de: (i) famílias gênicas, (ii) formas alternativas de splicing e (iii) SNPs (single nucleotide polymorphisms) em seu gene de interesse devem ser consideradas para um silenciamento adequado.

Site para o Programa Blast Específico

1) Passo a passo:

- Digitar em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Clicar em BLAST
 - Clicar em HELP
 - Clicar em BLAST program selection guide
 - Clicar em Program Selection Table
 - Clicar em Search for short, nearly exact matches
- 2) Link rápido (endereço sujeito a alterações pelo NCBI):
- Digitar http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=ProgSelectionGuide#pstab
 - Clicar em Search for short, nearly exact matches

Bibliografia

- Alakonya, A., Kumar, R., Koenig, D., Kimura, S., Townsley, B., Runo, S., Garces, H. M., Kang, J., Yanez, A., David-Schwartz, R., Machuka, J. and Sinha, N. 2012. Interspecific RNA Interference of SHOOT MERISTEMLESS-Like Disrupts *Cuscuta pentagona* Plant Parasitism. *Plant Cell* 24(7):3153-66. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.099994>
- Buzzi, L. I., Simonetta, S. H., Parodi, A. J. and Castro, O. A. 2011. The two *Caenorhabditis elegans* UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase homologues have distinct biological functions. *PLoS One* 6(11):e27025. PMID:22073243 PMCID:3206904. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027025>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11. PMID:9486653. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
- Kandasamy, M. K., Deal, R. B., McKinney, E. C. and Meagher, R. B. 2005. Silencing the nuclear actin-related protein AtARP4 in *Arabidopsis* has multiple effects on plant development, including early flowering and delayed floral senescence. *Plant J* 41(6):845-58. PMID:15743449. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02345.x>
- Yuan, S., Zhu, H., Gou, H., Fu, W., Liu, L., Chen, T., Ke, D., Kang, H., Xie, Q., Hong, Z. and Zhang, Z. 2012. A Ubiquitin Ligase of Symbiosis Receptor Kinase Involved in Nodule Organogenesis. *Plant Physiol* 160(1):106-17. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.199000>

Controles Utilizados & Confirmação do Silenciamento

Capítulo

8

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira¹

¹*Depto. de Biologia, FFCLRP, USP*

Introdução

Como em qualquer experimento, a utilização da RNAi também envolve controles positivos e negativos. Alguns destes foram muito utilizados nos primeiros anos de desenvolvimento da técnica e caíram em desuso, outros ainda são muito úteis e alguns são indispensáveis. Apresentaremos aqui os principais controles utilizados e suas funções. Discutiremos também sobre a relevância de se confirmar o *knockdown* do RNA, da proteína, assim como o uso de técnicas adicionais para se confirmar se o processo desencadeado foi o de RNAi.

Controles Positivos

Controle Positivo de Transfecção

Este tipo de controle também conhecido como *controle marcado (labeled control)* é indicado basicamente em duas situações: (i) quando se deseja verificar se o método de *delivery* de duplexes (transfecção, eletroporação, imersão, etc.) utilizado no laboratório está adequado ou (ii) para avaliar a eficiência de uma nova estratégia de entrega (Rinaldi et al., 2011; Tang et al., 2012). O ideal nestas situações é utilizar um duplex marcado, por exemplo, com algum composto fluorescente. Neste caso, a marcação permite determinar, por microscopia de fluorescência, a eficiência de entrega de duplex pela estratégia empregada.

Há diversas modificações químicas comercialmente disponíveis para marcação de siRNAs, tais como: *Alexa Fluor* (488, 546, 555 e 647), *Cy3*, *Cy5*, *FITC* além de *rhodamine dyes*. A modificação química de dsRNAs longos também é possível por meio de *kits* de marcação tais como “*LabelIT® Nucleic Acid Labeling Kit, CX-Rhodamine*” (Boyle et al., 2003). Estes kits são utilizados após a produção do dsRNA via transcrição *in vitro*. Transgenes e moléculas clonadas em vetores não podem ser

Cópia gratuita - venda proibida

marcados. Nota: verifique se sua célula ou organismo modelo apresentam autofluorescência antes de escolher o fluoróforo.

Controle Positivo de Silenciamento

A via de PTGS (consequentemente a aplicabilidade da RNAi) está presente em uma vasta gama de espécies, mas há exceções: (i) espécies do domínio *Archaea*, (ii) espécies do domínio *Bactéria* e (iii) um reduzido número de espécies eucarióticas (*S. cerevisiae*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* entre outros). Adicionalmente, o mecanismo de PTGS não necessariamente está ativo em todos os tecidos durante todas as fases de desenvolvimento de um organismo eucarioto.

Portanto, quando se deseja realizar os primeiros experimentos de RNAi em (i) uma determinada espécie eucariótica ou (ii) um tipo celular específico, para os quais a existência do mecanismo de RNAi não foi demonstrada anteriormente, o ideal é realizar um ensaio-piloto com um controle positivo de silenciamento.

No caso de uma espécie eucariótica para a qual não há registros na literatura de experimentos de RNAi até então, uma das possibilidades é a cotransfecção de um plasmídeo expressando GFP (ou luciferase) juntamente com um siRNA contra este gene (McCaffrey et al., 2002; Rinaldi et al., 2011). Espécimes submetidos a este processo não devem apresentar sinais de fluorescência, ao passo que espécimes transfectados apenas com o plasmídeo GFP, sim.

No caso de testes em um tipo celular específico, para o qual não há trabalhos demonstrando a existência de atividade da via de PTGS, geralmente utiliza-se um siRNA contra um *housekeeping gene*, tal como GAPDH, cuja expressão é constitutiva e ubíqua (Kishida et al., 2004). Nos cenários citados, os siRNAs contra GFP / GAPDH são, portanto, controles positivos de silenciamento.

É muito comum o relato de pesquisadores sobre dificuldades em desencadear RNAi em seu modelo específico de interesse. O controle positivo de silenciamento é muito útil para estas situações pois, além de evidenciar (indiretamente) que a estratégia de administração do duplex está funcionando, ele evidencia que a via de silenciamento gênico está presente na sua espécie/tipo celular/fase específica do desenvolvimento estudado.

Controles Negativos

Controle Irrelevante

Existem processos biológicos que são “independentes de sequência” (*sequence-independent*), como a ativação da resposta interferon por dsRNAs. Ou seja, qualquer dsRNA ativa a resposta, independentemente de sua sequência nucleotídica. Uma das primeiras perguntas sobre o processo de RNAi é se ele era ou não dependente de sequência.

De fato, um duplex contra o gene *cdh-1* é capaz de silenciar o transcrito alvo *cdh-1*, mas não o transcrito *cdc-20*. Semelhantemente, um duplex contra *cdc-20* promove apenas o silenciamento do transcrito *cdc-20*, mas não de *cdh-1* (Brummelkamp et al., 2002). Dados como este evidenciam claramente um processo dependente de sequência.

Com o crescente uso da RNAi, foi proposto um controle “universal” para evidenciar o aspecto de sequência-especificidade, denominado *irrelevant* ou *nonspecific control*. O dsRNA

contra GFP (*Green Fluorescent Protein*, gene codificado pela água-viva) foi sugerido como este *controle irrelevante* “universal” (Elbashir et al., 2002), já que ele não apresenta similaridade com transcritos da maioria das espécies estudadas. Portanto, o dsRNA experimental deveria silenciar o gene alvo, ao passo que o dsRNA irrelevante não, evidenciando assim a especificidade.

Com o tempo, o controle irrelevante ganhou uma segunda função: *avaliar a existência de eventuais efeitos inespecíficos mediados por dsRNAs*. Quando se introduz um dsRNA, a expectativa é que ele simplesmente promova a clivagem do gene alvo, sem afetar nada mais no organismo. Contudo, isso pode não ser verdade. Por exemplo, se o dsRNA experimental for administrado com uma massa excessiva, a maquinaria celular de processamento de dsRNAs pode ser afetada, levando inclusive a alterações na maturação de miRNAs endógenos (Grimm et al., 2006; Khan et al., 2009). Adicionalmente, a simples presença do dsRNA pode ativar resposta interferon (Bridge et al., 2003; Hornung et al., 2005; Poeck et al., 2008), levar a alterações na expressão gênica (Persengiev et al., 2004), promover modificações fenotípicas ou até mesmo a morte celular.

Portanto, é importante distinguir os efeitos que são derivados do *silenciamento do gene alvo* daqueles promovidos *simplesmente pela presença de um RNA de dupla fita qualquer*. O controle irrelevante cumpre exatamente esta função. Ao se introduzir um “dsRNA qualquer” (por isto o nome *irrelevante*), nenhuma alteração gênica, bioquímica, celular, fenotípica ou de viabilidade deveria ocorrer. Consequentemente, toda e qualquer alteração que surgisse após a introdução do “dsRNA experimental” seria derivada do silenciamento do gene alvo. Por estes motivos, o controle irrelevante é inquestionavelmente o controle mais importante em experimentos de RNAi, sendo indispensável.

O controle irrelevante deve ser de mesma natureza e tamanho do dsRNA experimental. Por exemplo, se o experimento envolver um dsRNA de 500 pb contra o gene “GHW-3”, idealmente deve-se usar um dsRNA de ~500 pb contra GFP, na mesma concentração final e tampão. Contudo, *pequenas* diferenças entre os tamanhos do dsRNA experimental e o dsRNA irrelevante são aceitáveis e comuns na literatura (Fire et al., 1998).

Apesar de GFP ser a sequência mais utilizada, o princípio do controle irrelevante é utilizar um dsRNA incapaz de se parear com alvos no transcriptoma em estudo, portanto, não deve haver clivagem de RNAs. Neste sentido, é muito comum encontrarmos outros exemplos de controles irrelevantes tais como luciferase e até mesmo sequências de íntrons (Fire et al., 1998) ou de vírus (Pereira et al., 2008). O princípio é o mesmo: o dsRNA não deve ter similaridade com nada no transcriptoma da espécie em estudo. Embora alguns trabalhos utilizem sequências de promotores (Fire et al., 1998), elas não são recomendadas pois podem desencadear silenciamento gênico transcricional.

Portanto, um dsRNA contra GFP (comumente denominado dsGFP) não serve como controle irrelevante em estudos com água-viva (organismo que apresenta o gene GFP em seu genoma), assim como um dsRNA contra um vírus não serve como controle irrelevante em estudos no qual este vírus está presente.

Algumas empresas fornecem si- e shRNAs irrelevantes, contudo não revelam suas sequências nucleotídicas. Apesar de funcionarem como controles negativos, a não divulgação da sequência impede uma análise criteriosa, comprometendo seriamente as bases da pesquisa científica.

Controle Embaralhado (*Scrambled*)

Alguns processos celulares são dependentes da porcentagem de CG (%CG) da sequência envolvida, tal como a metilação do DNA. Portanto, sob um olhar mais criterioso, o controle irrelevante deveria apresentar a mesma %CG que o siRNA experimental. O controle *scrambled* tem esta propriedade, pois ele é gerado pelo simples embaralhamento dos nucleotídeos do siRNA experimental utilizado (Splinter et al., 2003; Rinaldi et al., 2011).

Portanto, *scrambled* é um controle irrelevante tecnicamente mais adequado, por conservar a mesma composição nucleotídica do siRNA experimental. Este tipo de controle negativo era amplamente utilizado nos primeiros anos de aplicação da RNAi, mas tem caído em desuso devido a duas questões: (i) só é aplicável para si- e shRNAs e (ii) não é universal, *i.e.*, cada siRNA experimental exige um *scrambled* correspondente.

Controle Invertido (ou Reverso)

Outro controle muito comum nos primeiros anos da técnica foi o *controle invertido* (também conhecido como *reverso*), constituído pela mesma sequência do duplex experimental, porém na orientação inversa (3'-5') (Elbashir et al., 2001, McCaffrey et al., 2002; Paul et al., 2002). Portanto, assim como *scrambled*, ele corresponde a um tipo de controle irrelevante, mantém a constituição nucleotídica do duplex experimental e não é universal. Alguns pesquisadores que trabalham com RNAi mediada por vetores ainda optam por este tipo de controle devido a simplicidade em se gerar a construção invertida; porém ele é bem menos comum que o irrelevante universal GFP.

Controle Mutado

Ainda no início, outro aspecto que demandava uma comprovação exaustiva por grupos distintos era a *dependência de total complementaridade* entre o oligo guia e o alvo para ocorrer a clivagem. Para isto, utilizavam-se siRNAs cujas sequências nucleotídicas apresentavam mutações na região central do oligo guia (Brummelkamp et al., 2002), que é crítica para a clivagem do RNA alvo por *slicer*. Por este motivo, é comum encontrar na literatura entre os anos de 2001 a 2005, artigos utilizando controles mutados (*mutated* ou *mismatch control*).

Contudo, foi demonstrado que, apesar de os controles mutados não promoverem a clivagem do RNA alvo, em muitos casos eles levavam à inibição da tradução, agindo assim como um miRNA ou RNA antissenso (Saxena et al., 2003; Doench et al., 2003). Por estes motivos, o controle mutado não é mais amplamente utilizado.

Outros Controles

Os controles “tampão apenas” (*buffer only*), “vetor vazio” (*empty vector*) (Brummelkamp et al., 2002), “construção vazia” (*empty cassette*) visam avaliar se existe ou não um efeito adverso do tampão, vetor ou construção do transgene (e sua integração no genoma) no sistema biológico avaliado. Todos eles são controles comuns e úteis, mas suas (in-) dispensabilidades variam muito, de acordo com o autor e os critérios da revista científica.

Cópia gratuita - venda proibida

O significado da expressão “controle mock” (*mock control*) varia muito de acordo com o autor do trabalho, podendo significar, por exemplo, uma amostra submetida ao *tampão apenas* ou a *nenhum procedimento qualquer*. Uma visão geral da utilização dos controles negativos pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1. Controles Negativos de acordo com a estratégia escolhida.

Molécula	tampão	vetor vazio / construção vazia	Scrambled	Irrelevante
dsRNA simples	comum‡	-	-	dsRNA contra GFP
dsRNA clonado em vetor*	comum‡	comum‡	-	dsRNA contra GFP clonado em vetor
dsRNA como transgene	-	› ‹	-	transgene de dsRNA contra GFP
hpRNA	comum‡	-	-	hpRNA contra GFP
hpRNA clonado em vetor	comum‡	comum‡	-	hpRNA contra GFP clonado em vetor
hpRNA como transgene	-	› ‹	-	transgene de hpRNA contra GFP
siRNA	comum‡	-	pouco usado atualmente	siRNA contra GFP
siRNA clonado em vetor***	comum‡	comum‡	› ‹	siRNA contra GFP clonado em vetor
siRNA como transgene**	-	› ‹	› ‹	transgene de siRNA contra GFP
siRNA bifurcado	comum‡	-	› ‹	siRNA (não bifurcado) contra GFP
substrato de dicer	comum‡	-	› ‹	substrato de dicer contra GFP
substrato de dicer clonado	comum‡	comum‡	› ‹	substrato de dicer clonado contra GFP
substrato de dicer como transgene	-	› ‹	› ‹	transgene de substrato de dicer contra GFP
esiRNAs	comum‡	-	-	esiRNAs contra GFP
shRNA simples	comum‡	-	› ‹	shRNA contra GFP
shRNA clonado em vetor	comum‡	comum‡	› ‹	shRNA contra GFP clonado
shRNA como transgene	-	› ‹	› ‹	transgene de shRNA contra GFP
shRNA multimérico	comum‡	-	› ‹	shRNA multimérico contra GFP
aiRNA	comum‡	-	› ‹	aiRNA contra GFP
siRNA de 16 pb	comum‡	-	› ‹	siRNA de 16 pb contra GFP
siRNA coesivos	comum‡	-	› ‹	siRNAs coesivos contra GFP

* É o exemplo de insertos clonados no vetor L4440, usado para RNAi via alimentação em *C. elegans*.

** Este tipo de construção é possível, mas não é amplamente utilizada.

- não se aplica.

‡ mas não indispensável.

› ‹ possível, mas não é comum.

Controle Comparativo

Controle “RNA Antissenso”

Com a intenção de confrontar as eficiências de silenciamento mediado pela técnica de “RNA antissenso” e RNAi, um tipo de “controle comparativo” foi utilizado durante os primeiros anos (Fire et al., 1998; Novina et al., 2002; Paul et al., 2002). Este “controle RNA antissenso” era constituído unicamente pelo *oligo antissenso* do siRNA. Em muitos casos, observou-se que a taxa de *knockdown* por RNA antissenso (~50%) é de fato bem menor que a de RNAi (>90%). Este controle tem simplesmente um caráter comparativo, sendo totalmente dispensável.

Controles para Especificidade

Análises com dois ou três siRNAs distintos contra o mesmo gene alvo foram sugeridas já nos primeiros protocolos (Elbashir et al., 2002), sendo uma prática comum em alguns trabalhos; em conjunto eles são chamados “controles de especificidade”.

Considere a situação hipotética a seguir: um duplex denominado siRNA-1 dirigido contra o gene alvo *windsor* promove um grupo de alterações fenotípicas, denominadas “a”, “b” e “c”. Em um segundo experimento independente, a administração de um siRNA-2 contra o mesmo gene alvo promove as alterações “a” e “c”. Um terceiro ensaio, com o siRNA-3, promove as alterações “c” e “d”. O siRNA-4 promove apenas a alteração “c”.

A interpretação biológica deste experimento hipotético é que o silenciamento do gene *windsor* promove a alteração fenotípica “c” (por exemplo, proliferação celular acentuada), que é a única modificação comum em todos os experimentos. Os efeitos “a” e “b” gerados pelo siRNA-1 ocorrem provavelmente porque este duplex apresenta *off-targets*, i.e., silencia outros genes responsáveis pelas duas alterações. O mesmo se aplica ao siRNA-2 (alteração “a”) e siRNA-3 (alteração “d”). O siRNA-4 seria, aparentemente, o único duplex totalmente específico (sem *off-targets*).

A existência destes *off-targets* pode ser devida a um pareamento perfeito (ou imperfeito) do siRNA com outros genes indesejados. Portanto, os controles de especificidade são todos aqueles siRNAs direcionados contra o mesmo gene alvo, porém contra regiões distintas do mRNA e utilizados em experimentos separados. Apesar de eventualmente promoverem efeitos distintos, a alteração comum a todos eles é resultado do *knockdown* do gene em estudo.

Confirmação Molecular do Silenciamento

É muito comum pesquisadores assumirem que a confirmação do *knockdown* da proteína é suficiente para seus estudos com RNAi, julgando a análise do RNA totalmente desnecessária. O pensamento inverso também é frequente.

É possível que, acidentalmente, o siRNA apresente complementaridade imperfeita com o alvo. Neste caso, não haveria *knockdown* do RNA (pois não há clivagem), mas possivelmente sim da proteína (por inibição da tradução). Alternativamente, é possível que o siRNA promova

Cópia gratuita - venda proibida

a clivagem do RNA alvo, mas que a proteína permaneça com níveis inalterados devido à vida-média excepcionalmente longa (Savas et al., 2012).

É inquestionável que alterações fenotípicas surgirão apenas se houver o knockdown da proteína. Contudo, a análise de RNA irá *evidenciar* se este efeito foi promovido por RNAi (clivagem) ou por efeito de miRNA/RNA antissenso (inibição da tradução).

Análise do RNA

Tendo em vista que siRNAs exógenos ou endógenos têm como alvo as moléculas de mRNA do gene de interesse, o monitoramento dos níveis intracelulares do mRNA representa uma medida da potência e da eficiência do silenciamento induzido por essas moléculas. Para tal, o método mais simples e extremamente sensível compreende a síntese das moléculas de cDNA a partir do RNA total da célula pela reação da transcriptase reversa (RT), seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), sendo possível quantificar os níveis de expressão do gene alvo em função do tempo, após a entrega do duplex de RNA. Uma sugestão comum por pesquisadores da área é que os *primers* sejam desenhados flanqueando o sítio de clivagem. Esta proposta se deve ao fato de que, raramente, após a clivagem por *slicer*, um dos fragmentos resultantes (3' ou 5') pode permanecer estável na célula. Caso o par de *primers* esteja posicionado dentro do fragmento estável, os dados da RT-PCR serão comprometidos.

Apesar de mais trabalhosas, *northern blot* e o ensaio de proteção à ribonuclease (RPA-*Ribonuclease Protection Assay*) também representam poderosas estratégias para validação do *knockdown* gênico induzido por RNAi. Por sua vez, a tecnologia de microarranjos pode evidenciar, adicionalmente, efeitos inespecíficos globais.

De um modo geral, a análise do RNA é conduzida dentro de um intervalo de 24 a 96 horas após a transfecção/transdução; um experimento ideal revela quedas dos níveis do mRNA alvo entre 70% e 95%.

Análise da Proteína

É imprescindível salientar que uma redução nos níveis do mRNA alvo não implica uma redução imediata nos níveis proteicos em questão. O processo de RNAi apenas impede indiretamente a síntese novas proteínas codificadas pelo ao gene alvo. Ou seja, as proteínas do gene alvo pré-existentes na célula continuam a exercer sua função biológica até que naturalmente sejam degradadas. A implicação direta de tal observação é que o silenciamento via RNAi de uma proteína de vida-média longa (48 h a 72 h) requer uma janela de tempo maior para um silenciamento efetivo, de modo que uma diminuição ou total depleção dos níveis da proteína alvo possam ser alcançadas somente 96 h ou 120 h pós-transfecção/transdução. Assim, a eficiência do silenciamento deve também ser avaliada através da medição dos níveis da proteína alvo por meio de ensaios diretos baseados na imunodeteção por *western blot*, citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência, bem como por ensaios indiretos como medida da atividade enzimática – metodologia essa aplicável no caso de proteínas com atividade catalítica. Entretanto, vale mencionar que uma pequena redução nos níveis proteicos não implica necessariamente em alterações fenotípicas. Um exemplo

disto são os genes haplo-suficientes, i.e., aqueles para os quais a presença de apenas metade da quantidade normal de proteína funcional é suficiente para que processo biológico ocorra normalmente. Para estes genes, silenciamentos que resultem em níveis de proteínas entre 50 e 99% não promoveriam alterações fenotípicas.

Análise do Mecanismo de Silenciamento

Frequentemente, ao se utilizar um siRNA e observar o knockdown (do RNA ou proteína), assume-se automática e equivocadamente que o processo foi necessariamente mediado por RNAi (clivagem).

Contudo, existem diversas formas pelas quais um gene pode ser silenciado por duplexes de RNA: transcricionalmente (metilação do DNA) (Morris et al., 2004); pós-transcricionalmente (clivagem endonucleolítica por *slicer*) (Liu et al., 2004; Song et al., 2004); por inibição da tradução (Doench et al., 2003; Brodersen et al., 2008); por *decapping* e/ou *deadenylation* (Wu et al., 2006; Mathonnet et al., 2007; Eulalio et al., 2009; Djuranovic et al., 2012).

Quando a intenção do pesquisador é simplesmente silenciar o gene, *independente do mecanismo*, basta a administração do duplex de RNA seguida da análise da proteína. Contudo, o mecanismo exato pelo qual o silenciamento foi promovido permaneceria oculto e isto pode ser problemático, dependendo de sua pergunta biológica ou, até mesmo, da revista à qual se pretende submeter os resultados.

Como discutido anteriormente, a comprovação do *knockdown* do RNA alvo *corrobora* a interpretação de que o mecanismo foi de RNAi, porém não comprova de maneira inequívoca. A queda no nível do RNA pode ter sido devida ao processo de metilação do DNA mediado por RNA (RMDM), um tipo de silenciamento transcricional.

Uma das diferenças entre a RNAi e a RMDM é que na primeira há clivagem do RNA alvo, ao passo que na segunda ocorre metilação do DNA correspondente à sequência alvo. Portanto, o uso de técnicas adicionais como (i) PARE (German et al., 2009; Zheng et al., 2012; Folkes et al., 2012) ou “5'-RLM-RACE - PCR” (Davis et al., 2010), que identificam o sítio de clivagem por *slicer* e (ii) aquelas para análise de metilação do DNA podem determinar, de maneira inequívoca, qual foi o processo envolvido.

Alguns pesquisadores conduzem também um *northern blot* avaliando o acúmulo de siRNAs, quando o processo é desencadeado por sh- e dsRNAs (Brummelkamp et al., 2002; Carmell et al., 2003). Esta análise serve apenas para demonstrar que o processamento por dicer está ativo, mas não evidencia qual mecanismo de silenciamento (transcricional ou pós-transcricional) é responsável pelo *knockdown*.

A exigência destas análises detalhadas tem sido negligenciada pelas revistas científicas e pelos pesquisadores de uma maneira geral. Apenas eventualmente, em artigos que reivindicam verdadeiros *breakthroughs*, é que se vê tal nível de exigência. Um caso recente, claro e bem representativo desta questão refere-se aos primeiros usos da RNAi na terapêutica em humanos. Esta aplicação pioneira na clínica médica era algo esperado com grande expectativa desde os primórdios da técnica, em 1998.

Em 2007, um grupo alemão publicou o primeiro relato da aplicação da RNAi em pacientes humanos (leucemia mieloide). Contudo, eles avaliaram apenas o *knockdown* do gene e o efeito terapêutico, sem *comprovar* molecularmente que o processo fora promovido por RNAi (Koldehoff et al., 2007). Consequentemente, este artigo que tinha o potencial para ser publicado em uma revista de altíssimo impacto e representar um verdadeiro marco na história da medicina caiu na obscuridade, permanecendo virtualmente desconhecido (28 citações em seis anos). Em 2008, um segundo grupo publicou seus dados sobre a aplicação de siRNAs no controle de *blinding choroidal neovascularization*. Apesar de obterem um efeito terapêutico favorável, após uma série mais profunda de análises moleculares eles verificaram que o mecanismo não foi baseado em RNAi. De qualquer maneira, os resultados clínicos e a investigação dos processos moleculares envolvidos lhes renderam um artigo na Nature (Kleinman et al., 2008) (431 citações em 5 anos).

Alguns outros trabalhos foram publicados em seguida (Kleinman et al., 2008; Koldehoff e Elmaagacli, 2009; Leachman et al., 2010), porém foi um grupo do CalTech - MIT - UCLA o primeiro a comprovar molecularmente o processo de RNAi durante uma aplicação terapêutica em humanos (Davis et al., 2010). O trabalho deste grupo alcançou a condição de “marco” na história da medicina por um motivo simples: os autores entenderam que era de suma importância, nesta situação especial, demonstrar molecularmente que o processo era de Interferência por RNA. O resultado foi uma publicação na prestigiosa revista Nature, com 522 citações em apenas de 3 anos.

Conclusão

O campo da RNAi possui diversos controles: positivos, negativos, comparativos e de especificidade. Os positivos são muito úteis para ensaios iniciais em novos modelos. Apenas um tipo de controle negativo é inquestionavelmente essencial: o *irrelevante*, sendo este geralmente derivado de GFP. Os controles “tampão apenas” e “vetor vazio” também são comumente utilizados.

Havendo a disponibilidade de anticorpos (ou *kits* para ensaios enzimáticos), a confirmação de *knockdown* da proteína torna-se imprescindível. Ensaios moleculares de RNA são úteis para demonstrar a redução do nível do transcrito alvo, *fortalecendo* assim a interpretação de que se trata de RNAi (clivagem) e não de efeito de miRNA ou RNA antissenso (inibição da tradução).

Contudo, a *comprovação* inequívoca de que *knockdown* foi produzido por meio do processo de RNAi exige análises adicionais, como a acumulação de siRNAs e a demonstração do sítio de clivagem. Esta comprovação molecular complementar é comum em pesquisas com plantas e enriquece muito o trabalho; entretanto, de maneira geral, ela não é exigida pela maioria das revistas, apenas em casos excepcionais. Uma compilação geral de todos os controles e técnicas moleculares está disponível na Tabela 2.

Tabela 2. Tipos gerais de controles, técnicas moleculares e suas funções.

controles / técnicas	tipo	status atual	função
controles negativos	irrelevante	essencial	demonstrar que o processo é dependente de sequência; evidenciar se há alterações inespecíficas desencadeadas pelo duplex de RNA
	<i>scrambled</i>	pouco usado	demonstrar que o processo é dependente de sequência; excluir efeitos adversos da % CG;
	invertido (= reverso)		evidenciar se há alterações inespecíficas desencadeadas pelo duplex de RNA
	mutado	abolido	demonstrar que o processo é dependente de 100% de complementaridade
	“vetor vazio”	comum‡	avaliar eventuais efeitos adversos do vetor
	“construção vazia”	comum‡	avaliar eventuais efeitos adversos da construção e do evento de integração no genoma
controles positivos	“tampão apenas”	comum‡	avaliar eventuais efeitos adversos do tampão
	marcado	útil‡	demonstrar que a estratégia de introdução dos siRNAs está adequada
	positivo para silenciamento	útil‡	idem ao “controle marcado” além de demonstrar que a via está ativa no sistema biológico avaliado
controle comparativo	RNA antissenso	fora de uso	demonstrar que a técnica de RNAi é mais eficiente que a técnica de “RNA antissenso”
controles de especificidade	dois ou três siRNAs contra o mesmo gene alvo	útil‡	evidenciar quais modificações fenotípicas resultam especificamente do <i>knockdown</i> do gene alvo e quais são devidas a efeitos de <i>off-targeting</i>
análise molecular de RNA	RT-PCR / <i>northern blot</i>	essencial*	confirmar o <i>knockdown</i> do RNA
	<i>microarray</i>	útil‡	evidenciar possíveis efeitos inespecíficos em nível global
	PARE	útil‡	determinar o sítio de clivagem do RNA alvo / confirmar que o processo foi mediado por RNAi
	5' RACE RML PCR	útil‡	determinar o sítio de clivagem do RNA alvo / confirmar que o processo foi mediado por RNAi
	<i>northern blot</i> para siRNAs	útil‡	confirmar o processamento de dsRNAs em siRNAs
análise molecular de proteínas	<i>western blot</i> / Elisa	essencial*	confirmar o <i>knockdown</i> da proteína
	análise bioquímica	útil‡	confirmar que o <i>knockdown</i> promove uma alteração sensível**

‡ mas não indispensável.

* conceitualmente ambos são essenciais. Contudo, é comum observar artigos que apresentam, por diversos motivos, apenas umas das técnicas.

** em muitos casos, o *knockdown* da proteína não implica necessariamente redução da atividade bioquímica correspondente.

Referências

- Boyle, J. P., Wu, X. J., Shoemaker, C. B. and Yoshino, T. P. 2003. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol* 128(2):205-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00078-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00078-1)
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L. and Iggo, R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34(3):263-4. PMID:12796781. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1173>
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L. and Voinnet, O. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320(5880):1185-90.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296(5567):550-3.
- Carmell, M. A., Zhang, L., Conklin, D. S., Hannon, G. J. and Rosenquist, T. A. 2003. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 10(2):91-2. PMID:12536207. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb896>
- Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. A., Yen, Y., Heidel, J. D. and Ribas, A. 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464(7291):1067-70. PMID:20305636 PMCID:2855406. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08956>
- Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R. 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336(6078):237-40.
- Doench, J. G., Petersen, C. P. and Sharp, P. A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17(4):438-42. PMID:12600936 PMCID:195999. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1064703>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494-8. PMID:11373684. <http://dx.doi.org/10.1038/35078107>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26(2):199-213. [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00023-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00023-3)
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M. and Izaurralde, E. 2009. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15(1):21-32. PMID:19029310 PMCID:2612776. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1399509>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-11. PMID:9486653. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
- Folkes, L., Moxon, S., Woolfenden, H. C., Stocks, M. B., Szitty, G., Dalmay, T. and Moulton, V. 2012. PAREsnip: a tool for rapid genome-wide discovery of small RNA/target interactions evidenced through degradome sequencing. *Nucleic Acids Res*. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks277>
- German, M. A., Luo, S., Schroth, G., Meyers, B. C. and Green, P. J. 2009. Construction of Parallel Analysis of RNA Ends (PARE) libraries for the study of cleaved miRNA targets and the RNA degradome. *Nat Protoc* 4(3):356-62. PMID:19247285. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.8>
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. and Kay, M. A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441(7092):537-41. PMID:16724069. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04791>
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., De Fougerolles, A., Endres, S. and Hartmann, G. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11(3):263-70 PMID:15723075. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1191>
- Khan, A. A., Betel, D., Miller, M. L., Sander, C., Leslie, C. S. and Marks, D. S. 2009. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 27(6):549-55. PMID:19465925 PMCID:2782465.

- Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., Albuquerque, R. J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Karikó, K., Ambati, B. K., Wilgus, T. A., DiPietro, L. A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J. R., Taylor, E. W. and Ambati, J. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452(7187):591-7. PMID:18368052 PMCID:2642938. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06765>
- Kishida, T., Asada, H., Gojo, S., Ohashi, S., Shin-Ya, M., Yasutomi, K., Terauchi, R., Takahashi, K. A., Kubo, T., Imanishi, J. and Mazda, O. 2004. Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA. *J Gene Med* 6(1):105-10. PMID:14716682. <http://dx.doi.org/10.1002/jgm.456>
- Koldehoff, M. and Elmaagacli, A. H. 2009. Therapeutic targeting of gene expression by siRNAs directed against BCR-ABL transcripts in a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Methods Mol Biol* 487:451-66. PMID:19301661. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-547-7_22
- Koldehoff, M., Steckel, N. K., Beelen, D. W. and Elmaagacli, A. H. 2007. Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Clin Exp Med* 7(2):47-55. PMID:17609876. <http://dx.doi.org/10.1007/s10238-007-0125-z>
- Leachman, S. A., Hickerson, R. P., Schwartz, M. E., Bullough, E. E., Hutcherson, S. L., Boucher, K. M., Hansen, C. D., Eliason, M. J., Srivatsa, G. S., Kornbrust, D. J., Smith, F. J., McLean, W. I., Milstone, L. M. and Kaspar, R. L. 2010. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. *Mol Ther* 18(2):442-6. PMID:19935778 PMCID:2839285. <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2009.273>
- Liu, J., Carmell, MA, Rivas, FV, Marsden, CG, Thomson, JM, Song, JJ, Hammond, SM, Joshua-Tor, L. and Hannon, GJ. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305(5689):1437-41. PMID:15284456. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1102513>
- Mathonnet, G, Fabian, MR, Svitkin, YV, Parsyan, A, Huck, L, Murata, T, Biffo, S, Merrick, WC, Darzynkiewicz, E, Pillai, RS, Filipowicz, W, Duchaine, TF, and Sonenberg, N. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317(5845):1764-7. PMID:17656684. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146067>
- McCaffrey, AP, Meuse, L, Pham, TT, Conklin, DS, Hannon, GJ, and Kay, MA. 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418(6893):38-9. PMID:12097900. <http://dx.doi.org/10.1038/418038a>
- Morris, KV, Chan, SW, Jacobsen, SE, and Looney, DJ. 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305(5688):1289-92. PMID:15297624. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1101372>
- Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P. and Sharp, P. A. 2002. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8(7):681-6. PMID:12042777.
- Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I. and Engelke, D. R. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20(5):505-8. PMID:11981566. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0502-505>
- Pereira, T. C., Pascoal, V. D., Marchesini, R. B., Maia, I. G., Magalhães, L. A., Zanotti-Magalhães, E. M. and Lopes-Cendes, I. 2008. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Exp Parasitol* 118(4):619-23. PMID:18237732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.017>
- Persengiev, S. P., Zhu, X. and Green, M. R. 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10(1):12-8. PMID:14681580 PMCID:1370513. <http://dx.doi.org/10.1261/rna5160904>
- Poeck, H., Besch, R., Maihoefer, C., Renn, M., Tormo, D., Morskaya, S. S., Kirschnek, S., Gaffal, E., Landsberg, J., Hellmuth, J., Schmidt, A., Anz, D., Bscheider, M., Schwerd, T., Berking, C., Bourquin, C., Kalinke, U., Kremmer, E., Kato, H., Akira, S., Meyers, R., Häcker, G., Neuenhahn, M., Busch, D., Ruland, J., Rothenfusser, S., Prinz, M., Hornung, V., Endres, S., Tüting, T. and Hartmann, G. 2008. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 14(11):1256-63. PMID:18978796. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1887>

- Rinaldi, G., Okatcha, T. I., Popratiloff, A., Ayuk, M. A., Suttiaprapa, S., Mann, V. H., Liang, Y. S., Lewis, F. A., Loukas, A. and Brindley, P. J. 2011. Genetic manipulation of *Schistosoma haematobium*, the neglected schistosome. *PLoS Negl Trop Dis* 5(10):e1348. PMID:22022628 PMCID:3191139. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001348>
- Savas, J. N., Toyama, B. H., Xu, T., Yates, J. R. 3rd. and Hetzer, M. W. 2012. Extremely long-lived nuclear pore proteins in the rat brain. *Science* 335(6071):942. PMID:22300851 PMCID:3296478. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1217421>
- Saxena, S., Jónsson, Z. O. and Dutta, A. 2003. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 278(45):44312-9. PMID:12952966. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M307089200>
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. and Joshua-Tor, L. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305(5689):1434-7. PMID:15284453. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1102514>
- Splinter, P. L., Masyuk, A. I. and LaRusso, N. F. 2003. Specific inhibition of AQP1 water channels in isolated rat intrahepatic bile duct units by small interfering RNAs. *J Biol Chem* 278(8):6268-74. PMID:12468529. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212079200>
- Tang, Y., Li, Y. B., Wang, B., Lin, R. Y., Van Dongen, M., Zurcher, D. M., Gu, X Y., Banaszak Holl, M. M., Liu, G. and Qi, R. 2012. Efficient in Vitro siRNA Delivery and Intramuscular Gene Silencing Using PEG-Modified PAMAM Dendrimers. *Mol Pharm* 9(6):1812-21. <http://dx.doi.org/10.1021/mp3001364>
- Wu, L., Fan, J. and Belasco, J. G. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(11):4034-9. PMID:16495412 PMCID:1449641. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510928103>
- Zheng, Y., Li, Y. F., Sunkar, R. and Zhang, W. 2012. SeqTar: an effective method for identifying microRNA guided cleavage sites from degradome of polyadenylated transcripts in plants. *Nucleic Acids Res* 40(4):e28. PMID:22140118 PMCID:3287166. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr1092>

Estratégias para Uso da RNAi em Células de Mamíferos *in vitro*

Capítulo

9

Dr. Stephano Spanó Mello¹, Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck¹ e Dra. Luciana Nogueira de Sousa Andrade¹

¹Depto. de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

O Mecanismo de RNAi: Novas Perspectivas para a Ciência

Com a descoberta dos mecanismos de RNA de interferência (RNAi) no verme nematoide *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), logo ficou claro que estes eram conservados, sendo também encontrados em plantas e insetos (inicialmente em drosófila). Surgiu imediatamente a questão sobre a ocorrência de mecanismos similares também em células de mamíferos e principalmente humanas. O interesse por essa possibilidade era muito grande por duas razões básicas: o silenciamento de genes expressos em células de mamíferos permitiria o estudo de funções gênicas e, eventualmente, o aparecimento de mais uma via de controle gênico, pelo próprio mecanismo de RNAi, representaria uma nova interface para que novos medicamentos fossem testados com metas terapêuticas. Apesar de existirem técnicas para inativação gênica por meio de recombinação homóloga em células de mamíferos, permitindo inclusive a obtenção de camundongos nocaute, do inglês *knock out*, (Capecchi 2005), estas são tecnicamente sofisticadas e de difícil realização, o que estimulou a busca de metodologias alternativas como a do silenciamento gênico por moléculas de RNA de dupla fita.

Os dados iniciais, reportados em vários congressos, foram muito decepcionantes. Basicamente, os resultados eram negativos, sugerindo que esses mecanismos não existiriam em células de mamíferos. Além disso, a introdução de moléculas grandes de RNA de dupla fita nessas células induz respostas imunológicas (descritas ao longo desse capítulo) que reduzem inespecificamente a expressão genética da célula como um todo. Só três anos após a publicação do trabalho com *C. elegans*, o grupo alemão liderado por *Thomas Tuschl* demonstrou que o silenciamento específico de genes era possível em células de mamíferos (Elbashir et al., 2001). Para isso, os pesquisadores

transfectaram duplexes de RNA com 21 e 22 pares de nucleotídeos (pb) em células humanas, promovendo a supressão específica dos genes alvos. Os dados também mostraram que duplexes maiores que 30 pb ativam o sistema imune, explicando os problemas relatados anteriormente, e demonstrando a viabilidade de se empregar moléculas de siRNA (*small interfering RNA*) exógenas como “promessa para análise de função gênica em cultura de células humanas e desenvolvimento de terapias gene-específicas” (Elbashir et al., 2001).

A partir dessa publicação, se seguiu uma verdadeira euforia de trabalhos que confirmaram que a maquinaria de RNAi em células de mamíferos é bastante eficiente e que seu uso em cultura celular, ou mesmo diretamente em animais (*in vivo*), tem um enorme potencial, seja em ciência básica como aplicada, sobretudo em processos potencialmente terapêuticos. Hoje em dia, o uso da tecnologia de RNAi em cultura celular para se estudar função gênica é comum, e, dificilmente, um bom artigo científico pode dispensar esse tipo de abordagem. Curiosamente, como a tecnologia resulta em uma redução grande, mas não total, da expressão do gene alvo, é comum a denominação de *knock down* (para distinguir de *knock out*) para estudos de silenciamento gênico por RNAi. Quanto ao seu uso diretamente em animais com finalidade terapêutica, o número de citações é simplesmente surpreendente. Apesar do curto tempo desde o trabalho do grupo de Tuschl, uma simples busca no site da PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) dos termos “*siRNA in vivo therapy*” gerou, em início de 2012, mais de 2300 referências, das quais quase 280 são revisões.

Obviamente a descoberta dos mecanismos de RNAi em células de mamíferos abriu enormes perspectivas, o que, em parte, justifica essa alta produção científica. No entanto, provavelmente, muito pouco teria sido possível sem o desenvolvimento das tecnologias de introdução de material genético nas células e *in vivo*. De fato, desde 1968 essas tecnologias têm sido aplicadas e, a partir da década de 80, ganharam grande interesse pelas possibilidades de aplicação em terapia gênica. Vários métodos de introdução de ácidos nucleicos nas células foram aperfeiçoados e, hoje, o emprego de RNAi constitui apenas uma nova forma de abordagem, que permite a intervenção específica na expressão de genes celulares. Vetores derivados de vírus (sendo os principais os retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados) utilizam a alta eficiência destes para levar o material genético de interesse até o núcleo celular (Menck e Ventura 2007). Por outro lado, processos não virais têm ganhado importância, possibilitando a introdução de material genético tanto em culturas celulares como *in vivo*. Esses processos em geral empregam carreadores lipídicos ou polímeros, ambos preferencialmente catiônicos, que formam complexos com as moléculas de ácidos nucleicos, facilitando a entrada destes no interior da célula.

No caso do uso dessas metodologias para silenciamento gênico por RNAi, duas abordagens bastante distintas são empregadas (Figura 1). Pode se desenvolver vetores plasmidiais (derivados ou não de vírus), que contêm sequências palindrômicas correspondentes às porções do gene alvo que, se expressas nas células, podem gerar moléculas de RNA de dupla fita em forma de um pequeno grampo, sendo denominadas shRNA (*short hairpin RNA*). Alternativamente, duplexes de RNA podem ser sintetizados quimicamente e, por métodos não virais, são introduzidos nas células. Essas moléculas são, portanto, exógenas às células e são chamadas de siRNA (*small interfering RNA*). Nos dois casos, os duplexes de RNA (shRNA e siRNA) são processados pela maquinaria de RNAi no interior da célula, promovendo o silenciamento do gene alvo. É importante lembrar que, em qualquer dessas situações, a molécula de RNA gerada não deve ter mais do que 30 pb, pelo risco de indução de respostas inespecíficas.

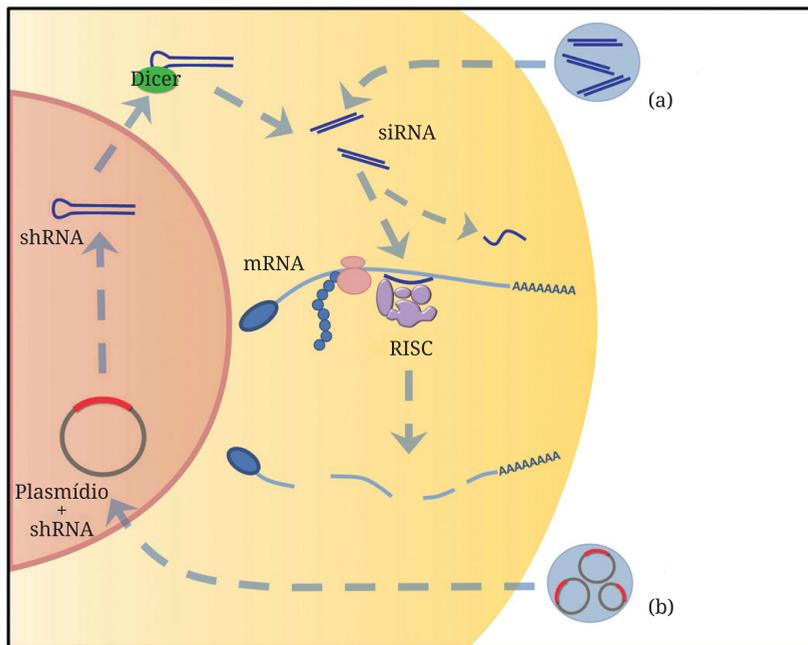


Figura 1. Principais estratégias de silenciamento gênico via RNAi em células *in vitro*. Em (A), duplexes de siRNA exógenos complexados a compostos catiônicos são internalizados e, a seguir, incorporados no complexo RISC, no qual promovem a degradação do RNAm alvo. Em (B), o transgene codificador da molécula de shRNA é inserido na célula por vetores plasmidiais derivados ou não de vírus. O transgene é transcrito no núcleo e o shRNA é então processado pela maquinaria celular de RNAi até originar um siRNA.

Neste capítulo, pretendemos abordar as principais estratégias para o uso dessas ferramentas em células de mamíferos em cultura. Discutiremos os principais sistemas que têm sido empregados para introdução de vetores genéticos (DNA cujo transcrito constitui um shRNA) ou duplexes de RNA nas culturas celulares, comparando as eficiências, ilustrando com possíveis aplicações experimentais. Vários desses sistemas já são comercializados, e várias companhias oferecem diversas sequências específicas (siRNA ou shRNA) para, em princípio, silenciar qualquer gene humano alvo (algumas também oferecem o mesmo para genes de camundongos), o que facilita bastante a realização desses experimentos. No entanto, chama a atenção o fato de que as sequências dos duplexes de RNA a serem empregados para a maior parte dos genes alvos ainda é apenas teórica (obtida a partir de algoritmos próprios), de modo que a validação destas é normalmente necessária. Em geral, as empresas garantem sucesso (silenciamento de pelo menos 70% da expressão do gene) para dois de cada três duplexes, mas nossa experiência tem demonstrado que isso não é tão simples assim e pode haver necessidade de teste para um número bem maior de sequências.

shRNA: Simulando os MicroRNAs Endógenos

O silenciamento gênico via RNAi pode ser induzido pela introdução de vetores plasmidiais, derivados ou não de vírus, que contêm um transgene de sequência palindrômica,

Cópia gratuita - venda proibida

cujo transcrito consiste numa molécula de RNA na forma de grampo (shRNA). A estrutura secundária dessa molécula apresenta uma região de dupla fita com 19 a 29 pb e uma pequena alça (*loop*) com 4 a 10 nucleotídeos (Figura 2), simulando um miRNA endógeno. Consequentemente, a introdução desses vetores na célula promove a transcrição desse shRNA, o qual é processado em um siRNA maduro pela maquinaria celular de RNAi, resultando no silenciamento do gene alvo.

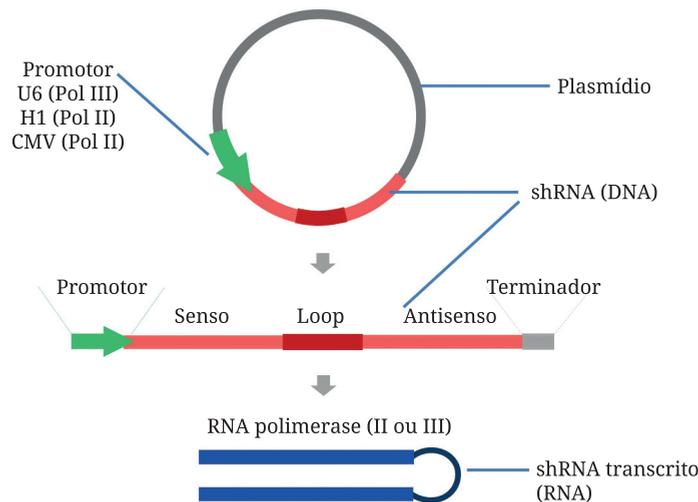


Figura 2. Construção de vetor de expressão e estrutura secundária da molécula de shRNA. O transgene codificador da molécula de shRNA é composto por uma sequência palindrômica (19 nt senso; 19 nt antissenso) intercalada por uma sequência responsável pela formação de uma alça (*loop* – 5 a 9 nt) na estrutura secundária do transcrito (forma de grampo). Esse transgene é então clonado em um plasmídeo sob o controle de promotores específicos da RNA polimerase II ou III, o qual é transfectado ou transduzido na célula alvo para induzir o silenciamento gênico específico. As moléculas de RNA estão representadas na cor azul, enquanto as moléculas de DNA estão representadas na cor vermelha.

Para a construção desses vetores, a sequência de DNA responsável que codifica o shRNA é geralmente clonada sob controle de promotores gênicos fortes para transcrição pela RNA polimerase III, como os promotores H1 humano ou U6 de camundongo (Brummelkamp et al., 2002; Sui et al., 2002). A RNA polimerase III está envolvida principalmente com a transcrição de pequenos RNAs, como os RNAs transportadores (tRNA) e os pequenos RNAs nucleares (*small nuclear RNAs* - snRNA). Os níveis de expressão dos genes transcritos por ela chegam a ser três ordens de magnitude maiores, comparados aos genes transcritos pela RNA polimerase II. A utilização da RNA polimerase II na transcrição de shRNAs acarreta alterações adicionais no transcrito como a poliadenilação, podendo modificar a estrutura secundária desejada e diminuindo assim o reconhecimento dessas sequências pela maquinaria de silenciamento (Paddison et al., 2002). Contudo os miRNAs endógenos são transcritos pela RNA polimerase II, formando uma sequência precursora grande com sinais típicos de um RNA mensageiro (RNAm), como a poliadenilação e o “*cap*” de 7-metilguanossina (Lee et al., 2004). Isso é possível devido à presença de sinais específicos nos genes de miRNA responsáveis pelo processamento adequado do RNAm, fazendo com que os miRNAs possam ser clivados até a forma madura.

Tal estratégia também pode ser utilizada para a expressão de shRNAs como parte de um transcrito mais complexo, em que o arcabouço de um miRNA é utilizado e a dupla fita original é substituída por uma sequência específica para o gene alvo que se deseja silenciar (Zhou et al., 2005; Xia et al., 2006).

Em contrapartida, construções utilizando promotores de RNA polimerase III são mais simples, normalmente proporcionando, como mencionado, altos níveis de expressão do shRNA e um silenciamento eficaz. A limitação dessa estratégia encontra-se no fato de os promotores para RNA polimerase III não apresentarem especificidade tecidual, além de apresentarem maior chance de induzir respostas não específicas como o silenciamento de genes não desejados, ativação de vias celulares da resposta imune inata e até mesmo toxicidade celular, devido aos seus altos níveis de expressão gênica (Bridge et al., 2003; Jackson et al., 2003). Em alguns casos, as construções utilizando promotores para a RNA polimerase II podem ser mais vantajosas, já que existem promotores que só são ativados em tecidos específicos. Além disso, o controle pela RNA polimerase II apresenta condições mais fisiológicas de expressão, visto que a grande maioria dos miRNAs são expressos pela RNA polimerase II. De fato, a clonagem de shRNAs sob o controle de promotores da RNA polimerase II tem sido utilizada com sucesso para a criação de animais transgênicos (Xia et al., 2006), enquanto construções controladas pela RNA polimerase III podem ser tóxicas, devido à competição com os miRNAs endógenos pela maquinaria de processamento, causando a morte da célula (Grimm et al., 2006).

A introdução de shRNA no meio intracelular pode ser feita pela transfecção de plasmídeos de DNA via eletroporação, por meio de carreadores químicos (cujas particularidades serão abordadas em maiores detalhes ao longo do capítulo) ou por meio de carreadores virais que serão discutidos adiante. Entre as desvantagens de sistemas não virais, está a condição transiente da expressão, já que eventos de integração espontânea são raros. Algumas estratégias foram desenvolvidas para aprimorar a utilização de sistemas não virais na geração de transfecções estáveis, como a utilização de elementos genéticos derivados do vírus Epstein Bar (EBV) e do elemento transponível “*sleeping beauty*” (SB). Os vetores de expressão baseados no vírus EBV geralmente utilizam o gene antígeno nuclear 1 de EBV (*nuclear antigen 1*, EBNA1) e a sequência oriP, que foram originalmente descritos como elementos de suporte à replicação do genoma do EBV. Essa estratégia baseia-se na capacidade da proteína EBNA1 de se associar a sequências oriP, recrutando fatores celulares para realizar a duplicação do DNA e mantendo os vetores nas células transfectadas como DNAs circulares extracromossômicos replicativos (Conese et al., 2004). Além disso, demonstrou-se que a proteína EBNA1 é capaz de facilitar o tráfego de plasmídeos contendo a sequência oriP para o núcleo, amplificando a entrega do vetor de expressão no núcleo (Fischer et al., 1997).

Apesar da manutenção episódica dos plasmídeos baseados em EBV, a integração cromossômica ainda é a melhor estratégia quando se deseja realizar uma transformação permanente, como no estabelecimento de camundongos transgênicos. Nesse caso, é possível utilizar vetores baseados em transposons de DNA. Essa estratégia foi inicialmente desenvolvida em animais invertebrados, visto que não havia um sistema similar para vertebrados. Apesar de ser possível utilizar um transposon exógeno em organismos vertebrados, resultados mais eficientes foram obtidos por meio da utilização de um transposon da família Tc1/*mariner*, encontrado “adormecido” no genoma de um peixe (Ivics et al., 1997). A partir desse elemento, Ivics e colegas (1997) construíram o transposon sintético conhecido como “*sleeping beauty*”, capaz de inserir no genoma de peixes, camundongos e humanos qualquer sequência

flanqueada por duas repetições invertidas de sequência específica. Os vetores baseados em EBV e no transposon SB têm sido utilizados com sucesso na expressão de shRNAs em células de mamíferos (Biard et al., 2005; Ren et al., 2006; Tamhane e Akkina 2008).

Por outro lado, a utilização de vetores baseados em transposons leva à integração aleatória dos shRNAs no genoma, ou seja, não é possível controlar o local em que a construção será inserida e nem mesmo quantas cópias da construção serão adicionadas ao genoma do hospedeiro. Essas características fazem com que as células transformadas obtidas no final do processo possuam diferentes eficiências de silenciamento, de acordo com o número de cópias integradas e com o nível transcricional da região em que a construção foi integrada. Essas variações impõem uma grande limitação em estudos comparativos, bem como ao estabelecimento de animais transgênicos. Uma maneira de contornar essas limitações é a utilização de estratégias de integração sítio-dirigidas, por meio da inserção da construção por eventos de recombinação homóloga. A utilização de *loci* permissivos e de alta expressão, como o gene HPRT (*human hypoxanthine phosphoribosiltransferase* – hipoxantina guanina fosforibosil transferase), também garante maior sucesso na expressão do shRNA, além de garantir que apenas uma cópia da construção seja inserida no genoma (Wang et al., 2007).

Independente da abordagem escolhida, métodos de seleção se fazem necessários e, nesse caso, genes de resistência a antibióticos são a primeira escolha para a seleção positiva das células transfectadas. Um dos antibióticos mais utilizados é a geneticina, um aminoglicosídeo similar à neomicina, capaz de bloquear a síntese proteica por meio da interferência nas funções ribossomais. Além disso, outras estratégias podem ser utilizadas para a detecção e seleção de células transformadas, como a utilização de um gene repórter, como GFP (*Green Fluorescent Protein* – proteína verde fluorescente) ou luciferase, enzima que utiliza a luciferina como substrato para produzir luz. Essas estratégias podem ser associadas à técnica de “*cell sorting*” ativado por fluorescência, que utiliza um citômetro de fluxo para separar as células que expressam o gene repórter.

Emprego de Sistemas Virais para Transdução de shRNA

A introdução de plasmídeos em células de mamíferos como descrito anteriormente apresenta como principal desvantagem a baixa eficiência de transfecção. Em geral, apesar de se empregar um número alto de moléculas de plasmídeos para cada célula [cerca de 1 μg de DNA ($\sim 10^{11}$ moléculas) por 10^5 - 10^6 células], apenas de 1% a 10% das células apresentam expressão dos genes desse plasmídeo, conforme demonstrado por experimentos com genes repórteres como GFP. Além disso, esses dados se referem a experimentos transientes, ou de apenas alguns dias após a transfecção. Se há necessidade de uma expressão permanente, em geral se recorre a sistemas que selecionam células cujo plasmídeo transfectado se integra no genoma celular.

Como a frequência desse evento é de apenas 1 em 10^6 células, há necessidade de seleção das células transfectadas por antibióticos ou expressão de genes repórteres. Essa baixa eficiência torna o emprego de plasmídeos para a expressão de shRNAs em células um processo difícil, longo e trabalhoso. Nesse sentido, vetores derivados de vírus aparecem como alternativas interessantes e possibilitam a introdução de cassetes de expressão de shRNA com níveis muito elevados de eficiência, alcançando, em alguns casos, praticamente 100% de uma população de células alvos. De fato, os vírus apresentam um sistema extremamente eficiente

de introdução de genes em células; resultado de milhões de anos de evolução. Assim, vetores derivados de vírus aproveitam-se desses processos, que já têm sido testados em experimentos de terapia gênica há algumas décadas, demonstrando não só alta eficiência, como também elevada capacidade de transdução gênica de vários tipos celulares, principalmente *in vitro*. Em geral, na construção desses vetores, os genomas virais sofrem deleção total ou parcial de genes virais indispensáveis para a proliferação do vírus, sendo substituídos pelo gene de interesse. Com isso, esses vetores são capazes de transferir seu material genético para células alvos, mas não conseguem replicar-se e continuar seu ciclo infeccioso. Para a produção das partículas virais, os genes deletados são expressos pela introdução de outros plasmídeos (complementação *in trans*) na célula empacotadora, mas não são transmitidos com os vetores. Estes vírus geneticamente modificados são também chamados *vírus recombinantes*, enquanto o processo de transferência gênica para o interior da célula é denominado de *transdução*, para distinguir do termo infecção, que envolve necessariamente partículas virais competentes para replicação. Vários tipos de vetores têm sido empregados com objetivos de expressão de shRNAs específicos para silenciamento de genes alvos, destacando-se os derivados dos adenovírus e retrovírus (Wang et al., 2008).

Os adenovírus são vírus não envelopados caracterizados por possuir um capsídeo proteico icosaédrico, com diâmetro aproximado de 70-100 nm e genoma de DNA de dupla fita linear com aproximadamente 35 kpb. Vetores derivados de adenovírus apresentam a capacidade de gerar um alto título viral e, como consequência, promover a transdução de praticamente toda uma população celular (~100% das células). Ainda, por serem relativamente promíscuos, podem infectar diferentes tipos celulares. Basicamente, vetores adenovirais de *primeira geração* são obtidos pela deleção da região E1 (genes E1A e E1B), que são importantes para os processos iniciais de replicação (Douglas 2007). Dessa forma, a produção e propagação dos vetores recombinantes de primeira geração são feitas rotineiramente em linhagens celulares que fornecem os produtos proteicos de E1 *in trans*, como é o caso das células HEK293 e PER-C6.

Adenovírus recombinantes de primeira geração comportam um fragmento de DNA exógeno de até 8 kpb de extensão, tamanho mais do que suficiente para acomodar os cassetes de expressão shRNA, usados em protocolos de silenciamento. Existem vetores com deleções maiores, que podem comportar fragmentos de DNA maiores e até apresentar algumas vantagens para procedimentos com animais, porém, em geral, a eficiência destes (conhecidos como de segunda e terceira geração) é inferior. Uma das características principais dos vetores adenovirais está no fato de que os genomas recombinantes persistem como epissomos (ou extracromossômicos) no núcleo das células transduzidas. Como esses epissomos não replicam e não integram no genoma da célula hospedeira, a expressão gênica mediada por esses vetores é apenas transiente, mas o período de expressão é normalmente suficiente para a supressão, pelo menos temporária, da expressão do RNAm do gene alvo, provocando a redução do produto proteico desse gene.

Os retrovírus são vírus esféricos envelopados por uma membrana lipídica (envelopado), com diâmetro variando em torno de 80-100 nm, cujo material genético é constituído por duas cópias idênticas de RNA de fita simples. Em seu ciclo de replicação, uma dessas cópias é replicada em DNA de dupla fita, pela enzima viral transcriptase reversa, e o genoma viral é integrado aleatoriamente no genoma da célula hospedeira, onde permanece e se mantém enquanto a célula hospedeira se multiplica. Essa característica de integração faz com que os sistemas de vetores recombinantes derivados de retrovírus sejam os preferidos

quando se deseja a obtenção de linhagens celulares com modificações mais permanentes. Os vetores retrovirais imitam a arquitetura básica dos vírus parentais, mas, como no caso dos vetores adenovirais, são deletados da maior parte dos genes virais, que são substituídos pelo transgene de interesse, mantendo as regiões terminais do genoma viral (LTR, *long terminal repeat* – repetições terminais longas), necessárias para a transcrição reversa, e o sinal de encapsidação (sequências Y). Os genes do retrovírus (sendo os principais: *gag* – codifica proteínas do nucleocapsídeo; *pol* – codifica a transcriptase reversa; e *env* – codifica as proteínas do envelope) normalmente são produzidos em plasmídeos ou na célula hospedeira. Assim, o vetor contendo o transgene é normalmente transfetado em células, nas quais os plasmídeos ou a linhagem celular para empacotamento fornecem as proteínas virais Gag e Pol necessárias à produção das partículas virais. Nessas células, o vetor de transgene produz o RNA contendo o transgene, que é empacotado formando os vírus recombinantes que são usados para transdução das células alvos (Baum et al., 2006).

Assim sendo, quando o objetivo é obter linhagens celulares que mantenham o gene alvo silenciado por shRNA de modo permanente, os vetores retrovirais constituem os sistemas preferidos. Em geral, esses vírus recombinantes alcançam expressão de 10% a 80% das células alvos transfetadas e processos de seleção (resistência a antibióticos, por exemplo) tornam possível a obtenção de uma população de células na qual a maior parte tem o gene alvo silenciado.

Vetores retrovirais derivados do gênero lentivírus (basicamente derivados do HIV, “*human immunodeficiency virus*”) também têm sido muito empregados recentemente. Basicamente vetores lentivirais apresentam melhor eficiência de transdução gênica e, sobretudo, permitem a transdução de células que não estão em processo de divisão celular, ao contrário de outros vetores retrovirais. O uso desses vetores em silenciamento gênico está tendo grande impacto na comunidade científica pelo fornecimento, por algumas empresas de biotecnologia, de bibliotecas que permitem a obtenção de lentivírus recombinantes para transdução de shRNA, tendo como alvos a maior parte dos genes humanos. Em geral, são desenhados de 4 a 6 shRNAs diferentes para cada gene, que é então inserido em um plasmídeo padrão que contém a estrutura base para produção do vírus recombinante (Abbas-Terki et al., 2002).

Silenciamento Gênico por Meio de siRNAs

Outra estratégia amplamente adotada para silenciamento gênico de modo específico consiste na introdução de pequenas moléculas sintéticas de RNA de dupla fita de sequência complementar ao gene de interesse nas células alvos. Esses duplexes de RNA, conhecidos como siRNAs exógenos, são geralmente constituídos por 19 a 27 pb e apresentam 2 nucleotídeos livres nas extremidades 3’ e um grupo fosfato na extremidade 5’. Resumidamente, uma vez no meio intracelular, os siRNAs de tamanho superior a 23 pb simulam os substratos da DICER, sendo então processados gerando moléculas com 19 a 22 pb de comprimento. A seguir, essas moléculas são incorporadas no complexo RISC, culminando na degradação RNA mensageiro alvo e consequente depleção da proteína correspondente. Em relação ao uso de duplexes menores (19 a 22 pb), eles são diretamente incorporados no complexo RISC, e o fenômeno de RNAi é então deflagrado. Entretanto, alguns estudos recentes indicam que a eficiência do silenciamento induzido por siRNAs exógenos na célula alvo é potencializada se são usados os duplexes maiores que 25 pb, quando a ação da enzima DICER é necessária

para a indução do silenciamento por essas moléculas (Gregory et al., 2005; Kim et al., 2005; Siolas et al., 2005).

Virtualmente, como já mencionado, siRNAs podem ser desenhados e sintetizados para qualquer gene humano. Algumas empresas de biotecnologia já dispõem até de bibliotecas de siRNA que englobam quase todo o genoma humano e, uma vez que a eficiência de *knockdown* induzido por esses duplexes varia, múltiplos siRNAs que alvejam o mesmo gene comumente são necessários para a obtenção do fenótipo celular desejado. É interessante mencionar que, além da possibilidade de se comprar esses siRNAs já prontos para uso, é possível também sintetizar essas moléculas no próprio laboratório. Nesse caso, longos duplexes de RNA, sintetizados a partir da transcrição dos genes alvos, são clivados *in vitro* pela DICER ou pela RNase III, gerando assim as moléculas de siRNA, as quais foram então designadas esiRNA-siRNA derivados de endoribonuclease (*endoribonuclease-prepared short interfering RNAs*) (Boutros e Ahringer 2008).

Na prática, o processo de RNAi mediado por siRNAs exógenos em células em cultura compreende várias etapas como a introdução dessas moléculas no interior das células, sua liberação no citoplasma, incorporação no complexo RISC e conseqüente degradação da fita do RNAm alvo. Desse modo, a eficiência do silenciamento induzida por siRNAs pode ser descrita como função direta (i) do uso de agentes de transfecção apropriados, (ii) de características intrínsecas da molécula de siRNA como estabilidade e especificidade, e (iii) das propriedades biológicas da proteína alvo, *i.e.*, do tempo de meia vida; variáveis essas mais bem discutidas a seguir.

Sistemas de Entrega de siRNA: o Carreador Químico Ideal

Todo o conhecimento gerado no passado com o advento da tecnologia do DNA recombinante, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de métodos que possibilitaram a introdução de transgenes em células de procariontes e eucariontes, foi extremamente útil e eficaz para o estabelecimento de protocolos de transfecção que permitem a introdução de siRNAs exógenos ou de plasmídeos para expressão de shRNA em diferentes tipos celulares *in vitro*. Assim como o DNA, os siRNAs são duplexes compostos por um esqueleto fosfodiéster de carga negativa e, conseqüentemente, a repulsão entre essas moléculas e a membrana plasmática das células (também negativamente carregada) dificulta a internalização dos siRNAs na forma nua, sendo esse impasse contornável com a utilização de compostos químicos de maneira análoga aos protocolos de transfecção de DNA plasmidial. É importante ressaltar, no entanto, que, apesar de esses protocolos serem muito similares, a transfecção de duplexes de siRNA, por serem moléculas relativamente pequenas, apresenta eficiências muito superiores àquelas obtidas para transfecção de plasmídeos. De um modo geral, pode se obter de 70% a 90% das células eficientemente transfectadas. Essa alta eficiência é necessária quando se pretende o silenciamento de genes em uma cultura celular, mesmo que o efeito, nesses casos, seja transiente.

Compostos catiônicos lipídicos e polímeros sintéticos ou naturais são os compostos químicos mais utilizados nos protocolos de transfecção de siRNA, tanto *in vitro* como *in vivo* (Yadava et al., 2007). Esses compostos formam, por meio de interações eletrostáticas, complexos/nanopartículas de superfície positivamente carregada com os siRNAs com diâmetro de cerca de 200 nm, que são internalizados pela célula (Bishop 1997; Oupicky et al., 2000;

Grayson et al., 2006). Como função adicional, esses complexos garantem também proteção aos siRNAs contra a degradação por nucleases, fator esse relevante para obtenção de níveis ótimos de silenciamento do gene desejado.

No caso dos compostos lipídicos, o uso de lipossomos, vesículas com interior aquoso delimitadas por uma bicamada lipídica, já é largamente explorado na área farmacológica por ser um sistema eficiente de entrega de drogas hidrofílicas no meio intracelular. De fato, a utilização desses carreadores para transfecção de siRNA foi praticamente imediata: lipossomos desenvolvidos especificamente para complexação com esses duplexes constituem nanopartículas compostas por diferentes componentes como lipídeos catiônicos e/ou fusogênicos, colesterol e polietilenoglicóis que desempenham importante papel na fusão desses complexos com a membrana plasmática das células e com a aquisição de propriedades farmacocinéticas adequadas, principalmente para administração *in vivo*. Quando esses complexos são formados exclusivamente por lipídeos catiônicos (ou lipossomos constituídos por lipídeos catiônicos), são designados lipoplexos que, na realidade, são os complexos formados, também via interação eletrostática, pela mistura de siRNA com a maioria dos agentes de transfecção comerciais como Lipofectamina 2000 e Transit-TKO (Pack et al., 2005; De Fougerolles et al., 2007). Tanto lipossomos como lipoplexos já são rotineiramente utilizados como sistema de entrega de siRNA *in vitro* e *in vivo*; entretanto, vale mencionar que alguns tipos celulares, principalmente células primárias de origem hematopoiética, são refratárias à transfecção com agentes lipídicos, de modo que a utilização de compostos de outra natureza química como polímeros ou ainda a transfecção por eletroporação representam alternativas eficientes que permitem a introdução de siRNAs exógenos nessas células.

Como já mencionado, siRNAs também podem interagir eletrostaticamente com polímeros catiônicos, formando nanopartículas estáveis. Com relação aos polímeros, PEI, polietilenoimina, composto sintético de estrutura linear ou ramificada, é um dos mais utilizados *in vitro* e *in vivo*, embora muitos grupos relatem a alta toxicidade desse composto. Nesses casos, outro polímero positivamente carregado como poli(L-lisina) (PLL) tem sido largamente empregado para transfecção de células sensíveis a PEI. Vale mencionar que muitos pesquisadores optam pelo uso de polímeros naturais, como quitosana, por apresentar baixa toxicidade e alta densidade de carga positiva em sua estrutura, facilitando assim a complexação com o siRNA exógeno (Zhang et al., 2007). Além disso, alguns grupos propõem o uso de peptídeos (CPP- *Cell Penetrating Peptides*) como a *penetratina* como carreadores de moléculas de siRNA. Esses peptídeos geralmente apresentam carga positiva e são capazes de atravessar a membrana plasmática e endossomal, garantindo assim uma entrega eficiente de ácidos nucleicos no meio intracelular (Juliano 2005; De Fougerolles et al., 2007; Gary et al., 2007; Juliano et al., 2008).

Independente da natureza química, esses complexos são facilmente obtidos em laboratório como resultado da mistura entre o composto de escolha e os siRNAs, sendo então adicionados ao meio de cultivo das células na presença ou ausência de soro fetal bovino, dependendo do tipo celular. Contudo, alguns parâmetros como a relação estequiométrica entre o siRNA e o composto, além do peso molecular e do caráter hidrofóbico/hidrofílico deste, juntamente com o pH e força iônica do meio de cultura, podem afetar a interação eletrostática e, conseqüentemente, a estabilidade do complexo, comprometendo, assim, a eficiência da transfecção (Cherng et al., 1999). Ainda, o efeito citotóxico da maioria desses compostos químicos de transfecção já é conhecido há tempos e, obviamente, podem inviabilizar seu emprego. De fato, essa toxicidade é dependente do tipo celular em questão e a realização

de testes de viabilidade celular em função de diferentes concentrações do composto de transfecção é uma necessidade para obtenção de experimentos bem sucedidos. Tendo em vista tais percalços, muitas empresas de biotecnologia comercializam uma variedade desses compostos químicos com condições de transfecção pré-estabelecidas por elas; entretanto, não raro, algumas modificações nesses protocolos ainda se fazem necessárias para a otimização do procedimento. Ainda, o uso de siRNAs conjugados a fluoróforos, como Cy3 e FAM, permitem avaliar quantitativamente a eficiência da transfecção do composto químico por meio de técnicas como microscopia de fluorescência e/ou citometria de fluxo, facilitando assim a otimização dessa etapa dos protocolos de RNAi (Figura 3).

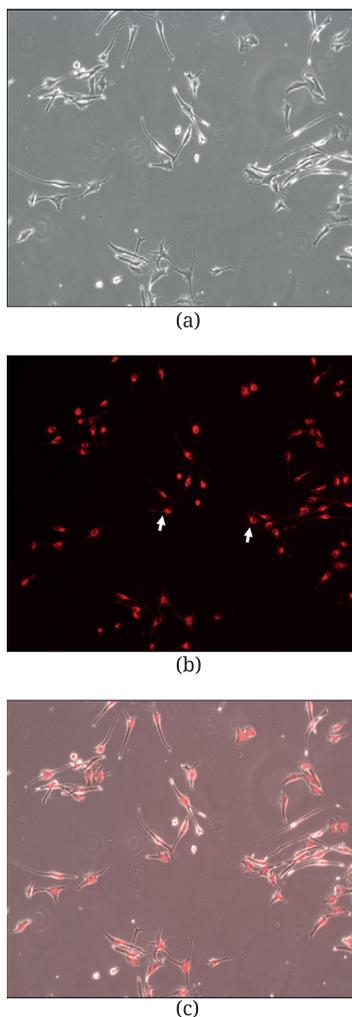


Figura 3. Células de melanoma humano transfectadas com siRNA conjugado ao fluoróforo Cy3 e complexado ao polímero catiônico polietilenoimina (PEI) de estrutura linear. No meio intracelular, os complexos apresentam distribuição perinuclear como indicado pelas setas. Aumento de 20X. (A) Visualização das células em campo claro. (B) Localização intracelular do siRNA fluorescente. (C) Sobreposição do campo claro e da fluorescência vermelha.

Liberação do siRNA no Citosol

Indubitavelmente, pelas razões antes citadas, o uso de carreadores biologicamente inertes (*i.e.*, que não exibem efeito citotóxico), eficientes em formar complexos estáveis com siRNAs e introduzir essas moléculas na maior parte da população celular, é essencial para obtenção de um silenciamento eficaz. Por outro lado, a liberação dos siRNAs dos complexos de transfecção no citoplasma, local de ação dessas moléculas, é igualmente crucial para que ele seja incorporado no complexo RISC e, conseqüentemente, induza o silenciamento desejado. Essa liberação é decorrente do mecanismo de entrada dos complexos de transfecção na célula. A internalização da maioria desses complexos ocorre via endocitose, mecanismo esse que compreende distintas vias de entrada, tais como: via clássica mediada por clatrina, via que envolve os domínios caveolares da membrana, vias independentes de clatrina e não caveolares, macropinocitose, fagocitose (quando as células transfectadas são fagócitos “profissionais”) ou pinocitose, o que depende, por sua vez, do tamanho e dos componentes estruturais (como a presença de um ligante específico) do complexo de transfecção (Juliano et al., 2008). Independente da via, uma vez no compartimento intracelular, os siRNAs encontram-se nos endossomos e a liberação deles das vesículas endossomais constitui a última etapa do processo de entrega dessas moléculas. Entretanto, o mecanismo exato dessa liberação ainda não foi totalmente elucidado e parece depender da natureza química do composto utilizado na transfecção. Com relação às nanopartículas formadas por polímeros, sabe-se que, uma vez nos endossomos, as enzimas e/ou o pH ácido podem degradar o polímero, desfazendo o complexo/nanopartícula. Entretanto, para evitar que a molécula de siRNA também seja degradada, polímeros diferenciados foram desenvolvidos, dentre os quais se destacam duas classes principais. Uma delas é representada por polímeros que apresentam em sua estrutura proteínas fusogênicas como melitina, capazes de romper a membrana endossomal. A segunda classe compreende os polímeros enriquecidos em grupos amina, classicamente exemplificados pelo PEI, que causam o inchaço e conseqüente ruptura da vesícula endossomal, devido ao que se chama de efeito esponja de prótons. Esse efeito é decorrente de um influxo de íons cloro para o interior do endossomo, levando a um aumento na pressão osmótica e à conseqüente ruptura da organela (Boussif et al., 1995; Gary et al., 2007). No caso dos compostos lipídicos, esse mecanismo de liberação ainda é obscuro; entretanto, acredita-se que alterações na fase estrutural dos lipídeos sejam responsáveis pela desestabilização da membrana endossomal com conseqüente liberação do siRNA (Zuhorn et al., 2007).

Transitoriedade do Silenciamento Induzido por siRNAs

Embora a transfecção de duplexes de siRNAs exógenos em células mantidas em cultura seja uma técnica relativamente simples e frequentemente eficaz em induzir o fenômeno de RNAi, o alto custo dos siRNAs sintéticos somado ao fenótipo transitório de *knockdown* representam importantes restrições ao seu emprego. De fato, a introdução de siRNAs exógenos intracelularmente resulta em depleção, geralmente parcial, nos níveis proteicos, que perdura por um período de 3 a 7 dias em células que se mantêm em contínua proliferação *in vitro*, sendo, por isso, designado efeito transiente. No caso de células primárias e de linhagens celulares quiescentes ou com tempo de duplicação longo (superior a 24 horas), esse fenômeno pode se estender por até 3 semanas, quando os siRNAs começam a ser naturalmente degradados (Clayton 2004; Bartlett e Davis 2006). Essa transitoriedade pode representar uma limitação

principalmente quando se pretende analisar a resposta biológica em função da proteína depletada por um período de tempo superior àqueles mencionados e, nesse caso, a indução estável de shRNA por vetores virais ou plasmidiais específicos aparece como alternativa metodológica. Contudo, independente do modo de indução de RNAi em células de mamíferos, eventos não relacionados ao silenciamento *per se*, conhecidos como efeitos inespecíficos, são frequentemente observados, o que compromete os resultados obtidos e serão abordados em maiores detalhes adiante.

Estratégias Alternativas de Otimização do Silenciamento

O aprimoramento do desenho de moléculas de interferência depende, em grande parte, do entendimento de como as estruturas secundárias dos RNAs são reconhecidas dentro das células e quais vias de sinalização podem ser ativadas. Pouco foi esclarecido até o momento sobre o reconhecimento de sequências e estruturas secundárias das moléculas precursoras de miRNAs.

Entretanto, na tentativa de estabelecer melhorias no desenho de shRNAs, alguns pesquisadores empregam o arcabouço de miRNAs, aproveitando as sequências precursoras naturais que se encontram antes e após a sequência de um miRNA maduro. A partir desses experimentos, os pesquisadores observaram que essa estratégia foi capaz de proporcionar um silenciamento mais eficiente (Shan et al., 2008), além de evitar a indução de efeitos inespecíficos em células transduzidas com construções lentivirais de shRNAs (Bauer et al., 2008).

A utilização do arcabouço de “clusters” naturais de miRNAs também pode ser uma estratégia interessante, sendo possível colocar sob o controle de um mesmo promotor vários shRNAs. Nesse caso, a coexpressão de vários shRNAs pode ser utilizada para causar o silenciamento de diferentes genes ou para alvejar um mesmo gene em diferentes regiões, aumentando a eficiência do silenciamento. Alguns autores já descreveram a utilização do arcabouço de “clusters” naturais de miRNAs, no desenvolvimento de sistemas contra o vírus HIV, demonstrando que a expressão de vários shRNAs em repetições (*tandem*), desenhados para alvejar diferentes sequências do vírus, aumenta muito a eficiência da via de silenciamento no controle a patógenos virais (Aagaard et al., 2008; Liu et al., 2008).

É interessante mencionar que algumas estratégias que visam aprimorar o silenciamento por RNAi foram desenvolvidas para induzir especificamente o silenciamento de microRNAs endógenos. A importância dos miRNAs no controle de processos biológicos vem crescendo de acordo com o avanço dos estudos funcionais. Além do desenvolvimento embrionário, os miRNAs estão envolvidos no controle dos mais diferentes processos e a desregulação desses já foi associada ao aparecimento de diversas doenças, como o câncer e cardiomiopatias; são, portanto, excelentes alvos para novas estratégias terapêuticas, sendo de extremo interesse o desenvolvimento de técnicas para se interromper a função de determinados miRNAs.

As primeiras estratégias para esse fim baseiam-se no desenho de oligonucleotídeos de fita simples complementares ao miRNA alvo, com modificações que confirmam estabilidade, sensibilidade e especificidade. Os “antagomirs” são uma classe de oligonucleotídeos quimicamente modificados, capazes de se associar a miRNAs por complementaridade, inibindo irreversivelmente a sua atividade (Krutzfeldt et al., 2005). A construção de oligonucleotídeos a partir de ácidos nucleicos com alterações do tipo “locked-nucleic-acid” (LNA) também se

demonstraram eficazes no silenciamento de miRNAs (Elmen et al., 2008), sendo capazes de silenciar com especificidade o miRNA desejado, sem causar toxicidade ou mudanças histopatológicas nos animais estudados. Como uma alternativa aos oligos modificados, é possível utilizar a técnica conhecida como “esponjas de miRNAs” (Ebert et al., 2007), um inibidor competitivo formado por um RNA que expressa várias cópias em repetições (*tandem*) complementares ao miRNA maduro que se deseja silenciar. Como vantagem, essa técnica oferece a possibilidade de serem expressos nas células a partir de uma construção sob o controle de um promotor forte (Figura 4).

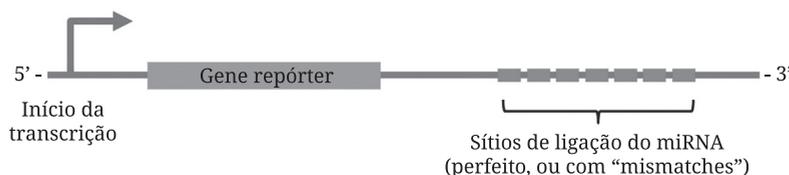


Figura 4. Construção de esponjas de microRNA. Múltiplos sítios de ligação a microRNAs são inseridos em repetições na região 3' não traduzida de um gene repórter que se encontra sob o controle de um promotor forte como CMV (citomegalovírus). Esse transcrito apresenta, então, múltiplos sítios de ligação aos quais um único microRNA ou até mesmo uma família de microRNAs se liga, impedindo-os de exercerem sua função no controle de expressão de genes alvos.

O Outro Lado do Silenciamento: Efeitos Inespecíficos

Os chamados efeitos inespecíficos, ou seja, aqueles que independem da sequência do siRNA utilizado, são decorrentes de diferentes fenômenos enumerados a seguir.

Um dos efeitos mais conhecidos refere-se à saturação da maquinaria celular de processamento de microRNAs, devido à administração de elevadas doses de duplexes de RNA. A ativação de resposta imune, devida a elevadas concentrações de siRNA, a introdução ou geração intracelular de moléculas de RNA de dupla fita de tamanho superior a 30 pb e/ou de sequência rica em GU induzem uma série de eventos celulares característicos da resposta imune a patógenos virais (Aagaard e Rossi 2007).

Em terceiro lugar vem o efeito biológico dos agentes de transfecção: a maioria dos compostos químicos utilizados no procedimento de transfecção de ácidos nucleicos exibe efeito tóxico nos mais diversos tipos celulares. A escolha de reagentes de natureza química sem atividade biológica no modelo celular de estudo além de ajustes na concentração desses compostos na tentativa de minimizar sua toxicidade sem comprometer sua eficiência como carreador representam alternativas eficazes para contornar tal limitação.

Em contrapartida, quando esses efeitos inespecíficos são dependentes da sequência do siRNA, são comumente designados de efeito “*off target*”. O reconhecimento pelo siRNA de moléculas de RNAm que apresentam complementariedade parcial com o RNAm alvo é responsável pelo silenciamento gênico não específico (Carthew e Sontheimer 2009). O desenho de moléculas de siRNA e shRNA com complementariedade exclusivamente ao RNAm alvo e a utilização de concentrações ótimas de siRNA mostram ser opções eficientes para abolir a eventual inespecificidade do mecanismo de RNAi induzido por siRNAs (Cullen 2006).

Outra proposta interessante é a introdução de modificações químicas na arquitetura dos duplexes de siRNAs exógenos que, além de conferir maior estabilidade sem comprometer a especificidade e a potência do silenciamento, minimiza a ocorrência de efeitos inespecíficos. De um modo geral, essas modificações compreendem alterações na ligação fosfato (substituição de um átomo de oxigênio localizado entre 2 ribonucleotídeos por um átomo de enxofre, por exemplo), no anel da ribose (exemplificada pela metilação na posição 2' da ribose), nas bases nitrogenadas, nas extremidades 3' compostas por nucleotídeos livres (como a inclusão de dinucleotídeos 2'-O-metil na extremidade 3' da fita antissenso de siRNA) e também o uso de nucleotídeos de ácido nucleico fechado (*locked nucleic acid*, LNA, moléculas análogas de RNA que apresentam uma ligação metil entre os carbonos 2' e 4' do anel de ribose) (Watts et al., 2008). Essas modificações químicas (as mais utilizadas estão ilustradas na Figura 5) contribuem também para a estabilidade do duplex seja no soro, para ensaios *in vivo*, seja no interior da célula, aprimorando a eficiência do silenciamento do gene alvo.

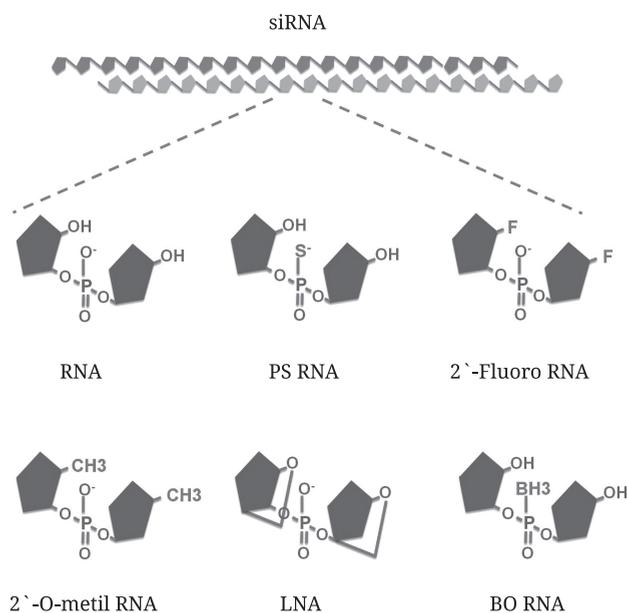


Figura 5. Modificações químicas nas moléculas de siRNA exógenas. A substituição do átomo de oxigênio do grupamento fosfato por enxofre (PSRNA) ou BH3 (BO RNA), do grupo hidroxila da ribose por átomos como fluor (2'-Fluoro RNA) ou pelo grupo metil na extremidade 3' do duplex (2'-O-metil RNA), além do uso de moléculas análogas ao RNA como LNA (*locked nucleic acid* - caracterizado por apresentar ligação entre os carbonos 2 e 4 de duas riboses adjacentes) constituem estratégias eficazes em aumentar a estabilidade da molécula de siRNA e eficiência de silenciamento.

Conclusões e Perspectivas

O uso dos mecanismos de RNAi para desvendar funções gênicas ou desenvolver possíveis aplicações é bastante recente, mas tem evoluído rapidamente sobretudo pelo

conhecimento gerado a partir dos estudos sobre a introdução de material genético em células humanas que já são desenvolvidos há algumas décadas. As estratégias empregadas e o potencial dessa tecnologia ainda devem ser bastante ampliados à medida que novas aplicações são desvendadas. Uma dessas aplicações tem sido o emprego de RNAi em escala genômica. De fato, a aplicação relativamente fácil de RNAi para análise funcional em células animais tornou possível o seu uso em larga escala (“*high-throughput*”), possibilitando a análise de centenas de genes ao mesmo tempo (Boutros e Ahringer 2008). A possibilidade de se obter conjuntos de moléculas de siRNA, retro- ou lentivírus que expressam shRNA (disponíveis em várias empresas comerciais) que têm como alvos vários genes, permite a realização de experimentos de triagem extremamente poderosos, que podem ajudar a elucidar rapidamente vias metabólicas, ou revelar marcadores para prognóstico ou mesmo genes alvos com potencial terapêutico.

Por outro lado, os mecanismos de RNAi, em si, ainda são pouco conhecidos, o que limita a sua aplicabilidade. Como exemplo, podemos citar dados recentes de que a ação de moléculas de siRNA direcionadas para promotores gênicos pode, em determinadas condições, ativar o gene alvo, e não apenas silenciá-lo (Li et al., 2006). Adicionalmente, pouco se sabe sobre o impacto das estruturas secundárias das moléculas de RNA no mecanismo de silenciamento. Esses dados sugerem que os mecanismos de RNAi podem atuar nas células de uma maneira muito mais ampla do que conhecemos hoje. Portanto, as estratégias de emprego de RNAi *in vitro* relatadas neste capítulo exploram apenas parte do potencial desses mecanismos e novas descobertas e alternativas devem ampliar estas promissoras tecnologias.

Referências

- Aagaard, L. and Rossi, J. J. 2007. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 59(2-3):75-86. PMID:17449137 PMCID:PMC1978219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.005>
- Aagaard, L. A., Zhang, J., von Eije, K. J., Li, H., Saetrom, P., Amarzguioui, M. and Rossi, J. J. 2008. Engineering and optimization of the miR-106b cluster for ectopic expression of multiplexed anti-HIV RNAs. *Gene Ther* 15(23):1536-1549. PMID:18800151 PMCID:PMC3155610. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.147>
- Abbas-Terki, T., Blanco-Bose, W., Deglon, N., Pralong, W. and Aebischer, P. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13(18):2197-201. PMID:12542850. <http://dx.doi.org/10.1089/104303402320987888>
- Bartlett, D. W. and Davis, M. E. 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34(1):322-33. PMID:16410612 PMCID:PMC1331994. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj439>
- Bauer, M., Kinkl, N., Meixner, A., Kremmer, E., Riemenschneider, M., Forstl, H., Gasser, T. and Ueffing, M. 2008. Prevention of interferon-stimulated gene expression using microRNA-designed hairpins. *Gene Ther* 16(1):142-147. PMID:18701917. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2008.123>
- Baum, C., Schambach, A., Bohne, J. and Galla, M. 2006. Retrovirus vectors: toward the plentivirus? *Mol Ther* 13(6):1050-63. PMID:16632409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.007>
- Biard, D. S. F., Despras, E., Sarasin, A. and Angulo, J. F. 2005. Development of New EBV-Based Vectors for Stable Expression of Small Interfering RNA to Mimick Human Syndromes: Application to NER Gene Silencing. *Mol Cancer Res* 3(9):519-529. PMID:16179499. <http://dx.doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0044>
- Bishop, N. E. 1997. An Update on Non-clathrin-coated Endocytosis. *Rev Med Virol* 7(4):199-209. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1654\(199712\)7:4<199::AID-RMV203>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1654(199712)7:4<199::AID-RMV203>3.0.CO;2-F)

Cópia gratuita - venda proibida

- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J. P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(16):7297-301. PMID:7638184 PMCID:PMC41326. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>
- Boutros, M. and Ahringer, J. 2008. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet* 9(7):554-66. PMID:18521077. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2364>
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.-L. and Iggo, R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34(3):263. PMID:12796781. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1173>
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. 2002. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296(5567):550-553. PMID:11910072. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068999>
- Capecchi, M. R. 2005. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6(6):507-12. PMID:15931173. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1619>
- Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136(4):642-55. PMID:19239886 PMCID:PMC2675692. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Cherng, J. Y., Wetering, P. V. D., Talsma, H., Crommelin, D. J. and Hennink, W. E. 1999. Stabilization of polymer-based gene delivery systems. *Int J Pharm* 183(1):25-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00037-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00037-X)
- Clayton, J. 2004. RNA interference: the silent treatment. *Nature* 431(7008):599-605. PMID:15457267. <http://dx.doi.org/10.1038/431599a>
- Conese, M., Auriche, C. and Ascenzioni, F. 2004. Gene Therapy Progress and Prospects: Episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther* 11(24):1735-1741. PMID:15385951. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302362>
- Cullen, B. R. 2006. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat Methods* 3(9):677-81. PMID:16929311. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth913>
- De Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J. and Lieberman, J. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6(6):443-453. PMID:17541417. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2310>
- Douglas, J. T. 2007. Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* 36(1):71-80. PMID:17827541. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-007-0021-5>
- Ebert, M. S., Neilson, J. R. and Sharp, P. A. 2007. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Meth* 4(9):721-726. PMID:17694064. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1079>
- @#@#PEN#@#Echeverri, C. J. and Perrimon, N. 2006. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet* 7(5):373-84. PMID:16607398. [@#@#PEN#@#](http://dx.doi.org/10.1038/nrg1836)
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494-498. PMID:11373684. <http://dx.doi.org/10.1038/35078107>
- Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H. F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E. M. and Kauppinen, S. 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452(7189):896-899. PMID:18368051. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06783>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-811. PMID:9486653. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
- Fischer, N., Kremmer, E., Lautscham, G., Mueller-Lantzsch, N. and Grasser, F. A. 1997. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Forms a Complex with the Nuclear Transporter Karyopherin alpha 2. *J Biol Chem* 272(7):3999-4005. PMID:9020106. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.7.3999>

- Gary, D. J., Puri, N. and Won, Y. Y. 2007. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release* 121(1-2):64-73. PMID:17588702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.021>
- Grayson, A. C., Doody, A. M. and Putnam, D. 2006. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm Res* 23(8):1868-76. PMID:16845585. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-006-9009-2>
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. and Shiekhattar, R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123(4):631-40. PMID:16271387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. and Kay, M. A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441(7092):537-541. PMID:16724069. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04791>
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. and Izsvák, Z. 1997. Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells. *Cell* 91(4):501-510. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. and Linsley, P. S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotech* 21(6):635. PMID:12754523. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt831>
- Juliano, R., Alam, M. R., Dixit, V. and Kang, H. 2008. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 36(12):4158-71. PMID:18558618 PMID:PMC2475625. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn342>
- Juliano, R. L. 2005. Peptide-oligonucleotide conjugates for the delivery of antisense and siRNA. *Curr Opin Mol Ther* 7(2):132-6. PMID:15844620.
- Kim, D.-H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M.-S., Choi, S. and Rossi, J. J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotech* 23(2):222. PMID:15619617. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1051>
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M. and Stoffel, M. 2005. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438(7068):685-689. PMID:16258535. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04303>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. and Kim, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23(20):4051-60. PMID:15372072 PMID:PMC524334. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Li, L.-C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R. F., Urakami, S., Enokida, H. and Dahiya, R. 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(46):17337-17342. PMID:17085592 PMID:PMC1859931. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0607015103>
- Liu, Y. P., Haasnoot, J., Ter Brake, O., Berkhout, B. and Konstantinova, P. 2008. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucl. Acids Res.* 36(9):2811-2824. PMID:18346971 PMID:PMC2396423. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn109>
- @@#PEN@@Martin, S. E. and Caplen, N. J. 2007. Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 81-108. PMID:17477824. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genom.8.080706.092424@@#PEN@@>
- Menck, C. F. M. and Ventura, A. M. 2007. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da Terapia Gênica. Dossiê Pensando o Futuro: Ciências Biológicas. *Rev USP* 75:50-61.
- Oupicky, D., Konak, C., Ulbrich, K., Wolfert, M. A. and Seymour, L. W. 2000. DNA delivery systems based on complexes of DNA with synthetic polycations and their copolymers. *J Control Release* 65(1-2):149-71. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00249-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00249-7)
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. and Stayton, P. S. 2005. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* 4(7):581-93. PMID:16052241. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1775>

- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. and Conklin, D. S. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16(8):948-958. PMID:11959843 PMCID:PMC152352. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.981002>
- Ren, C., Zhao, M., Yang, X., Li, D., Jiang, X., Wang, L., Shan, W., Yang, H., Zhou, L., Zhou, W. and Zhang, H. 2006. Establishment and Applications of Epstein-Barr Virus-Based Episomal Vectors in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 24(5):1338-1347. PMID:16410388. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0338>
- Shan, Z., Lin, Q., Deng, C., Li, X., Huang, W., Tan, H., Fu, Y., Yang, M. and Yu, X. Y. 2008. An efficient method to enhance gene silencing by using precursor microRNA designed small hairpin RNAs. *Mol Biol Rep* 36(6):1483-9. PMID:18758992. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-008-9339-8>
- Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P. S., Paddison, P. J., Hannon, G. J. and Cleary, M. A. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23(2):227-31. PMID:15619616. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1052>
- Sui, G., Soohoo, C., Affar E. B., Gay, F. D. R., Shi, Y., Forrester, W. C. and Shi, Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(8):5515-5520. PMID:11960009 PMCID:PMC122801. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082117599>
- Tamhane, M. and Akkina, R. 2008. Stable gene transfer of CCR5 and CXCR4 siRNAs by sleeping beauty transposon system to confer HIV-1 resistance. *AIDS Res Ther* 5(1):16. PMID:18667075 PMCID:PMC2533343. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-6405-5-16>
- Wang, J., Theunissen, T. W. and Orkin, S. H. 2007. Site-directed, virus-free, and inducible RNAi in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(52):20850-20855. PMID:18093939 PMCID:PMC2409230. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710565105>
- Wang, Q. Z., Lv, Y. H., Diao, Y. and Xu, R. 2008. The design of vectors for RNAi delivery system. *Curr Pharm Des* 14(13):1327-40. PMID:18537656. <http://dx.doi.org/10.2174/138161208799316357>
- Watts, J. K., Deleavey, G. F. and Damha, M. J. 2008. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today* 13(19-20):842-55. PMID:18614389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2008.05.007>
- Xia, X.-G., Zhou, H., Samper, E., Melov, S. and Xu, Z. 2006. Pol II-Expressed shRNA Knocks Down Sod2 Gene Expression and Causes Phenotypes of the Gene Knockout in Mice. *PLoS Genetics* 2(1):e10. PMID:16450009 PMCID:PMC1358942. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0020010>
- Yadava, P., Roura, D. and Hughes, J. A. 2007. Evaluation of two cationic delivery systems for siRNA. *Oligonucleotides* 17(2):213-22. PMID:17638525. <http://dx.doi.org/10.1089/oli.2006.0062>
- Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B. and Ma, B. 2007. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release* 123(1):1-10. PMID:17716771. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.07.016>
- Zhou, H., Xia, X. G. and Xu, Z. 2005. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucl. Acids Res.* 33(6):e62-. PMID:15805121 PMCID:PMC1074311. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gni061>
- Zuhorn, I. S., Engberts, J. B. and Hoekstra, D. 2007. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur Biophys J* 36(4-5):349-62. PMID:17019592. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-006-0092-411>

Métodos de Entrega de Duplexes de RNA *in vivo*

Capítulo 10

Prof. Dr. Tiago Campos Pereira¹

¹Depto. de Biologia, FFCLRP, USP

Introdução

Neste capítulo apresentaremos uma breve compilação de alguns dos mais comuns métodos de entrega de duplexes de RNA *in vivo*. É importante ressaltar que existe uma miríade de outras possibilidades; aquelas aqui apresentadas servem apenas para ilustrar a diversidade. A princípio, qualquer um das inúmeras abordagens desenvolvidas para introdução de DNA pode ser adaptada para administração de duplexes de RNAs.

Consideramos como *estratégia* a combinação de um *tipo específico de molécula* desencadeadora (siRNA, dsRNA, etc.) com um *método específico de entrega* (injeção, alimentação, eletroporação, etc.). De uma maneira geral, o primeiro elemento (molécula) está diretamente relacionado com o *tempo de duração do silenciamento*, ao passo que o segundo, com o *local atingido* (sistêmico, local ou célula-específico).

Os métodos aqui apresentados (Tabela 1) podem ser adaptados para seu modelo de estudo; uma forma utilizada em plantas pode ser modificada para seu uso em animais e vice-versa. Algumas referências são antigas, por serem os artigos seminais sobre aquela abordagem, portanto o pesquisador deve analisar a literatura científica à procura de métodos mais próximos ao seu modelo específico de pesquisa e atualizações/modificações nos procedimentos. Por fim, é comum que alguns métodos envolvam uma combinação de procedimentos, por exemplo, injeção seguida de eletroporação.

Cópia gratuita - venda proibida

Tabela 1. Compilação de alguns dos principais métodos para administrar duplexes de RNA *in vivo*.

Método	Organismos testados	Órgãos atingidos	Referências
imersão (<i>soaking</i>)	diversos animais de tamanho reduzido (planária, parasitas)	geralmente sistêmico	Yang et al. (2012)
alimentação (<i>feeding</i>)/oral	<i>C. elegans</i> , camundongo, entre outros	sistêmico em organismos com RNAi transitivo (<i>C. elegans</i>). Epitélio do sistema digestório em camundongos.	Timmons e Fire (1998), Xiang et al. (2006) e Aouadi et al. (2009)
injeção local	<i>C. elegans</i> , camundongo, rato, entre outros	geralmente local, mas pode ser sistêmico em organismos com RNAi transitivo	Salva et al. (2012)
transfecção hidrodinâmica	camundongo, rato	principalmente fígado, rins; coração e pulmão são atingidos em menor proporção	McCaffrey et al. (2002)
eletroporação	diversos, inclusive <i>in ovo</i>	geralmente local, mas pode ser sistêmico dependendo do tamanho do organismo	Pekarik et al. (2003)
biolística	diversos	local	Yuen et al. (2008)
transplante de células/tecidos	camundongo, rato	célula/tecido silenciado e transplantado	Brummelkamp et al. (2002)
cirurgia estereotáxica	camundongo, rato	regiões específicas do cérebro	Lasek e Azouaou (2010)
injeção intraocular	humanos	olhos	Kleinman et al. (2008)
gel	camundongo	local, vagina	Palliser et al. (2006)
<i>spray</i>	camundongo	pulmão, cérebro	Bitko et al. (2005) e Perez (2012)
nanopartículas	camundongo	local	Lee et al. (2012)
vírus	diversos	diversos	Raoul et al. (2005) e Lee et al. (2011)
transgene	diversos	dependente do promotor	Dickins et al. (2007)
inoculação mecânica	plantas	local	Tenllado et al. (2003)
agroinfiltração	plantas	local	Bertazzon et al. (2012)
peptídeos carreadores	camundongos	tipos celulares específicos <i>in vivo</i> (neurônios, células T)	Kumar et al. (2007, 2008)
absorção a partir do meio	células de drosófila	-	Clemens et al. (2000)
microarray de siRNAs*	células em placa	-	Mousses et al. (2003)

* Método utilizado apenas para estudos *in vitro*.

Bibliografia

- Aouadi, M., Tesz, G. J., Nicoloso, S. M., Wang, M., Chouinard, M., Soto, E., Ostroff, G. R. and Czech, M. P. 2009. Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation. *Nature* 458(7242):1180-4. PMID:19407801 PMCID:2879154. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07774>
- Bertazzon, N., Raiola, A., Castiglioni, C., Gardiman, M., Angelini, E., Borgo, M. and Ferrari, S. 2012. Transient silencing of the grapevine gene VvPGIP1 by agroinfiltration with a construct for RNA interference. *Plant Cell Rep* 31(1):133-43. PMID:21932028. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-011-1147-2>
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. and Barik, S. 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11(1):50-5. PMID:15619632. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1164>
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. 2002. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2(3):243-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00122-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00122-8)
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A. and Dixon, J. E. 2000. Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12):6499-503. PMID:10823906 PMCID:18635. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.110149597>
- Dickins, R. A., McJunkin, K., Hernando, E., Premrsirut, P. K., Krizhanovsky, V., Burgess, D. J., Kim, S. Y., Cordon-Cardo, C., Zender, L., Hannon, G. J. and Lowe, S. W. 2007. Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet* 39(7):914-21. PMID:17572676. <http://dx.doi.org/10.1038/ng2045>
- Kleinman, M. E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J. Z., Albuquerque, R. J., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Karikó, K., Ambati, B. K., Wilgus, T. A., DiPietro, L. A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J. R., Taylor, E. W. and Ambati, J. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452(7187):591-7. PMID:18368052 PMCID:2642938. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06765>
- Kumar, P., Ban, H. S., Kim, S. S., Wu, H., Pearson, T., Greiner, D. L., Laouar, A., Yao, J., Haridas, V., Habiro, K., Yang, Y. G., Jeong, J. H., Lee, K. Y., Kim, Y. H., Kim, S. W., Peipp, M., Fey, G. H., Manjunath, N., Shultz, L. D., Lee, S. K. and Shankar, P. 2008. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell* 134(4):577-86. PMID:18691745 PMCID:2943428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.034>
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J. L., Jung, K. E., Kim, M. H., Davidson, B. L., Lee, S. K., Shankar, P. and Manjunath, N. 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448(7149):39-43. PMID:17572664. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05901>
- Lasek, A. W. and Azouaou, N. 2010. Virus-delivered RNA interference in mouse brain to study addiction-related behaviors. *Methods Mol Biol* 602:283-98. PMID:20012405. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-058-8_17
- Lee, C. C., Huang, H. Y. and Chiang, B. L. 2011. Lentiviral-mediated interleukin-4 and interleukin-13 RNA interference decrease airway inflammation and hyperresponsiveness. *Hum Gene Ther* 22(5):577-86. PMID:21375458. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2009.105>
- Lee, H., Lytton-Jean, A. K., Chen, Y., Love, K. T., Park, A. I., Karagiannis, E. D., Sehgal, A., Querbes, W., Zurenko, C. S., Jayaraman, M., Peng, C. G., Charisse, K., Borodovsky, A., Manoharan, M., Donahoe, J. S., Truelove, J., Nahrendorf, M., Langer, R. and Anderson, D. G. 2012. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nat Nanotechnol* 7(6):389-93. PMID:22659608. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2012.73>
- McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T., Conklin, D. S., Hannon, G. J. and Kay, M. A. 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418(6893):38-9. PMID:12097900. <http://dx.doi.org/10.1038/418038a>

- Mousses, S., Caplen, N. J., Cornelison, R., Weaver, D., Basik, M., Hautaniemi, S., Elkahloun, A. G., Lotufo, R. A., Choudary, A., Dougherty, E. R., Suh, E. and Kallioniemi, O. 2003. RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells. *Genome Res* 13(10):2341-7. PMID:14525932 PMCID:403721. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1478703>
- Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q. Y., Lee, S. J., Bronson, R. T., Knipe, D. M. and Lieberman, J. 2006. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439(7072):89-94. PMID:16306938. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04263>
- Pekarik, V., Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P., Preiswerk, S. and Stoeckli, E. T. 2003. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nat Biotechnol* 21(1):93-6. PMID:12496763. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt770>
- Perez, A. P., Mundiña-Weilenmann, C., Romero, E. L. and Morilla, M. J. 2012. Increased brain radioactivity by intranasal P-labeled siRNA dendriplexes within in situ-forming mucoadhesive gels. *Int J Nanomedicine* 7:1373-85. PMID:22457595 PMCID:3310412.
- Raoul, C., Abbas-Terki, T., Bensadoun, J. C., Guillot, S., Haase, G., Szulc, J., Henderson, C. E. and Aebischer, P. 2005. Lentiviral-mediated silencing of SOD1 through RNA interference retards disease onset and progression in a mouse model of ALS. *Nat Med* 11(4):423-8. PMID:15768028. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1207>
- Salva, E., Kabasakal, L., Eren, F., Ozkan, N., Cakalağaoğlu, F. and Akbuğa, J. 2012. Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo. *Nucleic Acid Ther* 22(1):40-8. PMID:22217324.
- Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M. and Díaz-Ruíz, J. R. 2003. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnol* 3:3. PMID:12659646 PMCID:153545. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-3-3>
- Timmons, L. and Fire, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395(6705):854. PMID:9804418. <http://dx.doi.org/10.1038/27579>
- Xiang, S., Fruehauf, J. and Li, C. J. 2006. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nat Biotechnol* 24(6):697-702. PMID:16699500. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1211>
- Yang, Y., Jin, Y., Liu, P., Shi, Y., Cao, Y., Liu, J., Shi, Y., Li, H. and Lin, J. 2012. RNAi silencing of type V collagen in *Schistosoma japonicum* affects parasite morphology, spawning, and hatching. *Parasitol Res* 111(3):1251-7. PMID:22638918. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2959-x>
- Yuen, J. L., Read, S. A., Brubacher, J. L., Singh, A. D. and Whyard, S. 2008. Biolistics for high-throughput transformation and RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* 2(5):247-54.

Cuidados Especiais Associados ao Uso da RNAi

Capítulo
11

Prof. Dr. Rogério Margis¹

¹*Depto. de Biofísica e Centro de Biotecnologia, UFRGS*

As Origens do Processo de RNAi

Análises de transcriptômica têm demonstrado que a maior parte do genoma dos eucariotos é transcrita (Numata et al., 2007; Zhu e Buell, 2007; Prieto et al., 2008; Pariset et al., 2009). Entretanto, o processo de transcrição não fica restrito aos RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam proteínas, mas contemplam também uma série de outros RNAs que vão além dos RNAs ribossomais (rRNAs) e transportadores (tRNAs) (Shabalina e Koonin, 2008). Entre as várias formas de pequenos RNAs já descritos, cabe uma comparação e ponderação em relação aos microRNAs (miRNAs) e aos pequenos RNAs interferentes (siRNAs).

Os miRNAs formam uma classe de RNAs que variam de 19 a 24 nucleotídeos de comprimento e estão envolvidos, na grande maioria dos organismos eucariontes, na regulação da expressão gênica (Winter et al., 2009). Os miRNAs, em conjunto com os fatores de transcrição, são elementos centrais no processo de regulação gênica em animais e vegetais. Geralmente os miRNAs atuam no nível pós-transcricional de forma a reduzir a expressão gênica, seja por degradação do mRNA alvo ou pelo bloqueio da maquinaria de tradução (Davis e Hata, 2009). Contudo, a regulação transcricional também é exercida (Khraiwesh et al., 2010). Diferentemente, os siRNAs estão envolvidos em processos de defesa do organismo contra infecções virais e na regulação de elementos transponíveis (transposons) (Obbard et al., 2009).

Os miRNAs são transcritos como pri-miRNAs, a partir de *loci* gênicos específicos, enquanto os siRNAs são geralmente produzidos pela degradação de RNAs de dupla fita exógenos (*e.g.* RNAs virais) ou ainda a partir de transposons. Contudo, os siRNAs podem ser produzidos pela transcrição de sequências repetidas invertidas codificadas pelo genoma (Okamura e Lai, 2008). Outro aspecto distintivo entre ambos é o fato dos siRNAs serem totalmente complementares a seus alvos, enquanto que os

miRNAs podem apresentar uma complementaridade parcial com seus sítios de reconhecimento (Westerhout e Berkhout, 2007).

Embora as estruturas e os mecanismos envolvidos no processo de produção e ação dos miRNAs de animais, fungos e plantas apresentem diferenças substanciais, há uma série de proteínas comuns, conservadas e envolvidas na biossíntese e na rota de RNAi, sugerindo que os miRNAs de animais, fungos e vegetais tenham derivado de um mesmo sistema ancestral de proto-RNAi (Shabalina e Koonin, 2008; Davis e Hata, 2009).

RNAi Sistêmico ou Alóctone à Célula de Origem

Um aspecto muito interessante e particular da RNAi em plantas e também observado em alguns animais é o fato do processo de interferência poder ser iniciado em células de um tecido específico e espalhar-se para outras células de tecidos adjacentes ou mesmo assumir um contexto sistêmico, atingindo todo o organismo (Voynet e Baulcombe, 1997; Wassenecker e Pelissier, 1999; Shaharuddin et al., 2006).

Uma das primeiras demonstrações da distribuição sistêmica do sinal de silenciamento foi realizada em plantas de fumo transgênico expressando o gene da proteína verde fluorescente (GFP), após inoculação/infiltração de suas folhas com uma cepa de *Agrobacterium tumefaciens* também contendo o gene repórter GFP. Nos primeiros dias, apenas uma pequena região das folhas infiltradas apresentaram o silenciamento de GFP, mas, após 18 dias, o silenciamento da fluorescência inerente à expressão do transgene de GFP na planta podia também ser observado nas folhas superiores, demonstrando a existência de um processo de distribuição sistêmica do silenciamento (Voynet e Baulcombe, 1997).

Outro exemplo elegante do espalhamento sistêmico do silenciamento gênico também foi realizado em plantas de fumo por meio de experimentos de enxertia, no qual o fenótipo silenciado de uma planta pode ser transmitido com 100% de eficiência do porta-enxerto para o enxerto (Palauqui et al., 1997). Em animais, a ação sistêmica da RNAi também foi demonstrada em *C. elegans*, um nematoda de vida livre (Fire et al., 1998). Por meio da injeção de moléculas de RNAs de dupla fita (dsRNAs) na cavidade corporal, foi possível obter-se tanto o silenciamento de genes na região frontal quanto na caudal do animal e, até mesmo, estender o silenciamento para a geração seguinte (Fire et al., 1998).

RNAi Ambiental ou Alóctone ao Organismo

Na busca de métodos alternativos para a obtenção de silenciamento gênico por meio da apresentação de moléculas de dsRNAs para *C. elegans*, observou-se que a interferência por RNA também podia ser desencadeada pelo simples ato de mergulhar os nematodas em uma solução contendo dsRNAs (conhecido como método de *soaking*) ou, ainda, pela alimentação com bactérias expressando dsRNAs (Tabara et al., 1998; Timmons e Fire, 1998).

Além dos resultados obtidos em laboratório para *C. elegans*, também foi possível ativar o processo de RNAi pela exposição de outros organismos invertebrados (planária, hidra, abelhas melíferas e outros nematodas parasitas) a moléculas de dsRNAs presentes no ambiente exógeno (RNAi alóctone) ao organismo (Timmons et al., 2001; Newmark et al., 2003;

Chera et al., 2006; Geldhof et al., 2007; Patel et al., 2007). Esta forma de desencadeamento do silenciamento gênico também tem sido denominada de RNAi ambiental (Whangbo e Hunter, 2008). Um trabalho controverso demonstrou a possível existência de RNAi entre reinos, ou seja, a alimentação de mamíferos com arroz teria a capacidade de fazer com que microRNAs de arroz pudessem reduzir a expressão gênica de proteínas hepáticas dos organismos consumidores (Zhang et al., 2012).

Aspectos Relacionados à Especificidade do Processo de RNAi

Estudos realizados em invertebrados, plantas e em mamíferos têm demonstrado que um pequeno RNA com uma sequência específica, seja miRNA ou siRNA, é capaz de levar ao silenciamento gênico não somente do gene alvo, mas também de um ou mais genes não alvos, num efeito denominado de *off-target* (Scacheri et al., 2004; Jackson et al., 2006; Kim et al., 2006; Kulkarni et al., 2006; Ma et al., 2006; Xu et al., 2006; Tschuch et al., 2008). Esta não especificidade no processo de RNAi será dependente da sequência nucleotídica que estiver sendo utilizada, do genoma do organismo alvo, da forma de administração da molécula de dsRNA, entre inúmeros outros fatores. Os níveis de expressão ou produção dos siRNAs também podem afetar, saturando a capacidade de processividade das enzimas envolvidas nos processos de RNAi endógenos, em particular a atividade dos microRNAs (Grimm et al., 2006; John et al., 2007).

Foi demonstrado que quanto maior for a sequência do dsRNA, com a produção de inúmeros siRNAs, tanto maior será a possibilidade de ocorrer o silenciamento de genes não alvos (Kulkarni et al., 2006). Modificações químicas, tal como a metilação na posição da hidroxila 2' das riboses das moléculas de dsRNAs, estão sendo avaliadas e se mostrando efetivas no sentido de aumentar a especificidade para a sequência do gene alvo, evitando a ocorrência de *off-target* (Jackson et al., 2006; Jackson e Linsley, 2010).

Riscos Associados ao Uso da RNAi

Considerações sobre riscos e aspectos de biossegurança devem ser levantadas quanto ao uso do processo de RNAi em plantas e animais modificados geneticamente, uma vez que: (i) o silenciamento gênico baseado em miRNAs e siRNAs é um processo encontrado entre a grande maioria dos eucariontes (Shabalina e Koonin, 2008); (ii) moléculas de dsRNAs presentes em um organismo ou livres no ambiente podem ser assimiladas por outro organismo não relacionado e desencadear o processo de silenciamento gênico (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007); e (iii) o silenciamento acidental pode ocorrer por um pareamento parcial entre os pequenos RNAs e outros transcritos não alvos.

Diferentes plantas e animais utilizados na alimentação podem ser modificados geneticamente, produzindo pequenas moléculas de RNA interferente, que serão capazes de alterar a expressão de genes específicos, gerando novas características fenotípicas de interesse agropecuário e proteção contra insetos, nematoides, outras pragas e patógenos (Auer e Frederick, 2009). De fato, a utilização do processo de RNAi em plantas apresenta um imenso potencial para contrapor-se aos danos causados por insetos herbívoros e nematoides.

Entretanto, antes desta tecnologia poder ser aplicada em larga escala, será necessário ter-se conhecimento sobre: (i) os potenciais efeitos sobre outros possíveis genes não alvos do próprio organismo modificado geneticamente, nas pragas a serem combatidas e em outros insetos do ambiente, e nos animais e mesmo seres humanos que poderão se alimentar destas plantas; (ii) a possibilidade de populações de insetos/nematóides tornarem-se resistentes devido a mutações pontuais nos genes alvos; e, ainda, (iii) as chances e frequências com que uma infecção viral das plantas transgênicas possa suprimir ou atenuar os efeitos obtidos pelo mecanismo de RNAi.

Órgãos de controle e regulação agropecuária, sanitário e ambiental necessitam elaborar os critérios de avaliação de risco do uso, consumo e liberação destes organismos no meio ambiente. Para isto, novas metodologias se fazem necessárias para identificar estes organismos expressando dsRNAs/shRNAs e medir a persistência de seus pequenos RNAs derivados no meio ambiente e seus efeitos.

O uso de duplexes de RNA na medicina, como uma droga farmacológica, deverá seguir procedimentos semelhantes ao de outros medicamentos testados pela indústria. A existência de possíveis efeitos colaterais, sobre genes não alvos, deve ser detectada e avaliada no contexto de riscos e benefícios para cada paciente e cada doença, como quando da prescrição e uso de outras drogas químicas. Embora estudos estejam sendo realizados na busca de maior especificidade pelos genes alvos, o uso da RNAi deve ser considerado como uma alternativa promissora, mas também sujeita a efeitos colaterais indesejáveis, principalmente no caso de tratamentos crônicos.

Entre os efeitos colaterais da utilização de metodologias envolvendo o uso de RNAs está a ativação do sistema imune inato dependente e independente de receptores *Toll-like* (TLR). Uma resposta citotóxica pode ser desencadeada pela interação entre moléculas de siRNAs ricos em sequências UG ou UA, mas este efeito indesejado pode ser evitado pela administração de siRNAs associados a nanopartículas, evitando seu uso na forma livre (Pecot et al. 2011). Outro detalhe descoberto com o uso intensivo de siRNAs para indução de RNAi em sistemas celulares *in vitro* foi a indução de uma resposta celular mediada pelo interferon, tanto para siRNAs de dupla fita como de fita simples, quando da permanência de grupamentos trifosfato da extremidade 5'. Este efeito indesejável pode ser potencialmente eliminado pelo uso de uma fosfatase (Kim et al., 2004). Outro efeito indesejado que pode ocorrer é o processo conhecido como interferência transitiva do RNA (Figura 1) ou silenciamento de *loci*, localizados nas proximidades do gene alvo da interferência, em particular para os genes posicionados na região 5' em relação ao gene alvo (Alder et al., 2003). Estes efeitos podem ser reduzidos ou eliminados mediante o posicionamento da região alvo antecedente a introns, sendo que, quanto maiores os introns, menor a possibilidade de ocorrência de uma interferência transitiva (Vermeersch et al., 2010).

O conjunto dos dados produzidos até o momento demonstram que a utilização biotecnológica de RNAi é promissora, mas deve ser utilizada considerando-se todas as possibilidades anteriormente levantadas e outras ainda a serem descobertas. O conjunto de dificuldades não inviabiliza o uso, mas confirma que as ações de alterações metabólicas e de expressão de genes em um organismo nunca serão totalmente específicas e cada sistema deverá ser estudado dentro de suas particularidades.

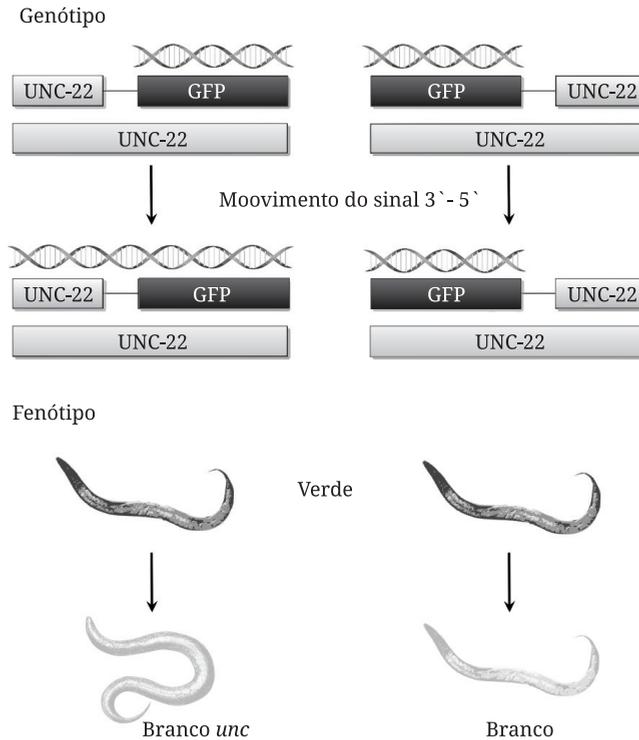


FIGURA 1. RNAi transitivo. Duas linhagens de *C. elegans* geneticamente modificadas são apresentadas. A linhagem da esquerda contém um transgene composto pela fusão de *unc-22::GFP*. A linhagem da direita contém um transgene composto pela fusão *GFP::unc-22*. Ambas as linhagens são alimentadas com dsRNA contra GFP. Dentro do verme, uma RdRP, com atividade polimerásica 5'-3', estende o dsRNA original. Como o dsRNA (assim como o dsDNA) é composto por cadeias antiparalelas, há a impressão de que o sinal se move no sentido 3'-5' em relação ao transcrito alvo. Como consequência desta extensão, seqüências localizadas a 5' do transcrito alvo original também são silenciadas. Portanto, um verme com o transgene *unc-22::GFP*, ao ser alimentado com dsRNA contra GFP, perde a fluorescência verde e tem seu gene *unc-22* também silenciado. O silenciamento de *unc-22* promove uma alteração comportamental (tremores).

Referências Bibliográficas

- Alder, M. N., Dames, S., Gaudet, J. and Mango, S. E. 2003. Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA* 9(1):25-32. PMID:12554873 PMCID:1370367. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2650903>
- Auer, C. and Frederick, R. 2009. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. *Trends Biotechnol* 27:644-651. PMID:19796832. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.08.005>
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. and Roberts, J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25:1322-1326. PMID:17982443. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1359>
- Chera, S., De Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., Dobretz, K., Ghila, L., Kaloulis, K. and Galliot, B. 2006. Silencing of the hydra serine protease inhibitor Kazal1 gene mimics the human SPINK1 pancreatic phenotype. *J Cell Sci* 119:846-857. PMID:16478786. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02807>
- Davis, B. N. and Hata, A. 2009. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 7:18. PMID:19664273 PMCID:3224893. <http://dx.doi.org/10.1186/1478-811X-7-18>

Cópia gratuita - venda proibida

- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811. PMID:9486653. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
- Geldhof, P., Visser, A., Clark, D., Saunders, G., Britton, C., Gilleard, J., Berriman, M. and Knox, D. 2007. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology* 134:609-619. PMID:17201997. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182006002071>
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. and Kay, M. A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441(7092):537-41. PMID:16724069. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04791>
- Jackson, A. L., Burchard, J., Leake, D., Reynolds, A., Schelter, J., Guo, J., Johnson, J. M., Lim, L., Karpilow, J., Nichols, K., Marshall, W., Khvorova, A. and Linsley, P. S. 2006. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA* 12:1197-1205. PMID:16682562 PMCID:1484422. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.30706>
- Jackson, A. L. and Linsley, P. S. 2010. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9(1):57-67. PMID:20043028. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3010>
- John, M., Constien, R., Akinc, A., Goldberg, M., Moon, Y. A., Spranger, M., Hadwiger, P., Soutschek, J., Vornlocher, H. P., Manoharan, M., Stoffel, M., Langer, R., Anderson, D. G., Horton, J. D., Kotliansky, V. and Bumcrot, D. 2007. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway. *Nature* 449(7163):745-7. PMID:17898712 PMCID:3019095. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06179>
- Khraiweh, B., Arif, M. A., Seumel, G. I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R. and Frank, W. 2010. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 140:111-22. PMID:20085706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.023>
- Kim, D. H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E. and Rossi, J. J. 2004. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22(3):321-5. PMID:14990954. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt940>
- Kim, S. H., Mok, H., Jeong, J. H., Kim, S. W. and Park, T. G. 2006. Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconjug Chem* 17:241-244. PMID:16417275. <http://dx.doi.org/10.1021/bc050289f>
- Kulkarni, M. M., Booker, M., Silver, S. J., Friedman, A., Hong, P. Y., Perrimon, N. and Mathey-Prevot, B. 2006. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat Methods* 3:833-838. PMID:16964256.
- Ma, Y., Creanga, A., Lum, L. and Beachy, P. A. 2006. Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature* 443:359-363. PMID:16964239. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05179>
- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., Huang, Y. P. and Chen, X. Y. 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat Biotechnol* 25:1307-1313. PMID:17982444. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1352>
- Newmark, P. A., Reddien, P. W., Cebria, F. and Alvarado, A. S. 2003. Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11861-11865. PMID:12917490 PMCID:304099. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1834205100>
- Numata, K., Okada, Y., Saito, R., Kiyosawa, H., Kanai, A. and Tomita, M. 2007. Comparative analysis of cis-encoded antisense RNAs in eukaryotes. *Gene* 392:134-141. PMID:17250976. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2006.12.005>
- Obbard, D. J., Gordon, K. H. J., Buck, A. H. and Jiggins, F. M. 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:99-115. PMID:18926973 PMCID:2592633. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>
- Okamura, K. and Lai, E. C. 2008. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9):673-8. PMID:18719707 PMCID:2729316. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2479>

- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16:4738-4745. PMID:9303318 PMCID:1170100. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.15.4738>
- Pariset, L., Chillemi, G., Bongiorno, S., Spica, V. R. and Volentini, A. 2009. Microarrays and high-throughput transcriptomic analysis in species with incomplete availability of genomic sequences. *N Biotechnol* 25:272-279. PMID:19446516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.03.013>
- Patel, A., Fondrk, M. K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederick, K. and Amdam, G. V. 2007. The Making of a Queen: TOR Pathway Is a Key Player in Diphenic Caste Development. *PLoS ONE* 2(6):e509. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000509>
- Pecot, C. V., Calin, G. A., Coleman, R. L., Lopez-Berestein, G. and Sood, A. K. 2011. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 11(1):59-67. PMID:21160526 PMCID:3199132. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2966>
- Prieto, C., Risueno, A., Fontanillo, C. and De Las Rivas, J. 2008. Human Gene Coexpression Landscape: Confident Network Derived from Tissue Transcriptomic Profiles. *PLoS ONE* 3(12):e3911. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003911>
- Scacheri, P. C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N. J., Wolfsberg, T. G., Umayam, L., Lee, J. C., Hughes, C. M., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M. and Collins, F. S. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1892-1897. PMID:14769924 PMCID:357023. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308698100>
- Shabalina, S. A. and Koonin, E. V. 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol* 23:578-587. PMID:18715673 PMCID:2695246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- Shaharuddin, N. A., Han, Y. H., Li, H. Y. and Grierson, D. 2006. The mechanism of graft transmission of sense and antisense gene silencing in tomato plants. *FEBS Lett.* 580:6579-6586. PMID:17113082. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.11.005>
- Tabara, H., Grishok, A. and Mello, C. C. 1998. RNAi in C-elegans: Soaking in the genome sequence. *Science* 282:430-431. PMID:9841401. <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5388.430>
- Timmons, L. and Fire, A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854-854. PMID:9804418. <http://dx.doi.org/10.1038/27579>
- Timmons, L., Court, D. L. and Fire, A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263:103-112. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5)
- Tschuch, C., Schulz, A., Pscherer, A., Werft, W., Benner, A., Hotz-Wagenblatt, A., Barrionuevo, L. S., Lichter, P. and Mertens, D. 2008. Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC Mol Biol* 9:60. PMID:18577207 PMCID:2443166. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2199-9-60>
- Vermeersch, L., De Winne, N. and Depicker, A. 2010. Introns reduce transitivity proportionally to their length, suggesting that silencing spreads along the pre-mRNA. *Plant J* 64(3):392-401. PMID:21049564. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04335.x>
- Voinnet, O. and Baulcombe, D. C. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389:553-553. PMID:9335491. <http://dx.doi.org/10.1038/39215>
- Wassenegger, M. and Pelissier, T. 1999. Signalling in gene silencing. *Trends Plant Sci* 4:207-209. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01416-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01416-8)
- Westerhout, E. M. and Berkhout, B. 2007. A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. *Nucleic Acids Res* 35:4322-4330. PMID:17576691 PMCID:1934999. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm437>
- Whangbo, J. S. and Hunter, C. P. 2008. Environmental RNA interference. *Trends Genet* 24:297-305. PMID:18450316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.007>
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. and Diederichs, S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234. PMID:19255566. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0309-228>

- Xu, P., Zhang, Y. J., Kang, L., Roossinck, M. J. and Mysore, K. S. 2006. Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol* 142:429-440. PMID:16920874 PMCID:1586062. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.083295>
- Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K. and Zhang, C. Y. 2012. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 22:107-126. PMID:21931358 PMCID:3351925. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.158>
- Zhu, W. and Buell, C. R. 2007. Improvement of whole-genome annotation of cereals through comparative analyses. *Genome Res* 17:299-310. PMID:17284677 PMCID:1800921. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.5881807>

Supressores de RNAi

Capítulo

12

Profa. Dra. Poliane Alfenas Zerbini¹ & Prof. Dr. Francisco Murilo Zerbini²

¹Dpto. de Microbiologia / BIOAGRO, UFV

²Dpto. de Fitopatologia / BIOAGRO, UFV

Introdução

O silenciamento mediado por RNA ou Interferência por RNA (RNAi) constitui um mecanismo eficiente de defesa contra vírus e retrotransposons (Tijsterman et al., 2002; Obbard et al., 2009). As primeiras evidências de que a RNAi é um mecanismo de defesa antiviral vieram a partir de estudos em plantas na década de 1990 (Lindbo et al., 1993; Dougherty et al., 1994; Marathe et al., 2000). Foi observado que plantas transgênicas de tabaco, expressando uma forma não traduzível do gene que codifica a proteína capsidial do *Tobacco etch virus* (TEV, gên. *Potyvirus*) se recuperavam da infecção quando infectadas pelo TEV. Quando estas plantas transgênicas eram inoculadas com o TEV, os sintomas da infecção viral eram inicialmente observados nas próprias folhas inoculadas. Entretanto, ao contrário do que ocorre em plantas não transgênicas, não eram observados sintomas nas folhas desenvolvidas após o ponto de inoculação, e estas folhas emergentes eram imunes a uma segunda inoculação com o mesmo isolado de TEV. Foi demonstrado que nas folhas emergentes, imunes ao TEV, o mRNA transgênico estava sendo degradado pós-transcricionalmente. Foi proposto então que a resistência ao TEV assim como o decréscimo no acúmulo do transcrito do transgene eram mediados pelo mesmo mecanismo. Segundo os autores, esse mecanismo seria capaz de: (i) detectar o transcrito a ser degradado; (ii) discriminá-lo em relação aos demais transcritos celulares; e (iii) degradá-lo rápida e eficientemente. O mecanismo seria “disparado” devido ao acúmulo de grande quantidade de mRNA transgênico não associado a polissomos, que de alguma forma seria detectado. A discriminação em relação aos demais mRNAs deveria ser, forçosamente, com base em sua sequência. Assim, o mecanismo já estaria ativado quando a infecção viral se iniciasse, e o RNA

viral seria degradado por possuir a mesma sequência do mRNA transgênico (Lindbo et al., 1993). O modelo proposto se assemelha de forma surpreendente com o que se conhece hoje a respeito de RNAi em plantas.

Trabalhos posteriores mostraram que plantas não transgênicas de tabaco infectadas com uma forma recombinante do *Tobacco mosaic virus* (TMV, gên. *Tobamovirus*) contendo um fragmento do gene que codifica a enzima fitoenol desidrogenase apresentavam um decréscimo no acúmulo do transcrito endógeno correspondente a este gene (Kumagai et al., 1995). Esse resultado comprovou que vírus recombinantes podem induzir o silenciamento de mRNA endógenos em plantas não transgênicas, um processo atualmente denominado *virus-induced gene silencing* (VIGS). Em seguida, foi demonstrado que plantas não transgênicas infectadas pelo *Potato virus X* (PVX, gên. *Potexvirus*) contendo um inserto correspondente à sequência codificadora de GFP eram resistentes a uma segunda inoculação com TMV contendo a mesma sequência de GFP, porém eram suscetíveis se o TMV continha a sequência codificadora de GUS (Ratcliff et al., 1999). Outra evidência de que a RNAi constitui uma resposta de defesa antiviral veio da observação de que em plantas infectadas pelo PVX ocorre um acúmulo de siRNAs derivados do genoma viral (Hamilton e Baulcombe, 1999).

Em conjunto, esses trabalhos, ao demonstrarem a existência de um mecanismo de defesa antiviral altamente eficiente em plantas capaz de conferir imunidade aos vírus, levaram quase que imediatamente à pergunta: como os vírus conseguem superar esse mecanismo de forma a estabelecer uma infecção sistêmica na planta hospedeira?

A resposta a essa pergunta veio com a identificação de proteínas (virais e endógenas) com capacidade de suprimir o mecanismo de RNAi. Os trabalhos iniciais foram baseados na hipótese de que se a RNAi é um mecanismo de defesa antiviral, os vírus devem ter desenvolvido mecanismos para escapar ou suprimir este mecanismo. A ideia da presença de proteínas supressoras de RNAi (PSRs) foi inicialmente desenvolvida baseada na observação do fenômeno denominado sinergismo, em que plantas com infecção simultânea por dois vírus (infecção mista) desenvolvem sintomas mais severos do que aqueles observados em plantas infectadas com cada um dos vírus isoladamente. Foi demonstrado que, em infecções mistas em que um dos vírus era um potyvírus (*e.g.*, o TEV ou o *Potato virus Y*, PVY), o sinergismo era devido à presença da proteína HC-Pro (Pruss et al., 1997). De fato, a primeira PSR identificada foi P1/HC-Pro (Anandalakshmi et al., 1998; Brigneti et al., 1998; Kasschau e Carrington, 1998). Desde então, PSRs com a capacidade de suprimir o mecanismo de RNAi em diferentes pontos da via já foram identificadas em vírus pertencentes a praticamente todos os gêneros de vírus de plantas, inclusive aqueles que incluem vírus com genomas de DNA.

A conservação da RNAi em organismos eucariotos sugere que o mecanismo de defesa antiviral não está restrito a plantas. De fato, trabalhos descrevem atividade antiviral semelhante à de plantas em fungos (Segers et al., 2006), insetos (Wang et al., 2006) e nematoides (Wilkins et al., 2005). A identificação de miRNAs derivados de genomas virais (Pfeffer et al., 2004; Sullivan et al., 2005), a regulação da replicação viral por miRNAs celulares (Jopling et al.,

2005; Lecellier et al., 2005) e a identificação de diversas PSRs em vírus que infectam mamíferos (Li et al., 2002; De Vries e Berkhout, 2008) sugerem a existência da atividade antiviral nesses organismos.

Além das PSRs codificadas por vírus, já foi demonstrada a existência de PSRs endógenas em plantas. A primeira PSR endógena identificada foi a proteína rgs-CaM (*regulator of gene silencing- calmodulin-like protein*) (Anandalakshmi et al., 2000). Atualmente existem diversas PSRs endógenas descritas em plantas (Gazzani et al., 2004; Sarmiento et al., 2006; Gy et al., 2008). Em bactérias, foi demonstrado que proteínas efetoras atuam suprimindo a via dos miRNAs envolvidos em respostas de defesa do hospedeiro (Navarro et al., 2008).

Uma característica interessante das proteínas supressoras de RNAi é que elas não possuem homologia entre si, apresentando uma grande diversidade de sequência e estrutura (Li e Ding, 2001). A atividade das PSRs codificadas por vírus (mas não das PSRs endógenas) pode afetar inadvertidamente a via dos miRNAs, envolvida no controle da expressão de genes do hospedeiro, e em alguns casos esse efeito está associado com a indução de sintomas durante a infecção viral.

Técnicas Utilizadas para a Identificação de Supressores

Expressão Transiente Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A expressão transiente mediada por *Agrobacterium*, comumente denominada “agroinfiltração”, é um dos métodos mais utilizados para a identificação de PSRs. É uma técnica de fácil execução que fornece resultados rápidos, entretanto não é capaz de identificar PSRs que afetam o sinal sistêmico de RNAi.

Neste ensaio, folhas de *Nicotiana benthamiana* são coinfiltradas com duas culturas de *Agrobacterium*. Uma induz o silenciamento de um gene repórter, geralmente GFP, e a outra expressa a proteína candidata a supressora. *Nicotiana benthamiana* é ideal para este tipo de ensaio porque as folhas são facilmente infiltradas e permitem a produção de uma grande quantidade de proteína em resposta à agroinfiltração (Roth et al., 2004). Dois a três dias após a agroinfiltração, observa-se na região infiltrada, sob luz ultravioleta, uma fluorescência verde brilhante devido à expressão de GFP. Por volta do sexto ou sétimo dia após a agroinfiltração, se a proteína candidata é de fato uma PSR, a fluorescência se mantém. Se a proteína candidata não é supressora, a fluorescência verde desaparece, observando-se apenas a autofluorescência vermelha da clorofila (Roth et al., 2004; Li e Ding, 2006) (Figura 1). Existem algumas variações deste ensaio em que plantas de *N. benthamiana* expressando GFP (linhagem 16C) (Ruiz et al., 1998) são utilizadas no lugar das plantas selvagens. Também podem ser utilizadas construções em repetição invertida do gene repórter, para uma indução mais rápida e eficiente do silenciamento (Johansen e Carrington, 2001).

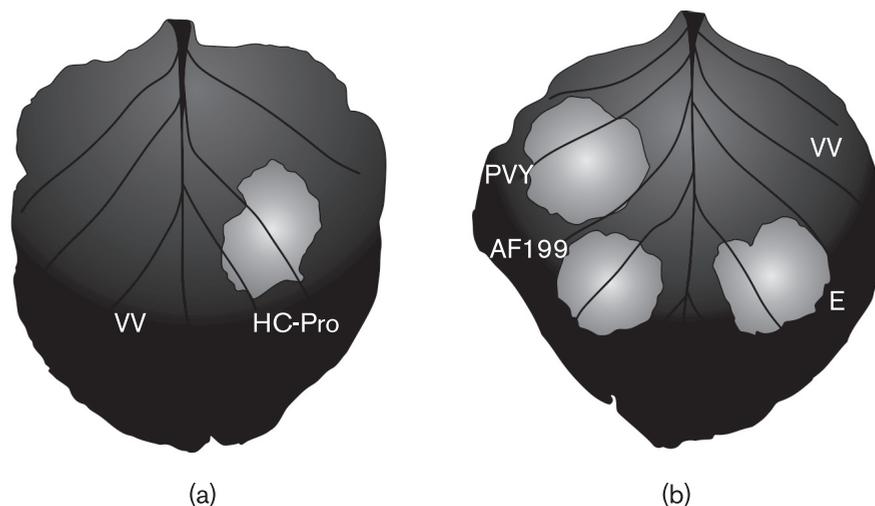


Figura 1. Identificação de proteínas supressoras de RNAi por meio de expressão transiente mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (agroinfiltração) em plantas de *Nicotiana benthamiana*. A. Folha de *N. benthamiana* agroinfiltrada com culturas de *A. tumefaciens* contendo um plasmídeo para expressão de GFP em conjunto com uma cultura contendo o mesmo vetor sem inserto (vetor vazio, VV) ou uma cultura contendo um plasmídeo para expressão da proteína HC-Pro do *Potato virus Y* (PVY, gên, *Potyvirus*). A observação sob luz ultravioleta demonstra o silenciamento da expressão de GFP sete dias após a coinfiltração com o vetor vazio (ausência de fluorescência verde, observando-se apenas a autofluorescência vermelha da clorofila), e a supressão do silenciamento após a coinfiltração com HC-Pro (presença de fluorescência verde). B. Folha de *N. benthamiana* agroinfiltrada com culturas de *A. tumefaciens* contendo um plasmídeo para expressão de GFP em conjunto com uma cultura contendo vetor vazio (VV) ou plasmídeos para expressão de HC-Pro do PVY e dos isolados AF199 e E do *Lettuce mosaic virus* (LMV, gên, *Potyvirus*). As três proteínas virais atuam como supressoras de RNAi.

Expressão Estável e Enxertia

Os ensaios de expressão estável e enxertia permitem a identificação de PSRs que atuam sobre o sinal sistêmico. É uma técnica mais trabalhosa e demorada devido à necessidade da obtenção de plantas transgênicas expressando a proteína candidata a supressora e de plantas transgênicas silenciadas e expressando o gene repórter. As linhagens transgênicas de *Nicotiana tabacum* T19, que expressa GUS (English et al., 1996), e 6b5, silenciada para GUS (Elmayan e Vaucheret, 1996), são as mais comumente utilizadas neste tipo de ensaio.

Nesta técnica, uma planta transgênica expressando a proteína candidata a supressora é cruzada com uma planta transgênica silenciada para o gene repórter. Plantas da progênie deste cruzamento (F1) são usadas como porta-enxerto para a enxertia de um ramo de uma planta expressando o gene repórter. Se a expressão no enxerto se mantém, conclui-se que a proteína candidata bloqueou a passagem do sinal sistêmico do porta-enxerto para o enxerto. Se a proteína candidata não é supressora, a expressão do gene repórter no enxerto é silenciada.

Técnicas Baseadas em Cultura de Células

PSRs codificadas por vírus que infectam animais têm sido identificadas utilizando duas abordagens principais: (i) RNAi induzida pela replicação viral; ou (ii) cotransfecção de um gene repórter com siRNAs ou *short hairpin* RNAs (shRNAs).

O componente central do sistema de identificação baseado na replicação viral é o vetor pFR1gfp, que possui o cDNA correspondente a uma forma recombinante do RNA1 do *Flock house virus* (FHV, gên. *Nodavirus*). Esse RNA1 recombinante origina um RNA subgenômico (RNA3) que codifica GFP (originalmente o RNA 3 codifica a PSR B2). Neste sistema, a expressão em trans de uma PSR é essencial para que ocorra a multiplicação do RNA1 do FHV e a consequente expressão de GFP (Li et al., 2002).

O princípio do ensaio baseado em cotransfecção é o mesmo do ensaio de agroinfiltração utilizado em plantas. A cultura de células é cotransfectada com: (i) um plasmídeo expressando o gene repórter, geralmente GFP ou luciferase; (ii) o siRNA sintético ou um plasmídeo que codifica shRNA; e (iii) um plasmídeo expressando o gene que codifica a proteína candidata a supressora. Se a proteína candidata possui de fato atividade supressora de RNAi, a expressão do gene repórter se mantém (Elbashir et al., 2002; Li et al., 2004; Sullivan et al., 2005).

Mecanismos de Ação dos Supressores de Silenciamento

As proteínas supressoras de RNAi, conforme mencionado anteriormente, não possuem conservação de seqüências ou de estrutura, o que reflete seus diferentes mecanismos de ação em pontos distintos das vias de RNAi (Figura 2). No caso das proteínas virais, praticamente todas as PSRs estudadas possuem alguma outra função no ciclo de infecção, incluindo replicação do genoma, movimento célula a célula ou sistêmico, e encapsidação do ácido nucleico viral. Entretanto, se existe alguma característica em comum entre pelo menos algumas PSRs virais, essa é sua capacidade de ligação a dsRNA (Lakatos et al., 2006; Merai et al., 2006). Isso não é surpreendente, considerando-se o papel central que o dsRNA possui nas diferentes vias de RNAi, tanto as endógenas quanto aquelas relacionadas à defesa antiviral. Embora essa seja uma característica genérica, as diferentes PSRs virais diferem na capacidade de ligação a siRNAs curtos ou longos, ou a dsRNAs precursores longos (Merai et al., 2006). Entretanto, alguns autores questionam se a capacidade de ligação a dsRNA não seria uma consequência dos mecanismos específicos de ação das diferentes PSRs, ou mesmo de alguma outra função associada à proteína que exija ligação a dsRNA (considerando-se que a maioria das PSRs virais já caracterizadas são codificadas por vírus de RNA, nos quais moléculas de dsRNA são produzidas como intermediário do ciclo de replicação), ao invés de um mecanismo de supressão propriamente dito (Ding e Voinnet, 2007).

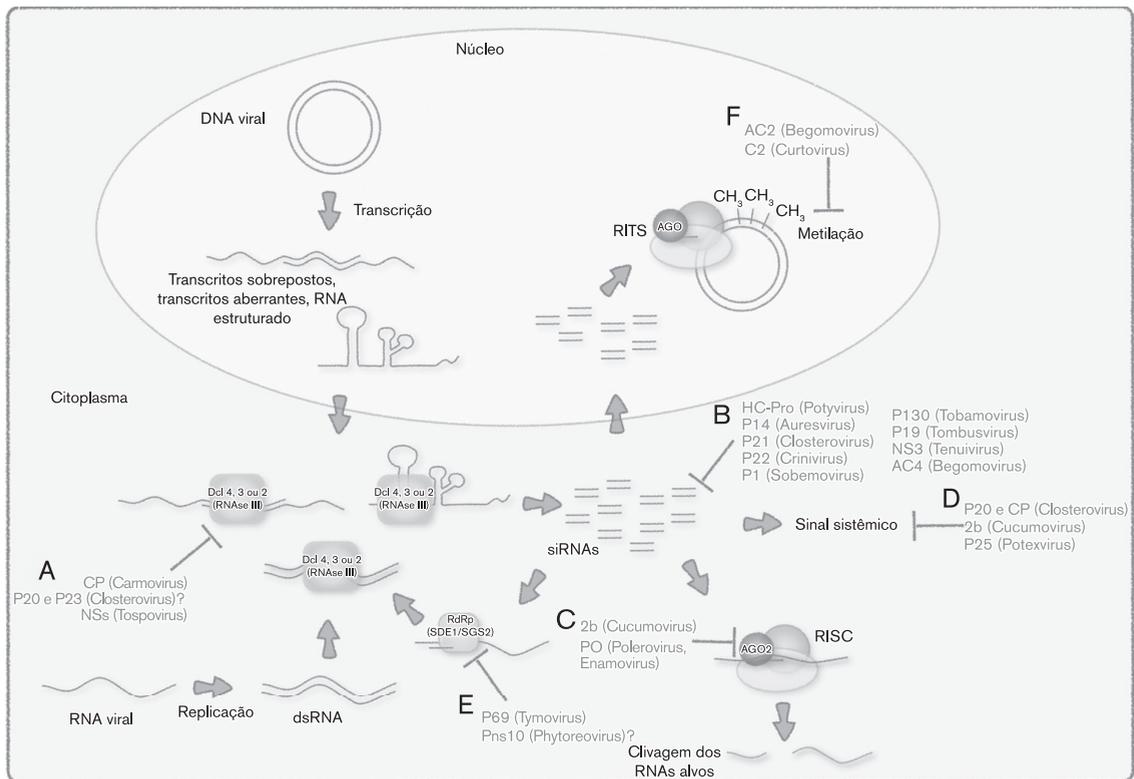


Figura 2. As diferentes vias de RNAi em plantas e animais, com a indicação dos pontos em que diferentes PSRs atuam. A. Interferência na atividade de Dicer (DCL-2, -3, -4). **B.** Supressão da produção e/ou do acúmulo do siRNAs. A supressão pode ocorrer de várias formas, por exemplo, pelo sequestro dos siRNAs (P19) ou por ligação da proteína supressora a dsRNA, impedindo o seu processamento (HC-Pro). **C.** Interferência com a atividade de Slicer (AGO1). **D.** Inibição do sinal sistêmico. **E.** Interferência com a atividade de RdRP (SDE1/SGS2). **F.** Inibição da metilação do DNA viral.

Supressão da Produção de siRNAs

A ligação da proteína supressora a dsRNA pode tornar o dsRNA inacessível para a atuação de Dicer, inibindo a produção de siRNAs. A primeira indicação deste mecanismo de supressão veio da observação de que, em plantas transgênicas expressando a PSR HC-Pro, ocorre um aumento no acúmulo de dsRNAs não processados. Especificamente, HC-Pro inibe o acúmulo de siRNAs de 21 nt, mas possui pouco efeito sobre o acúmulo dos siRNAs de 24 nt (Mallory et al., 2002; Dunoyer et al., 2004). Foi proposto que HC-Pro não atua sobre a biogênese dos siRNAs de 24 nt, porque a via de produção desses siRNAs, dependente de DCL3/RDR2/AGO4, seria nuclear, e HC-Pro possui localização exclusivamente citoplasmática (Li e Ding, 2006). Foi demonstrado também que a expressão de HC-Pro reduz a metilação no terminal 3' dos siRNAs de 21-22 nt virais, aumentando a instabilidade desta classe de siRNAs, mas possui pouco ou nenhum efeito sobre a população de miRNAs ou siRNAs de 24 nt (Ebhardt et al., 2005).

Ao contrário de HC-Pro, as proteínas P1 do *Rice yellow mottle virus* (gên. *Sobemovirus*) e a p25 codificada pelo PVX inibem o acúmulo dos siRNAs de 24 nt e apresentam pouco efeito sobre os de 21 nt (Hamilton et al., 2002). Em plantas infectadas pelo PVX, ocorre um acúmulo somente de siRNAs de 21 nt, sugerindo que P25 inibe a produção de siRNAs virais de 24 nt (Schwach et al., 2005).

A inibição do processamento de dsRNAs longos também foi demonstrada para a proteína supressora B2 do FHV, inicialmente *in vitro*, utilizando extrato de células de *Drosophila* (Chao et al., 2005). Em células de mamíferos expressando B2 do nodavírus *Nodamura virus* (NoV), também foi observada uma redução no acúmulo de siRNAs derivados de hpRNA (Sullivan e Ganem, 2005). Mutações na região central do domínio de ligação a dsRNA de B2 eliminam a capacidade de ligação a dsRNA e também a atividade inibitória de clivagem por Dicer, reforçando a hipótese de que B2 atua via ligação a dsRNA (Chao et al., 2005; Lingel et al., 2005).

Um caso atípico de supressão de silenciamento via supressão da síntese de siRNAs é a observação de que os RNAs VAI e VAII dos adenovírus atuam como supressores sem que seja codificada uma proteína. Os RNAs VAI e VAII são RNAs não traduzidos com estrutura secundária semelhante à dos precursores de miRNAs. Essa estrutura faz com que esses RNAs sejam um alvo para Dicer. Entretanto, a ligação de Dicer a esses RNAs leva à inibição de sua atividade enzimática em extratos de células (Andersson et al., 2005) e *in vitro* (Lu e Cullen, 2004), por um mecanismo ainda não determinado. Dessa forma, o acúmulo dos RNAs VAI e VAII leva à supressão da síntese de siRNAs virais por inibição da atividade de Dicer.

Sequestro de siRNAs

O mecanismo de supressão por sequestro de siRNAs foi observado pela primeira vez para a proteína P19 do *Tomato bushy stunt virus* e do *Cymbidium ringspot virus* (TBSV e CymRSV, respectivamente; gên. *Tombusvirus*) (Qiu et al., 2002; Silhavy et al., 2002). Foi proposto que a ligação de P19 ao duplex de siRNAs de 21 nt impede o carregamento do siRNA em RISC, suprimindo, desta forma, o silenciamento (Silhavy et al., 2002; Vargason et al., 2003; Lakatos et al., 2004). Inicialmente foi demonstrado que P19 possui afinidade *in vitro* pelos siRNAs de fita dupla de 21 nt (Silhavy et al., 2002). Em seguida, outros trabalhos mostraram que a afinidade pelos siRNAs de fita dupla de 21 nt é maior do que pelos dsRNAs de fita dupla longos ou de fita simples (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). Estudos de ligação a siRNA *in vivo* mostraram que, em células infectadas por tombusvírus, P19 se liga a siRNAs virais, diminuindo o nível destas moléculas no citoplasma (Lakatos et al., 2004). A capacidade de ligação a siRNAs não é específica a sequências virais, uma vez que P19 possui a capacidade de suprimir o silenciamento de transgenes não relacionados (Voinnet et al., 1999; Qiu et al., 2002), inclusive em organismos não hospedeiros como *A. thaliana* (Papp et al., 2003; Szittyta et al., 2003; Dunoyer et al., 2004), células S2 de *Drosophila* (Li et al., 2004), humanos (Lecellier et al., 2005) e *C. elegans* (Lu et al., 2005).

P19 é uma proteína citosólica que atua na forma de dímeros (Vargason et al., 2003; Lakatos et al., 2004; Park et al., 2004). A análise estrutural de P19 mostrou que os dímeros estão organizados com as porções N-terminais posicionadas em direções opostas, formando uma fenda onde a fita dupla do siRNA se insere. A conformação do dímero resulta em uma superfície com vários resíduos polares ou carregados que servem como pontos de contato para a interação com o duplex de RNA. Interações eletrostáticas se dão pelo esqueleto de açúcar/fosfato, o que explica a falta de especificidade de sequência e a preferência por dsRNA.

A afinidade por siRNAs de 21 nt e não menores ou maiores é explicada pela presença de resíduos de triptofano nas posições 29 e 42 de cada monômero. Esses resíduos atuam como uma “régua molecular”, formando pontes de hidrogênio com o nucleotídeo fosforilado na extremidade 5' de cada uma das fitas do duplex, resultando na alta afinidade por moléculas de dsRNA com exatamente 21 nt (Ye et al., 2003).

A capacidade de ligação a siRNAs também foi demonstrada para a proteína NS1 do *Influenza A virus* (FLUAV, gên. *Orthomyxovirus*), e foi proposto que o mecanismo de ação também é por sequestro de siRNAs, impedindo a montagem do RISC (Bucher et al., 2004). Entretanto, diferentemente de P19, foi demonstrado que NS1 possui a capacidade de ligação a dsRNAs longos (Wang et al., 1999), apesar de que com menor eficiência do que outras proteínas celulares de ligação a esse tipo de molécula (Krug et al., 2003). Foi proposto que a capacidade de ligação a siRNAs está envolvida na resposta de defesa mediada por RNAi, e a de ligação a dsRNAs longos, em respostas de defesa mediada por interferon (Bucher et al., 2004; Li et al., 2004). NS1 é funcional em plantas e possui a capacidade de afetar o silenciamento local (Bucher et al., 2004) e sistêmico (Delgadillo et al., 2004).

Inibição do Sinal Sistêmico

A proteína p25 do PVX foi a primeira proteína supressora descrita com a capacidade de inibição do sinal sistêmico de silenciamento mediado por RNA. Trabalhos de enxertia mostraram que o silenciamento sistêmico induzido por um transgene era bloqueado na presença de p25. Além disso, foi comprovado que p25 é capaz de suprimir o silenciamento com uma baixa eficiência em ensaios de agroinfiltração. Com base nestes resultados, foi proposto que a incapacidade do silenciamento em se disseminar por toda a planta na presença de p25 seria devida à capacidade da proteína supressora em interferir com a produção do sinal sistêmico (Voinnet et al., 2000). Trabalhos posteriores mostraram que p25 inibe o acúmulo de siRNAs longos (24-25 nt), sugerindo a inibição da síntese ou a degradação destas moléculas por p25, direta ou indiretamente (Hamilton et al., 2002). Foi demonstrado que a capacidade de supressão de silenciamento de p25 é requerida para a movimentação célula a célula do PVX, sugerindo que a maquinaria de silenciamento é efetiva para inibir o movimento viral e que p25 bloqueia de fato a sinalização sistêmica em plantas infectadas (Bayne et al., 2005).

Outra proteína supressora que bloqueia a sinalização sistêmica é a proteína 2b do *Cucumber mosaic virus* (CMV, gên. *Cucumovirus*). Inicialmente foi demonstrado que a expressão de 2b via vetor viral PVX foi capaz de suprimir o silenciamento em plantas de *N. benthamiana* silenciadas para GFP (Brigneti et al., 1998). Trabalhos posteriores utilizando a técnica de enxertia mostraram que a expressão de 2b previne o silenciamento no enxerto repórter, sugerindo que a supressão do silenciamento mediada por 2b envolve a inativação ou o bloqueio do sinal sistêmico. Os autores propuseram que 2b interage diretamente com o sinal sistêmico ou com algum componente do sinal, desestabilizando ou levando à sua inativação (Guo e Ding, 2002). Além disso, foi demonstrado que a expressão de 2b inibe o acúmulo de pequenos RNAs de 21, 22 e 24 nt em *Arabidopsis* e interfere com a atividade de RDR1, uma RNA polimerase dependente de RNA que possui papel na produção de siRNAs virais (Diaz-Pendon et al., 2007). Foi demonstrado ainda que 2b possui capacidade de se ligar a siRNAs sintetizados *in vitro*, indicando que o mecanismo de supressão pode ser por ligação a siRNAs envolvidos na sinalização sistêmica (Goto et al., 2007). A proteína 2b forma um dímero e reconhece duplex de siRNAs de uma maneira independente de sequência, com alta afinidade por moléculas de 19 ou 30 nt. O dímero reconhece duas voltas da dupla hélice

do RNA pelas fendas maiores, que são acomodadas no esqueleto proteico do dímero. Nesta região de interação, existem resíduos positivamente carregados conservados que formam pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas com as fitas do RNA. De maneira análoga ao reconhecimento do siRNA por P19, o duplex de siRNA é reconhecido por 2b por meio de suas extremidades 5' (Chen et al., 2008).

Interferência na Atividade de Ago1 (*Slicer*)

A supressão de silenciamento por interferência direta na atividade de AGO1 (*Slicer*) foi descrita para os supressores 2b do CMV (Zhang et al., 2006) e P0 do *Beet western yellows virus* (BWYV, gên. *Polerovirus*) (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007). Apesar de atuarem no mesmo componente da via de RNAi, o mecanismo específico de ação destas duas proteínas é diferente.

A proteína supressora 2b se liga ao domínio PAZ (domínio de ligação a ssRNA) e parte do PIWI-box (domínio catalítico) de AGO1. Essa interação específica de 2b com AGO1 bloqueia a atividade de *Slicer* (Zhang et al., 2006).

A proteína P0 foi identificada como proteína supressora em ensaio de agroinfiltração, utilizando GFP como gene repórter. P0 possui um efeito prolongado na supressão do silenciamento local, mantendo sua atividade supressora por até 25 dias após a infiltração. Entretanto, não possui nenhum efeito sobre o silenciamento sistêmico (Pfeffer et al., 2002). P0 possui um domínio F-box que é requerido para a atividade de supressão de silenciamento (Pazhouhandeh et al., 2006). Estudos sobre o mecanismo de supressão por P0 identificaram que essa proteína possui a capacidade de interagir com subunidades do complexo SCF (*SKP-Cullin-F-box*), que, por sua vez, faz parte da via de degradação de proteínas por ubiquitinação. Esse complexo interage com o domínio PAZ de AGO1, promovendo sua degradação (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que P0 não interfere com a atividade de *Slicer* em complexos RISC pré-programados com si ou miRNAs contendo AGO1, mas previne a formação de novos complexos. Os autores propõem que P0 previne a montagem do RISC por interação com AGO1, inibindo a formação do RISC “carregado”, o que conseqüentemente leva à degradação de AGO1 via ubiquitinação (Csorba et al., 2010).

Efeito em Vias não Relacionadas à Defesa Antiviral

O silenciamento mediado por RNAi em plantas é um sistema complexo de controle da expressão gênica e de restrição da multiplicação do vírus e transposons, composto por diferentes vias que possuem vários pontos de interseção (Brodersen e Voinnet, 2006). As proteínas supressoras de RNAi codificadas por vírus possuem a capacidade de interferir em diversos pontos da via de silenciamento, permitindo que os vírus estabeleçam com sucesso uma infecção sistêmica no hospedeiro. Devido à existência dos pontos de interseção entre as diferentes vias de RNAi, os supressores virais podem causar perturbações em uma ou mais vias não relacionadas com a defesa antiviral, gerando uma alteração na expressão gênica do hospedeiro. Além desse efeito possivelmente inadvertido, alguns trabalhos demonstraram que a replicação viral também explora vias endógenas de RNAi com o objetivo de redirecionar a expressão gênica do hospedeiro, criando um ambiente mais favorável à replicação viral,

entretanto não pela ação de proteínas supressoras/moduladoras, mas pela ação de si/miRNAs codificados pelo próprio genoma viral (Pfeffer et al., 2004).

As primeiras evidências da interferência pelas PSRs virais nas vias endógenas de RNAi foram obtidas observando-se o fenótipo de plantas de tabaco expressando a proteína supressora viral HC-Pro, ou superexpressando a proteína endógena rgs-CaM, que interage com HC-Pro e também possui propriedade de supressão de RNAi. Tais plantas apresentam pequenos tumores na região do hipocótilo, formados por células corretamente diferenciadas, porém, distribuídas de forma aleatória, sem formar tecidos (Anandalakshmi et al., 2000). Estudos adicionais demonstraram que a expressão de HC-Pro altera o padrão de acúmulo de miRNAs, sugerindo que essa alteração é responsável, pelo menos em parte, pelo fenótipo observado nas plantas transgênicas (Mallory et al., 2002). Além disso, os autores sugeriram que alguns dos sintomas observados em plantas naturalmente infectadas por vírus podem ser consequência de alterações na expressão gênica devido ao efeito de PSRs virais na via dos miRNAs, ou mesmo que os vírus poderiam utilizar a via dos miRNAs para aumentar a expressão de genes necessários para a infecção viral.

Essa hipótese foi reforçada em estudos com o potyvírus *Turnip mosaic virus* (TuMV). Plantas de *Arabidopsis* infectadas naturalmente pelo TuMV apresentam uma série de deficiências em seu desenvolvimento. Esses sintomas foram reproduzidos em plantas transgênicas expressando a proteína P1/HC-Pro do vírus (Kasschau et al., 2003). Os resultados obtidos indicaram que os sintomas são consequência da supressão da RNAi pela proteína P1/HC-Pro. A supressão causou uma diminuição da atividade do miRNA171, responsável pela regulação pós-transcricional de fatores de transcrição da família *Scarecrow* (Llave et al., 2002b). Os efeitos da infecção pelo TuMV são bastante similares ao fenótipo de plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene *Dicer-like 1* (*dcl-1*), incapazes de produzir miRNAs (Golden et al., 2002; Park et al., 2002; Xie et al., 2004). Foi observado também que a concentração do miRNA171 é maior em plantas infectadas ou transgênicas expressando P1/HCPro do que em plantas saudáveis, sugerindo que P1/HC-Pro interfere com a atividade do miRNA, e não com sua produção ou acúmulo (Kasschau et al., 2003). Uma possibilidade seria a inibição da montagem e/ou da atividade do complexo RISC que contém o miRNA. Uma vez que P1/HC-Pro não possui capacidade de ligação a miRNAs, seu modo de atuação na via dos miRNAs possivelmente ocorre via inibição da atividade do RISC. Os autores propõem que a indução dos sintomas do TuMV em *Arabidopsis*, e provavelmente em outros patossistemas, pode ser explicada pelo menos em parte pela interferência nas vias regulatórias controladas por miRNAs (Kasschau et al., 2003).

Perturbações na via dos miRNAs também foram descritas para os supressores p19 do TBSV, p21 do *Beet yellows virus* (BYV, gên. *Closterovirus*) e p69 do *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV, gên. *Tymovirus*). Da mesma forma que em plantas expressando P1/HC-Pro, foram observadas alterações de desenvolvimento nas plantas expressando p19 e p21. Foi demonstrado que os supressores interferem com a clivagem dos mRNAs ARF8, ARF10 e SCL6-IV, mas não no acúmulo dos miRNAs 167, 160 e 171, que direcionam a clivagem destes genes alvo, respectivamente (Llave et al., 2002a; Rhoades et al., 2002; Kasschau et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que p19 e p21 possuem capacidade de ligação aos miRNAs, provavelmente sequestrando o duplex de miRNA após seu processamento por DCL1. Esses resultados sugerem que a inibição está provavelmente associada com a montagem do RISC. Os autores propõem que a interferência na via dos miRNAs é uma propriedade de diversos supressores virais de RNAi, ainda que o modo de ação sobre a via seja diferente, sendo p19

e p21 sequestrando os duplex de miRNAs e P1/HC-Pro por inibição da atividade do complexo RISC (Chapman et al., 2004).

A proteína supressora p69 do TYMV atua em um passo anterior à produção de dsRNA, tendo como alvo provável a atividade da RdRP responsável pela síntese dessa molécula na planta hospedeira (Chen et al., 2004). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* expressando p69 apresentam sintomas semelhantes aos da infecção viral, indicando que a indução de sintomas independe da supressão da RNAi direcionado ao RNA viral. De fato, essas plantas apresentam uma regulação positiva da via dos miRNAs, incluindo níveis elevados de pelo menos sete miRNAs e clivagem mais completa de pelo menos dois mRNAs do hospedeiro, que codificam fatores de transcrição, além de níveis elevados do mRNA que codifica DCL1 (Chen et al., 2004). Portanto, o efeito de p69 na via dos miRNAs é inverso ao de P1/HC-Pro, que, embora também eleve os níveis de diversos miRNAs, leva à clivagem menos eficiente dos mRNAs alvo (Kasschau et al., 2003). No caso de p69, foi proposto que o efeito positivo na via dos miRNAs (clivagem mais eficiente dos mRNAs alvo) seria consequência de um mecanismo de *feedback* negativo mediado por p69, no qual o aumento da expressão de DCL1 levaria a um maior acúmulo de miRNAs (devido ao processamento mais eficiente dos pre-miRNAs), o que em consequência levaria a uma clivagem mais eficiente dos mRNAs alvo. Um corolário dessa hipótese é a conclusão de que miRNAs podem atuar como fatores de patogenicidade em infecções virais, por meio da regulação negativa da expressão de genes do hospedeiro.

Referências Bibliográficas

- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr Junior, J. M., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V. B. 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290:142-144. PMID:11021800. <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5489.142>
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. and Vance, V. B. 1998. A viral supressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13079-13084. PMID:9789044 PMCID:PMC23715. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.22.13079>
- Andersson, M. G., Haasnoot, P. C., Xu, N., Berenjian, S., Berkhout, B. and Akusjarvi, G. 2005. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 79:9556-9565. PMID:16014917 PMCID:PMC1181602. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.15.9556-9565.2005>
- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E. and Baulcombe, D. C. 2007. The polerovirus silencing suppressor P0 targets Argonaute proteins for degradation. *Curr Biol* 17:1609-1614. PMID:17869110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.039>
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y. and Baulcombe, D. C. 2005. Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J* 44:471-482. PMID:16236156. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02539.x>
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P. and Ziegler-Graff, V. 2007. The polerovirus F box protein P0 targets Argonaute1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 17:1615-1621. PMID:17869109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.061>
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. and Baulcombe, D. C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17:6739-6746. PMID:9822616 PMCID:PMC1171019. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.22.6739>
- Brodersen, P. and Voinnet, O. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22:268-280. PMID:16567016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.003>

Cópia gratuita - venda proibida

- Bucher, E., Hemmes, H., De Haan, P., Goldbach, R. and Prins, M. 2004. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* 85:983-991. PMID:15039540. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19734-0>
- Chao, J. A., Lee, J. H., Chapados, B. R., Debler, E. W., Schneemann, A. and Williamson, J. R. 2005. Dual modes of RNA-silencing suppression by *Flock house virus protein B2*. *Nat Struct Mol Biol* 12:952-957. PMID:16228003. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1005>
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V. and Carrington, J. C. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Develop* 18:1179-1186. PMID:15131083 PMCid:PMC415642. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1201204>
- Chen, H. Y., Yang, J., Lin, C. Q. and Adamyuan, Y. 2008. Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus protein 2b*. *EMBO Rep* 9:754-760. PMID:18600235 PMCid:PMC2515203. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2008.118>
- Chen, J., Li, W. X., Xie, D., Peng, J. R. and Ding, S. W. 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 16:1302-1313. PMID:15100397 PMCid:PMC423217. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.018986>
- Csorba, T., Lozsa, R., Hutvagner, G. and Burgyan, J. 2010. Pulerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* 62:463-472. PMID:20128884. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04163.x>
- De Vries, W. and Berkhout, B. 2008. RNAi suppressors encoded by pathogenic human viruses. *Inf J Biochem Cell Biol* 40:2007-2012. PMID:18571459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.04.015>
- Delgado, M. O., Saenz, P., Salvador, B., Garcia, J. A. and Simon-Mateo, C. 2004. Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol* 85:993-999. PMID:15039541. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19735-0>
- Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X. and Ding, S. W. 2007. Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus 2b* protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19:2053-2063. PMID:17586651 PMCid:PMC1955711. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.047449>
- Ding, S. W. and Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130:413-426. PMID:17693253 PMCid:PMC2703654. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039>
- Dougherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S. and Proebsting, W. M. 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant-Microb Interact* 7:544-552. PMID:7949323. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-7-0554>
- Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C. and Voinnet, O. 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16:1235-1250. PMID:15084715 PMCid:PMC423212. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.020719>
- Ebhardt, H. A., Thi, E. P., Wang, M. B. and Unrau, P. J. 2005. Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13398-13403. PMID:16157869 PMCid:PMC1224661. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506597102>
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. and Tuschl, T. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26:199-213. [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00023-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00023-3)
- Elmayan, T. and Vaucheret, H. 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J* 9:787-797. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060787.x>
- English, J. J., Mueller, E. and Baulcombe, D. C. 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8:179-188. PMID:12239381 PMCid:PMC161090.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. and Sablowski, R. 2004. A link between rRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306:1046-1048. PMID:15528448. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1101092>

- Golden, T. A., Schauer, S. E., Lang, J. D., Pien, S., Mushegian, A. R., Grossniklaus, U., Meinke, D. W. and Ray, A. 2002. SHORT INTEGUMENTS1/ SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, is a maternal effect gene required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 30:808-822. PMID:12376646 PMCID:PMC166608. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.003491>
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. and Masuta, C. 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* 48:1050-1060. PMID:17567638. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcm074>
- Guo, H. S. and Ding, S. W. 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21:398-407. PMID:11823432 PMCID:PMC125836. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/21.3.398>
- Gy, I., Gasciolli, V., Lauressergues, D., Morel, J. B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H. and Mallory, A. C. 2008. *Arabidopsis* FIERY1, XRN2 and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *FEBS J* 275:73-73.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21:4671-4679. PMID:12198169 PMCID:PMC125409. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf464>
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952. PMID:10542148. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- Johansen, L. K. and Carrington, J. C. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol* 126:930-938. PMID:11457942 PMCID:PMC1540124. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.126.3.930>
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. and Sarnow, P. 2005. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 309:1577-1581. PMID:16141076. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1113329>
- Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81614-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81614-1)
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. and Carrington, J. C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* 4:205-217. [http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00025-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00025-X)
- Krug, R. M., Yuan, W. M., Noah, D. L. and Latham, A. G. 2003. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: The roles of the viral NS1 protein. *Virology* 309:181-189. [http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00119-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00119-3)
- Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L. K. 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1679-1683. PMID:7878039 PMCID:PMC42583. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.5.1679>
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J. and Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25:2768-2780. PMID:16724105 PMCID:PMC1500863. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601164>
- Lakatos, L., Szittya, G., Silhavy, D. and Burgyan, J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by the p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* 23:876-884. PMID:14976549 PMCID:PMC381004. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600096>
- Lecellier, C. H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saib, A. and Voinnet, O. 2005. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308:557-560. PMID:15845854. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1108784>
- Li, F. and Ding, S. W. 2006. Virus counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60:503-531. PMID:16768647 PMCID:PMC2693410. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142205>
- Li, H., Li, W.X. and Ding, S. W. 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296:1319-1321. PMID:12016316. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1070948>

- Li, W. X. and Ding, S. W. 2001. Viral suppressors of RNA silencing. *Curr Opin Biotechnol* 12:150-154. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00190-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00190-7)
- Li, W. X., Li, H., Lu, R., Li, F., Dus, M., Atkinson, P., Brydon, E. W. A., Johnson, K. L., Sastre, A. G., Ball, L. A., Palese, P. and Ding, S. W. 2004. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1350-1355. PMID:14745017 PMCID:PMC337056. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308308100>
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. and Dougherty, W. G. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5:1749-1759. PMID:12271055 PMCID:PMC160401.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurrealde, E. and Sattler, M. 2005. The structure of the *Flock house virus* B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep* 6:1149-1155. PMID:16270100 PMCID:PMC1369214. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400583>
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A. and Carrington, J. C. 2002a. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14:1605-1619. PMID:12119378 PMCID:PMC150710. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.003210>
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. 2002b. Cleavage of *Scarecrow*-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 297:2053-2056. PMID:12242443. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1076311>
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X. and Ding, S. W. 2005. Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436:1040-1043. PMID:16107851 PMCID:PMC1388260. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03870>
- Lu, S. and Cullen, B. R. 2004. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol* 78:12868-12876. PMID:15542639 PMCID:PMC524998. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.23.12868-12876.2004>
- Mallory, A. C., Reinhart, B.J., Bartel, D., Vance, V. B. and Bowman, L. H. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and microRNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15228-15233. PMID:12403829 PMCID:PMC137572. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.232434999>
- Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T. H., Pruss, G. J. and Vance, V. B. 2000. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* 43:295-306. PMID:10999412. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006456000564>
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. and Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80:5747-5756. PMID:16731914 PMCID:PMC1472586. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01963-05>
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y. and Voinnet, O. 2008. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321:964-967. PMID:18703740 PMCID:PMC2570098. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159505>
- Obbard, D. J., Gordon, K. H. J., Buck, A. H. and Jiggins, F. M. 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil Trans R Soc B* 364:99-115. PMID:18926973 PMCID:PMC2592633. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>
- Papp, I., Mette, M. F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S. E., Ray, A., Van Der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A. J. 2003. Evidence for nuclear processing of plant microRNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol* 132:1382-1390. PMID:12857820 PMCID:PMC167078. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.021980>
- Park, J. W., Faure-Rabasse, S., Robinson, M. A., Desvoyes, B. and Scholthof, H. B. 2004. The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology* 323:49-58. PMID:15165818. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.02.008>
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. 2002. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12:1484-1495. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01017-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01017-5)

- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K. E., Genschik, P. and Ziegler-Graff, V. 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1994-1999. PMID:16446454 PMCID:PMC1413668. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510784103>
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. and Ziegler-Graff, V. 2002. P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 76:6815-6824. PMID:12050394 PMCID:PMC136274. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.13.6815-6824.2002>
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304:734-736. PMID:15118162. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1096781>
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J.C., Vance, V. B., Ge, X. and Shi, X. M. 1997. Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9:859-868. PMID:9212462 PMCID:PMC156963. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.9.6.859>
- Qiu, W., Park, J.-W. and Scholthof, H. B. 2002. Tombusvirus p19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant-Microb Interact* 15:269-280. PMID:11952130. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.269>
- Ratcliff, F. G., Macfarlane, S. A. and Baulcombe, D. C. 1999. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11:1207-1215. PMID:10402423 PMCID:PMC144281.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B.J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. and Bartel, D. P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-520. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00863-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00863-2)
- Roth, B. M., Pruss, G. J. and Vance, V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 102:97-108. PMID:15068885. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.020>
- Ruiz, M. T., Voinnet, O. and Baulcombe, D. C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10:937-946. PMID:9634582 PMCID:PMC144041.
- Sarmiento, C., Nigul, L., Kazantseva, J., Buschmann, M. and Truve, E. 2006. ATRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. *Plant Mol Biol* 61:153-163. PMID:16786298. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-005-0001-8>
- Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L. and Baulcombe, D. C. 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* 138:1842-1852. PMID:16040651 PMCID:PMC1183376. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.063537>
- Segers, G. C., Van Wezel, R., Zhang, X. M., Hong, Y. G. and Nuss, D. L. 2006. Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryotic Cell* 5:896-904. PMID:16757737 PMCID:PMC1489278. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00373-05>
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyan, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 21:3070-3080. PMID:12065420 PMCID:PMC125389. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf312>
- Sullivan, C. S. and Ganem, D. 2005. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* 79:7371-7379. PMID:15919892 PMCID:PMC1143619. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.79.12.7371-7379.2005>
- Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M. and Ganem, D. 2005. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435:682-686. PMID:15931223. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03576>
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Banfalvi, Z. and Burgyan, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J* 22:633-640. PMID:12554663 PMCID:PMC140757. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg74>

- Tijsterman, M., Ketting, R. F. and Plasterk, R. H. 2002. The genetics of RNA silencing. *Ann Ver Genet* 36:489-519. PMID:12429701. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.36.043002.091619>
- Vargason, J. M., Szittyá, G., Burgyan, J. and Hall, T. M.T. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115:799-811. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00984-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00984-X)
- Voinnet, O., Lederer, C. and Baulcombe, D. C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103:157-167. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00095-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00095-7)
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. and Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14147-14152. PMID:10570213 PMCID:PMC24205. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.24.14147>
- Wang, W., Riedel, K., Lynch, P., Chien, C. Y., Montelione, G. T. and Krug, R. M. 1999. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* 5:195-205. PMID:10024172 PMCID:PMC1369752. <http://dx.doi.org/10.1017/S1355838299981621>
- Wang, X. H., Aliyari, R., Li, W. X., Li, H. W., Kim, K., Carthew, R. W., Atkinson, P. and Ding, S. W. 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in *Drosophila*. *Science* 312:452-454. PMID:16556799 PMCID:PMC1509097. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1125694>
- Wilkins, C., Dishongh, R., Moore, S. C., Whitt, M. A., Chow, M. and Machaca, K. 2005. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436.
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E. and Carrington, J. C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2:E104. PMID:15024409 PMCID:PMC350667. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020104>
- Ye, K., Malinina, L. and Patel, D. J. 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426:874-878. PMID:14661029. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02213>
- Zhang, X. R., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J. and Chua, N. H. 2006. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Develop* 20:3255-3268. PMID:17158744 PMCID:PMC1686603. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1495506>

RNA Activation e Outros Efeitos Mediados por dsRNAs

Capítulo
13

Prof. Dr. Fabio TS Nogueira¹, Ms. Cristiane S Alves¹, Prof. Dr. Paulo C Ferreira²

¹Depto. de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP

²Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Um Surpreendente Papel dos Pequenos RNAs de Fita Dupla na Ativação Gênica

Como foi visto nos capítulos anteriores, RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, iniciado pela produção de pequenos duplexes de RNAs (siRNAs) de 21-28 nucleotídeos (nt) a partir de longas moléculas de RNA de dupla fita (dsRNAs). Tais pequenos RNAs são incorporados no complexo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) e guiam a clivagem de moléculas de RNA complementares ou RNAs alvos (Hannon, 2002). Além da regulação pós-transcricional, os RNAs de interferência estão também envolvidos em processo de silenciamento transcricional via metilação do DNA nuclear em plantas (Hamilton et al., 2002), *Schizosaccharomyces pombe* (Volpe et al., 2002), *Drosophila melanogaster* (Pal-Bhadra et al., 2004) e em mamíferos (Morris et al., 2004). Ademais, em protozoários ciliados, como o *Tetrahymena thermophila*, dsRNAs são capazes de atuar como guias na deleção de sequências genômicas específicas, que podem variar de centenas até 20.000 pares de bases, durante a conjugação destes organismos. O mecanismo como estes dsRNAs atuam permanece desconhecido. Estudos com estes organismos demonstraram que dsRNAs também são capazes de deletar DNA exógeno, funcionando como um “serviço de vigilância” celular (Yao et al., 2003).

Existem, entretanto, alguns casos em que RNAs pequenos atuam positivamente na regulação da expressão de genes alvos. Há pouco mais de quatro décadas, R.J. Britten e E.H. Davidson (1969) propuseram a teoria de que os então denominados “RNAs ativadores” - transcritos de regiões redundantes e não codificadoras do genoma - seriam capazes de ativar a expressão de vários genes codificadores de proteínas. Segundo os autores, os “RNAs ativadores” seriam complementares a regiões regulatórias de alguns genes, de modo que RNAs de fita única formariam

um complexo com a fita dupla de DNA. Esse complexo seria responsável pela regulação transcricional de genes alvos. Embora na época tal teoria não tenha sido formalmente testada, recentemente, alguns trabalhos apontam para a intrigante possibilidade de dsRNAs estarem envolvidos em mecanismos de ativação da expressão gênica. Tal mecanismo é denominado *double-strand RNA (dsRNA)-induced gene activation, RNA activation* ou simplesmente RNAa (Rossi, 2007). Esse mecanismo foi demonstrado pelo uso de RNAs sintéticos de 19-21 nt que formam duplexes e são complementares a regiões específicas de promotores de genes humanos. Tais duplexes sintéticos são coletivamente denominados *small activating RNAs* (saRNAs) ou *antigene RNAs* (agRNAs), para diferenciar de dsRNAs pequenos que atuam no mecanismo de RNAi (siRNAs). Para padronização de nomenclatura, esse capítulo tratará esses duplexes de RNA coletivamente como saRNAs. O reconhecimento de sequências de promotores pelos saRNAs é capaz de aumentar os níveis de expressão de genes específicos em até vinte vezes em células de mamíferos (Li et al., 2006; Janowski et al., 2007; Schwartz et al., 2008).

A descoberta de que pequenos duplexes, similares a siRNAs, são capazes de ativar a expressão gênica indica que devem existir diferenças nos mecanismos de silenciamento e ativação gênica. Ambos os grupos de pesquisa, que identificaram o fenômeno de RNAa, estavam inicialmente estudando mecanismos de silenciamento transcricional mediado por siRNAs. Li et al. (2006) delinearão experimentos nos quais duplexes de RNA eram complementares a regiões ricas em CpG de promotores específicos. Trabalhos anteriores demonstraram, de maneira convincente, que duplexes induzem o silenciamento transcricional quando complementares a regiões de promotores ricas em CpG via indução de modificações pós-traducionais em histonas ou no nível de metilação do DNA cromossômico (Morris et al., 2004; Ting et al., 2005). De fato, Li et al. (2006) obtiveram níveis de silenciamento transcricional dos genes *E-cadherin*, *p21* e *VEGF* semelhantes aos encontrados por outros grupos de pesquisa. Entretanto, quando os autores transfectaram células humanas com saRNAs complementares a regiões distintas nos mesmos promotores, isto é, regiões possuindo baixo conteúdo de GC e ausência de sequências invertidas e/ou repetidas, eles observaram resposta completamente diferente: ativação da expressão gênica. O aumento no acúmulo de transcritos e de proteína dos genes alvos foi associado à presença desses saRNAs. Além disso, as células transfectadas apresentaram algumas alterações fenotípicas, provavelmente devido ao aumento de expressão dos genes alvos. Baseados nessas observações, os autores concluíram que saRNAs são capazes de induzir a expressão gênica via sua complementaridade com sequências de promotores.

Janowski et al. (2007) chegaram à mesma conclusão, avaliando a ação de duplexes de RNAs complementares a outros promotores. Neste caso, a sequência alvo foi a do promotor do gene *progesterone receptor (PR)*. Os autores observaram alterações na resposta fisiológica de células transfectadas com os duplexes devido ao aumento na expressão do gene *PR*.

Uma observação importante feita pelos dois grupos foi que a ativação gênica via saRNAs não ocorre ao acaso, mas sim é determinada por tipos celulares específicos e pela regulação epigenética do próprio gene alvo. Li et al. (2006), por exemplo, detectaram aumento nos níveis de transcritos e de proteína do gene *E-cadherin* em células de câncer de próstata (PC-3 e DU-145) após transfecção com saRNAs. Tal efeito não foi observado em células HeLa, nas quais o promotor do gene em questão é altamente metilado em sequências CpG. Observações desse trabalho indicam que o nível de metilação do promotor do gene alvo determina a eficiência de ativação da expressão via saRNAs. Janowski et al. (2007) relatam que a variação nos níveis basais de expressão do gene *PR* em distintas células de câncer de mama, determina a eficiência de ativação via saRNAs. Em células expressando

altos níveis de *PR*, a ativação foi ineficiente, enquanto que células expressando níveis basais do gene *PR* apresentaram aumentos expressivos no acúmulo de transcritos e de proteína *PR*. Portanto, os dados desses dois trabalhos indicam que RNAa pode ser um mecanismo geral para controlar a expressão de genes específicos em determinados tipos e condições celulares, gerando respostas metabólicas e fenotípicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de cânceres.

A partir de sua descoberta, várias perguntas emergiram em relação ao fenômeno de regulação gênica via RNAa: a primeira pergunta que surge é referente ao mecanismo molecular implicado no processo de ativação gênica, visto que saRNAs modificados são também capazes de induzir o silenciamento de genes alvos (Janowski et al., 2007). A ativação ou silenciamento gênico são determinados pela especificidade de sequência entre os saRNAs e seus promotores alvos (Rossi, 2007). Uma única alteração de base nucleotídica é suficiente para ativação ou repressão transcricional (Janowski et al., 2007). Concomitantemente, os mesmos autores avaliaram várias regiões alvos na sequência do promotor do gene *PR* e testaram diferentes tipos de saRNAs para ativação ou silenciamento gênico. Os resultados de tais experimentos falharam em apontar um consenso de sequência de DNA que diferencie a ativação de silenciamento. Além disso, a mesma análise realizada em outros promotores demonstrou que não há um aparente consenso na região do promotor em que a ativação ou silenciamento é mais eficiente. Por exemplo, o saRNA mais eficiente para a ativação do gene *PR* é complementar à região -11 a +8, enquanto que, para o gene *major vault protein*, o saRNA mais eficiente na ativação é complementar à região -54 a -36 de seu promotor. Tais resultados indicam que são necessários dados experimentais adicionais para esclarecer qual(is) mecanismo(s) molecular(es) é(são) responsável(is) pela distinção da ação de saRNAs como ativadores ou repressores da expressão gênica. Entretanto, uma pista inicial é que saRNAs direcionados a regiões do genoma propensas a metilação (por exemplo, regiões ricas em sequências CpG) irão provavelmente atuar como repressores ao invés de ativadores da expressão de genes alvos, pelo menos no caso do gene *E-cadherin* (Li et al., 2006).

Além de induzir o silenciamento, saRNAs que diferem em poucas bases podem ser mais ou menos eficientes ativadores da expressão de genes alvos, resultado semelhante ao observado para siRNAs (Janowski et al., 2007). Tanto os saRNAs perfeitamente complementares à sequência alvo quanto os com poucos “*mismatches*” são capazes de reconhecer a mesma sequência em questão. Portanto, eles competem entre si por sítios de reconhecimento nos promotores, e essa competição afeta o grau de ativação do gene alvo. Esta observação sugere que a geometria de reconhecimento da sequência alvo é um fator crucial para uma eficiente ativação da expressão gênica.

Outra pergunta importante em relação ao mecanismo de RNAa *versus* RNAi é qual ou quais proteínas participam da ativação gênica utilizando duplexes de RNA. Estudo prévio de silenciamento gênico em mamíferos utilizando duplexes demonstrou o envolvimento das proteínas da família Argonauta, Ago1 e Ago2, as quais são componentes essenciais do mecanismo de RNAi (Janowski et al., 2006). Até o momento, não há um consenso de qual proteína argonauta participa no mecanismo de RNAa, embora células com baixa produção da proteína Ago2 pareçam ser incapazes de induzir a ativação gênica via saRNAs (Li et al., 2006). As proteínas Argonautas utilizam pequenos RNAs regulatórios, tais como siRNAs e microRNAs, como guias para o reconhecimento de RNAs mensageiros (mRNAs) alvos. Tal reconhecimento induz a clivagem do mRNA alvo ou repressão da tradução durante o silenciamento gênico via RNAi (Meister et al., 2004). O envolvimento de proteínas argonautas

Cópia gratuita - venda proibida

na atividade de saRNAs sugere que esses dsRNAs têm o potencial de ligar-se a moléculas de RNA, ou seja, os saRNAs guiam o complexo *RISC* para o RNA alvo.

De fato, um trabalho recente demonstra que transcritos antissenso podem ser os alvos primários de saRNAs (Schwartz et al., 2008), pelo menos no caso do gene *PR*. Os autores identificaram transcritos de RNA antissenso que são complementares à região promotora do gene *PR*. Tais RNAs são transcritos na orientação antissenso a partir de exons do gene *PR*, incluindo parte de sua região promotora na qual está contida sequência de reconhecimento dos saRNAs. Os transcritos acumulam-se em níveis elevados em células humanas específicas e não são alvos de clivagem via saRNAs. Entretanto, células contendo níveis baixos desses transcritos antissenso são menos eficientes ou mesmo incapazes de ativar a expressão do gene *PR* via saRNAs, sugerindo que a atividade dos saRNAs na ativação gênica é dependente de RNAs antissenso. Schwartz e colaboradores (2008) demonstraram que saRNAs ligam-se aos transcritos antissenso e recrutam proteínas argonautas para formar o complexo saRNA-RNA antissenso proteína argonauta. Tal complexo atua como um *scaffold*, recrutando ou redirecionando outras proteínas, tais como a *heterochromatin protein1* (HP1) e a *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-k* (hnRNP-k) (Yahi et al., 2008; Venables et al., 2008). Tanto HP1 quanto hnRNP-k são fatores essenciais para a interação DNA e RNA. Um possível modelo do mecanismo de RNAa (proposto por Schwartz et al., 2008) é ilustrado na Figura 1.

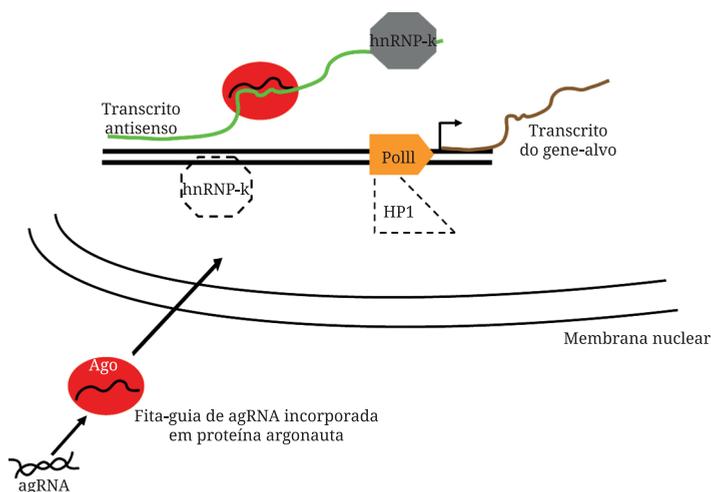


Figura 1. Modelo esquemático do possível mecanismo de ativação gênica via saRNAs. Linhas cheias e tracejadas representam fatores que se associam e desassociam, respectivamente, com a sequência do promotor do gene alvo após transfecção com saRNAs. Os saRNAs recrutam proteína Argonauta para o transcritor antissenso e isto induz a realocização da proteína heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-k (hnRNP-k) do promotor para o transcritor antissenso. O complexo saRNA-transcritor antissenso-proteína forma-se nas proximidades do promotor do gene alvo e afeta o balanço da regulação gênica. Ago, Argonauta; HP1, heterochromatin protein1; PolII, RNA polimerase II.

Embora o modelo descrito anteriormente seja o mais recentemente proposto, o exato mecanismo molecular que utiliza saRNAs para ativação gênica ainda necessita de mais

esclarecimentos. É possível que tal mecanismo seja específico de determinados promotores ou de determinados tipos celulares. Além disso, fatores adicionais podem desempenhar importante papel na ativação de genes alvos via o mecanismo de RNAa. Li et al. (2006) demonstraram que a ativação do gene *E-cadherin* em células de câncer de próstata (PC-3), utilizando saRNAs, ocorre devido a uma redução no padrão de metilação da proteína histona 3 (H3). Altos níveis de metilação de H3 reprimem a expressão de vários genes nesses tipos celulares, incluindo o *E-cadherin* (Shi et al., 2003). Novamente, experimentos adicionais, avaliando a ativação de outros genes com saRNAs distintos, são necessários para um melhor entendimento do mecanismo de RNAa.

Embora comprovado experimentalmente, o fenômeno de RNAa, tal como discutido anteriormente, não foi ainda identificado para duplexes de RNA endógenos. Contudo, Kuwabara et al. (2004) relataram a identificação de um pequeno duplex (21 nt) que possui sequência antissenso complementar ao elemento em *cis* NRSE, o qual está presente em promotores de genes especificamente ativos em neurônios. Esse elemento em *cis* é reconhecido pela proteína NRSF/REST que mantém tais genes desligados durante a manutenção do estado não diferenciado de células pré-neuronais. Esse desligamento depende da capacidade de NRSF/REST ligar-se ao elemento NRSE (Lunyak e Rosenfeld, 2005). O dsRNA antissenso ao elemento NRSE, produzido a partir de molécula precursora de RNA não codificante (~20-40 nt), interage com a proteína NRSF/REST sem afetar sua ligação com o elemento em *cis*, ou seja, a proteína repressora mantém-se associada aos promotores dos genes alvos. Entretanto, a formação do complexo dsRNA-proteína NRSF/REST funciona como ativador da expressão gênica (Figura 2). Em outras palavras, a presença do duplex libera genes específicos de seu estado de repressão gênica, gerado, inicialmente, pela ligação do repressor transcrricional NRSF/REST na sequência NRSE de regiões promotoras. Embora o mecanismo ainda seja desconhecido, os autores sugerem que esse *switch* na regulação da expressão gênica em células pré-neuronais induz sua maturação final em neurônios (Figura 2). Portanto, RNAs de dupla fita endógenos podem funcionar como ativadores da expressão gênica, desempenhando papéis-chave na diferenciação celular, o que pode implicá-los também na formação de células tumorais.

De forma similar ao uso de siRNAs no mecanismo de RNAi, células utilizam microRNAs (miRNAs) para regular a expressão gênica endógena via repressão da tradução e/ou clivagem de mRNA alvo complementar (Flynt e Lai, 2008). Recentemente, Place e colaboradores (2008) relataram um caso em que miRNAs podem funcionar também como ativadores da expressão gênica, tal como os saRNAs. Buscas computacionais de sequências complementares a miRNAs no genoma humano relevaram a complementaridade do microRNA miR-373 à sequência dos promotores dos genes *E-cadherin* e *CSDC2*. O mesmo grupo já havia demonstrado que saRNAs complementares ao promotor do gene *E-cadherin* são capazes de induzir sua expressão em células tumorais (Li et al., 2006).

A biossíntese de miRNAs é iniciada pela transcrição dos genes *MIR* via RNA PolIII. O transcrito primário, ou pri-miRNA, é um RNA longo de fita simples e poliadenilado que forma estrutura secundária do tipo *hairpin*. O pri-miRNA é processado via a ação de diferentes enzimas, produzindo o precursor pre-miRNA. O pre-miRNA é processado novamente, gerando um “duplex” imperfeito de RNA (20-22 nt) que contém tanto o miRNA maduro quanto sua fita complementar (denominado miRNA*). O miRNA maduro é posteriormente incorporado ao complexo proteico RISC (tal como os siRNAs) e guia a clivagem de mRNAs complementares ou promove a repressão da tradução de genes alvos (Flynt e Lai, 2008).

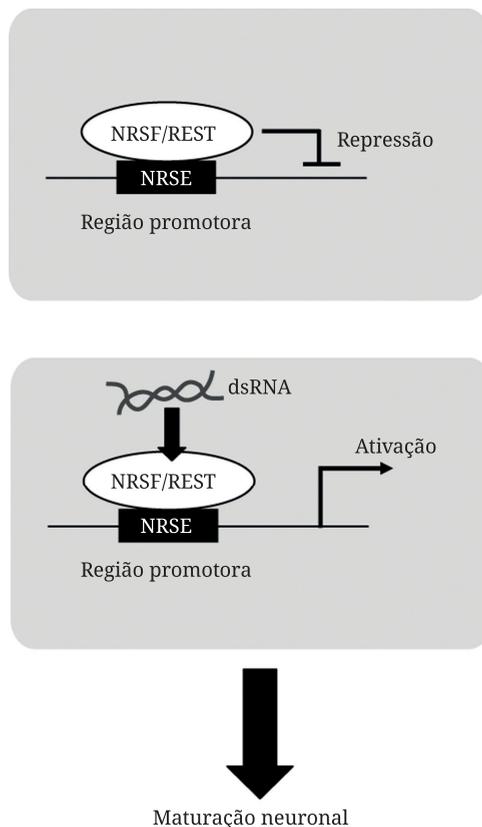


Figura 2. Representação esquemática de ativação da expressão gênica via dsRNAs complementares ao elemento em cis NRSE. Complexo proteico contendo proteína NRSF/REST liga-se ao elemento em cis NRSE, reprimindo a expressão de genes específicos de neurônios. Em determinadas condições fisiológicas e estágio de desenvolvimento, células pré-neuronais produzem dsRNAs que ligam-se ao complexo proteico NRSF/REST, ativando os mesmos genes e induzindo a maturação neuronal.

A possibilidade de que miRNAs também funcionem como ativadores transcricionais foi primeiramente cogitada com base em dados de complementaridade entre os saRNAs e suas sequências alvos. Os saRNAs com poucos *mismatches* são ainda capazes de ativar a expressão gênica (Li et al., 2006). O não pareamento de algumas bases entre a sequência do miRNA maduro e seu alvo é comum e tolerável durante o silenciamento gênico mediado por esses RNAs regulatórios (Faller e Guo, 2008), o que sugere que miRNAs podem apresentar *mismatches* em relação à sequência promotora alvo e ainda assim serem funcionais. Desta forma, Place et al. (2008) transfectaram células de câncer de próstata (PC-3) tanto com o miR-373 maduro quanto com o pre-miR-373, os quais possuem região de complementaridade com alguns *mismatches* em relação à sequência dos promotores dos genes *E-cadherin* e *CSDC2*. Os autores demonstraram que a expressão desses genes foi induzida por transfecção de células com microRNA miR-373. Tal indução foi específica e dependente do nível de complementaridade entre o microRNA e a sequência alvo dos promotores em questão.

Além disso, tal como observado para os saRNAs, a eficiência de indução gênica via miRNAs também é dependente de fatores epigenéticos (metilação, etc.) que interferem na atividade do promotor.

Apesar de demonstrarem incontestavelmente que células transfectadas com o miR-373 induzem a expressão gênica, os autores não conseguiram demonstrar que o miR-373 endógeno é capaz de funcionar da mesma maneira. É possível que a atividade endógena de ativação gênica via miRNAs seja específica de tipos celulares ou estágios de desenvolvimento celular não testados pelos autores. Tal hipótese é embasada pela recente descoberta de que miRNAs podem ativar não somente a expressão gênica, mas também a tradução de proteínas (Vasudevan et al., 2007). Sequências em tandem AUUUA, denominadas elementos AREs, estão presentes na região 3' não traduzida de alguns mRNAs. Os elementos AREs são sítios de ligação para as proteínas Ago2 e *fragile X mental retardation-related protein 1* (FXR1). Tal associação leva ao aumento da tradução de proteínas de genes específicos. Como Ago2 está associada a microRNAs, Vasudevan et al. (2007) investigaram a possibilidade de o aumento na tradução ser devido à presença de miRNAs. De fato, os autores identificaram miRNAs complementares aos elementos AREs. Interessantemente, esses miRNAs podem mediar a ativação ou repressão da tradução, dependendo do estágio de divisão em que as células se encontram durante o ciclo celular. Em células no estágio de proliferação, complexo contendo Ago2 e microrribonucleoproteínas é recrutado por miRNAs para o mRNA alvo, reprimindo a tradução de proteínas. Contudo, após o bloqueio do ciclo celular, esse complexo, juntamente com a proteína FXR1, associa-se ao mRNA alvo promovendo a tradução de proteínas e, portanto, induzindo a ativação de genes alvos. Tal associação do complexo proteico ao mRNA alvo é também mediada por miRNAs, indicando um papel duplo dos miRNAs no controle da tradução de proteínas. Interessantemente, o papel de ativador gênico parece ser desempenhado por miRNAs bem documentados na literatura, embora essa faceta de sua ação tenha sido notada somente recentemente. Por exemplo, o microRNA Let-7, conhecido por reprimir a tradução de seus alvos em células animais (Roush e Slack, 2008), pode também ativá-la, dependendo do estágio de desenvolvimento celular (Vasudevan et al., 2007). Essa descoberta, juntamente com a indução da expressão gênica, imediatamente sugere que fatores específicos do desenvolvimento celular regulam a ação de miRNAs como ativadores ou repressores da atividade gênica. Quais seriam e como agem esses reguladores estão entre as intrigantes perguntas biológicas a serem respondidas pela ciência em futuro próximo. A ativação de certos genes via microRNAs, tanto transcricional como traducionalmente, revela uma complexa e fundamental importância desses pequenos RNAs como reguladores endógenos da expressão gênica.

Os resultados discutidos nos parágrafos anteriores indicam claramente uma nova via de ação de pequenos duplexes de RNA na regulação gênica de eucariotos. Não apenas repressores da expressão gênica, os duplexes de RNA (incluindo miRNAs) possuem também papel relevante na ativação de genes em determinados tipos celulares e condições fisiológicas. Essa descoberta possui implicações claras no uso de RNAi e RNAa como ferramentas da regulação da expressão gênica. Ambas as técnicas vêm sendo propostas como possíveis modalidades terapêuticas para o tratamento de doenças específicas, incluindo alguns tipos de cânceres (Janowski et al., 2007). Um passo inicial nessa direção foi iniciado com os trabalhos de Mao et al. (2008) e Yang et al. (2008). Os dois trabalhos demonstraram que a ativação de genes associados ao câncer de bexiga, via saRNAs, reduziu a proliferação e viabilidade das células tumorais. Tais genes, quando ativados, induzem uma cascata de eventos que culmina na repressão de fatores importantes para o desenvolvimento de células tumorais.

Contudo, todos os experimentos utilizando RNAa, até o momento, foram realizados em culturas celulares. Portanto, os eventos de ativação gênica descritos foram essencialmente transientes (Li et al., 2006; Janowski et al., 2007; Schwartz et al., 2008; Place et al., 2008; Yang et al., 2008; Mao et al., 2008). Com o intuito de continuar as pesquisas nesta intrigante área, além de células humanas, também já foram realizados testes em células de chimpanzé (WES) e macaco verde africano (COS1). Estes animais foram escolhidos por possuírem um genoma quase idêntico ao nosso e já serem utilizados para testes no desenvolvimento de novos fármacos. A ativação de genes como *E-cadherin*, *p21*, *VEGF*, *p53*, entre outros, potencialmente envolvidos no tratamento de cânceres, foi desencadeada nas células WES e COS1, pela introdução de moléculas de saRNA humanas. Este resultado abre espaço para a validação de novas drogas baseadas em RNAa em outros organismos que não humanos (Huang et al., 2010). O próximo passo é analisar esse mecanismo de regulação gênica do organismo e avaliar se a indução de expressão de genes específicos também ocorre nessas condições. Somente após este importante passo, ampliaremos nosso conhecimento de modo a utilizar a ferramenta de RNAa da maneira mais eficiente e segura possível. Entretanto, podemos já vislumbrar um futuro (possivelmente próximo) no qual será possível combinar RNAi e RNAa de modo a silenciar e ativar genes simultaneamente com propósitos terapêuticos. De fato, a empresa *Alnylam Pharmaceuticals* nos EUA, uma das líderes mundiais no uso de RNAi como modalidade terapêutica, anunciou, em agosto de 2008, que irá investir no uso de RNAa em terapias genéticas em futuro próximo. Por exemplo, o mecanismo de RNAa pode ser utilizado para reativar genes supressores de tumores, os quais estão normalmente silenciados em células tumorais (Zhao and Epstein, 2008). Os estudos com células tumorais já tiveram algum avanço em testes utilizando a tecnologia de ativação por RNA. Na China, pesquisadores conseguiram inibir o crescimento de células cancerígenas com a ativação do *p21*, que modula negativamente a progressão do ciclo celular, via saRNA, e ainda aumentar a sensibilidade das células tumorais a drogas utilizadas em tratamentos quimioterápicos (Wei et al., 2010). Não apenas o tratamento de alguns tipos de câncer pode ser beneficiado pelos avanços tecnológicos desta crescente área, como também outros problemas de saúde. Um exemplo envolve o gene *VEGF* (fator de crescimento vascular), cuja ativação em células primárias musculares esponjosas do corpo cavernoso humano foi demonstrada recentemente. Esta resposta positiva abre portas para um possível medicamento para casos de disfunção erétil (Chen et al., 2011).

A manipulação de células para indução de pluripotência sempre foi um enorme desafio para a ciência moderna. Agora, o sonho de manipular o destino celular está cada vez mais próximo de se tornar realidade. Com a recente descoberta de que um importante fator de transcrição – *NANOG*, o qual tem participação crítica na regulação do destino da célula – é superexpresso na presença de saRNA, ilumina-se o caminho para a ativação de genes relacionados com o desenvolvimento e a manipulação do destino celular (Wang et al., 2012).

Silenciamento Transcricional: dsRNAs Atuando no DNA

Na seção anterior, foi discutido sobre o papel de pequenos dsRNAs na ativação e no silenciamento pós-transcricional de genes específicos, formando o “Yin e Yang” da regulação da expressão gênica em eucariotos. Como a ativação gênica via dsRNAs (RNAa) foi abordada anteriormente, esta seção será dedicada a discutir mais detalhadamente os mecanismos envolvidos no silenciamento transcricional mediado por dsRNAs.

O silenciamento transcricional dependente de dsRNAs foi primeiramente documentado em plantas infectadas por viroides (Wassenegger et al., 1994) e pode envolver tanto a metilação de sequências específicas de DNA (*RNA-dependent DNA methylation* ou RdDM) quanto modificações na cromatina. Em plantas, pequenos dsRNAs ou siRNAs (24-26 nt) recrutam DNA metiltransferases (DMTases) e proteínas modificadoras de cromatina (*e.g.*, histona deacetilases) para a metilação *de novo* de regiões do genoma, principalmente regiões ricas em sequências CG, CNG e CNN (Figura 3; Kawasaki et al., 2005).

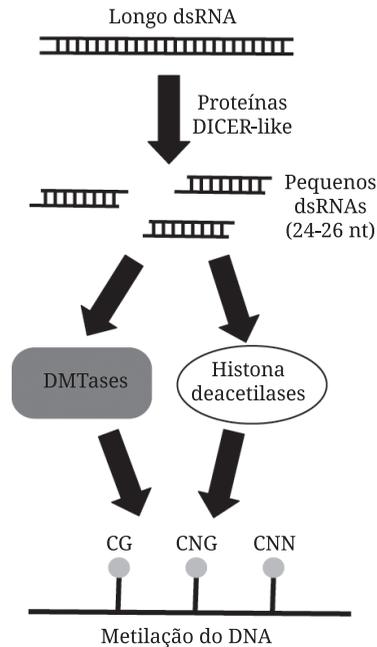


Figura 3. Metilação de DNA mediada por dsRNAs em plantas. Longos dsRNAs são processados por proteínas DICER-like em dsRNAs de 24-26 nt. Esses dsRNAs são incorporados no complexo contendo proteína Argonauta, recrutando DNA metiltransferases (DMTases) e proteínas modificadoras de cromatina (histona deacetilases) para a metilação *de novo* de regiões do genoma ricas em sequências CG, CNG e CNN.

Os dsRNAs são utilizados por complexos proteicos como guias para identificar genes alvos exógenos ou endógenos e induzir o silenciamento transcricional. No caso de plantas, tanto viroides quanto transgenes são utilizados como substratos para gerar siRNAs, que guiam a metilação da base citosina em sequências homólogas no genoma vegetal (Henderson e Jacobsen, 2007), funcionando como um mecanismo de defesa contra agentes exógenos. Os principais alvos endógenos para o silenciamento transcricional dependente de dsRNAs são os transposons (Girard e Hannon, 2008). Transposons são ácidos nucleicos parasitas

capazes de mover-se e propagar-se no genoma hospedeiro, alterando a expressão gênica (Kazazian Junior, 2004). A movimentação e propagação desordenadas de transposons podem levar à disrupção de genes importantes, além de causar rearranjos cromossômicos, gerando, muitas vezes, mutações deletérias no organismo hospedeiro. Por isso, o genoma de vários organismos eucarióticos utiliza siRNAs como defesa contra transposons, ou seja, esses pequenos dsRNAs participam de mecanismos de supressão de transposons. Tais mecanismos variam nos detalhes de organismo para organismo, mas, em geral, as etapas são conservadas.

No caso de silenciamento transcricional de transposons, três etapas são essencialmente constantes em todos os organismos estudados: (1) detecção de *loci* de transposons via produção de transcritos que são reconhecidos como substratos pela maquinaria de RNAi; (2) produção de pequenos RNAs (amplificação); e (3) incorporação de pequenos RNAs em complexo proteico e posterior recrutamento de DMTases e proteínas modificadoras de cromatina para metilação de DNA e formação de heterocromatina (Girard e Hannon, 2008).

Em plantas e leveduras, a etapa de reconhecimento pode iniciar-se pela transcrição de sequências invertidas de transposons, o que leva à formação de fitas duplas de RNA. Tais transcritos tornam-se substratos para a geração de siRNAs por meio da ação de proteínas DICER-like (Figura 3; Slotkin e Martienssen, 2007). Em animais, a etapa de reconhecimento é menos conhecida, visto que envolve uma classe de pequenos RNAs identificada somente recentemente, os *Piwi-interacting RNAs* (piRNAs; Girard e Hannon, 2008). Os piRNAs são pequenos RNAs de 24-30 nucleotídeos que associam-se especificamente com proteínas denominadas *Piwi*, as quais compartilham domínios conservados com as proteínas Argonautas (Girard et al., 2006). Diferentemente de siRNAs, piRNAs são produzidos a partir de precursores de RNA de fita simples policistrônicos, os quais são transcritos de *loci* formados por *clusters* desses pequenos RNAs. Tais precursores são posteriormente processados em piRNAs por meio de mecanismo ainda não elucidado (Girard e Hannon, 2008). Interessantemente, alguns transposons estão contidos nesses *clusters* como sequências invertidas (Figura 4a). Portanto, após seu processamento, os transcritos policistrônicos geram piRNAs complementares à sequência do *locus* de origem e geram também pequenos RNAs complementares às sequências invertidas dos transposons (Figura 4b; Brennecke et al., 2007).

Embora o mecanismo de geração de piRNAs primários ainda não esteja esclarecido, estes são utilizados para clivar mais precursores de piRNAs, via *Piwi*, aumentando conseqüentemente o número final de piRNAs (piRNAs secundários). No caso de plantas e leveduras, os siRNAs primários incorporados na proteína Argonauta clivam outros transcritos de transposons com sequências conservadas, gerando os siRNAs secundários (Figura 4b; Sugiyama et al., 2005). A etapa de amplificação mantém o sistema constantemente alimentado de piRNAs e siRNAs, garantindo a eficiência do silenciamento.

Na etapa de repressão transcricional, o complexo proteico contendo *Piwi* e piRNAs recruta DMTases para metilar a sequência de DNA correspondente aos transposons alvos (Figura 4c). Em plantas e leveduras, o complexo proteico contendo Argonauta e siRNAs recruta tanto DMTases quanto histona deacetilases para metilação de DNA e formação de heterocromatina, respectivamente (Figura 3 e 4c). Tais modificações epigenéticas impedem a transcrição dos transposons, inibindo sua atividade no genoma. Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os transposons existentes no genoma são regulados pelo mecanismo de silenciamento transcricional mediado por pequenos dsRNAs ou piRNAs. Além disso, em alguns casos, o silenciamento transcricional e pós-transcricional de transposons ocorre concomitantemente (Kawasaki et al., 2005).

Cópia gratuita - venda proibida

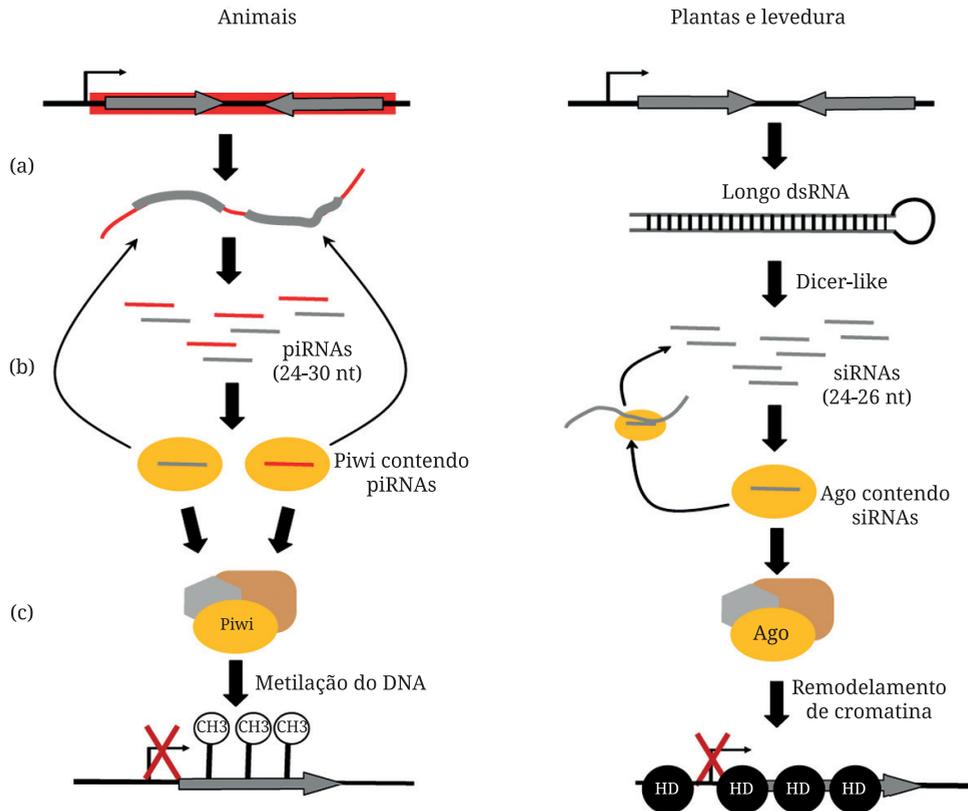


Figura 4. Silenciamento transcricional de transposons em eucariotos. (a) Em animais, piRNAs (24-30 nt) complementares a transposons são gerados a partir de precursor de RNA policistrônico de piRNAs (vermelho) que contém sequências invertidas de transposons (cinza) embebidas no locus. Já em plantas e levedura, locus de transposon (cinza) com sequências invertidas produz um dsRNA longo com estrutura do tipo *harpin*. (b) Embora ainda não elucidado, mecanismo inicial de clivagem gera piRNAs primários a partir de seu precursor. Tais piRNAs são incorporados na proteína *Piwi* e induzem a clivagem *de novo* de precursores, gerando os piRNAs secundários. O dsRNA longo é clivado pela proteína DICER-like, gerando siRNAs (24-26 nt), que, por sua vez, são incorporados em proteína Argonauta (*Ago*). O complexo siRNA-proteína Argonauta cliva transcritos de transposons alvos, gerando os siRNAs secundários. A produção de RNAs secundários é denominada de etapa de amplificação. (c) O complexo piRNA-*Piwi* recruta DMTases para inserir grupos metil (CH₃) nas sequências alvos de transposons de animais. Já em plantas, o complexo Argonauta-siRNA recruta tanto DMTases (como mostrado na Figura 3) como proteínas remodeladoras de cromatina, tais como as histonas deacilases (HD). Tanto a metilação como a formação de heterocromatina eficientemente promovem o silenciamento transcricional de transposons.

Outras sequências de DNA também produzem siRNAs e tornam-se alvos de silenciamento transcricional. Tais regiões no genoma incluem sequências de DNA repetitivas e invertidas, geralmente localizadas na heterocromatina. Na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, sequências repetitivas de DNA estão presentes na região pericentromérica dos cromossomos, formando a heterocromatina. Essas sequências são reguladas transcricionalmente por siRNAs gerados a partir de RNAs transcritos naquela região (Volpe et al., 2002). O silenciamento transcricional mediado por siRNAs em *S. pombe* ocorre exclusivamente via modificação da heterocromatina, enquanto que, em animais e plantas, o mecanismo predominante é o RdDM.

Em plantas, regiões repetitivas de DNA também podem estar presentes em genes codificadores de proteínas, tornando-os alvos de silenciamento por RdDM. O melhor exemplo descrito até o momento é o do gene *FWA* que codifica um fator de transcrição envolvido no controle do período de florescimento de *Arabidopsis thaliana* (Soppe et al., 2000). *FWA* é expresso no endosperma de sementes de *A. thaliana*, enquanto que sua expressão é reprimida em outros tecidos jovens da planta. Tal repressão é causada por metilação de sequências simétricas do tipo CpG e assimétricas do tipo CpHpH, presentes em sequências repetitivas de DNA no promotor e na região 5' não traduzida do gene *FWA*.

A manutenção do silenciamento transcricional do gene *FWA* é um processo extremamente complexo e envolve mecanismos dependentes e independentes de siRNAs (Lavrov e Kibanov, 2007). Neste capítulo, será discutido somente o mecanismo envolvendo RdDM. As regiões repetitivas presentes no promotor, próximas à região 5' não traduzida do gene *FWA*, são transcritas por uma RNA polimerase IV (RNAPolIV), gerando um transcrito de RNA de fita simples. Esse transcrito torna-se substrato para a proteína denominada *RNA-dependent RNA polimerase* (RdRP) que gera um dsRNA longo. O dsRNA longo, por sua vez, é processado pela maquinaria de RNAi, gerando siRNAs (24-26 nt). Finalmente, os siRNAs são incorporados na proteína Argonauta, que, neste caso, forma um complexo com a RNAPolIV. Tal complexo liga-se às regiões regulatórias do gene *FWA* e recruta DMTases para a metilação *de novo* (Lavrov e Kibanov, 2007). A regulação da expressão do gene *FWA* via RdDM é extremamente importante para a manutenção do correto período de florescimento em *A. thaliana*. Em plantas transgênicas ou mutantes, nas quais genes envolvidos no mecanismo de RdDM são inativos, ou seja, não há repressão de expressão gênica via RdDM, *FWA* é expresso em vários tecidos na planta jovem e adulta, resultando em um significativo atraso no florescimento. Este exemplo em plantas ilustra a complexidade da regulação transcricional mediada por dsRNAs, a qual não depende somente de pequenos RNAs, mas também das várias proteínas envolvidas na biogênese e ação de siRNAs, além daquelas envolvidas no processo de metilação e remodelamento da cromatina.

Como foi visto até o momento, a função de pequenos dsRNAs ou siRNAs na repressão da transcrição é funcionar como guias para revelar áreas no genoma, nas quais os complexos proteicos de metilação e remodelamento de cromatina devem ligar-se e atuar. A identificação de tais áreas ocorre devido ao pareamento entre os siRNAs e a sequência alvo de DNA ou RNA. Depois desse reconhecimento, DNA metiltransferases e proteínas modificadoras de cromatina, além de outras, são recrutadas, metilando o DNA e compactando a cromatina. Entretanto, se dsRNAs participam ativamente da modificação do DNA, e estes reconhecem primariamente sequências alvos de RNA, a etapa de transcrição inicial é necessária. Em outras palavras, o precursor de RNA necessita ser produzido para servir de substrato para a maquinaria de RNAi e, portanto, gerar os pequenos RNAs primários. Pelo menos em plantas, uma solução para essa contradição parece existir: diferente de animais e levedura, plantas possuem um quarto tipo de RNA polimerase, a RNAPolIV. A atividade desta RNA polimerase parece não ser afetada pelo estado de heterocromatina do genoma, permitindo assim a transcrição de sequências repetitivas de DNA. Embora este modelo seja ainda especulativo, a presença da RNAPolIV parece contribuir com a eficiência do silenciamento transcricional dependente de siRNAs. Em animais e leveduras, a proteína responsável pela transcrição inicial de sequências repetitivas não foi ainda identificada.

A repressão no nível transcricional, mediada por dsRNAs, também ocorre em genes humanos. A transfecção de células humanas com dsRNAs complementares a sequências de

promotores específicos leva ao silenciamento transcricional via formação de heterocromatina. Tal silenciamento requer a presença de uma molécula de RNA complementar à região promotora do gene alvo, que se liga à fita antissenso dos dsRNAs exógenos. A hibridação entre a fita antissenso do dsRNA e o RNA complementar ao promotor (*promoter-associated RNA* ou pRNA) funciona como um *tag* para que as proteínas remodeladoras de cromatina associem-se com o gene alvo e promovam o seu silenciamento (Han et al., 2007). Este e outros trabalhos sugerem a existência de dsRNAs endógenos também capazes de promover silenciamento transcricional de genes humanos. Embora nenhum siRNA endógeno associado à repressão no nível de transcrição de genes codificadores de proteínas tenha sido identificado até o momento, há trabalhos recentes que indicam que miRNAs participam do silenciamento transcricional, além do silenciamento pós-transcricional e repressão da tradução de proteínas (Kim et al., 2008; Younger e Corey, 2011). Com certeza, novos estudos irão surgir demonstrando o papel de dsRNAs endógenos (incluindo miRNAs) na regulação transcricional de genes, aumentando ainda mais a complexidade existente nas diferentes “camadas” de regulação gênica em eucariotos.

Referências Bibliográficas

- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam R. and Hannon, G. J. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128:1089-1103. PMID:17346786. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
- Britten, R. J. and Davidson, E. H. 1969. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 165:349-357. PMID:5789433. <http://dx.doi.org/10.1126/science.165.3891.349>
- Chen, R., Wang, T., Rao, K., Yang, J., Zhang, S., Liu, J. and Ye, Z. 2011. Up-regulation of VEGF by small activator RNA in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *J Sex Med* 10:2773-2780. PMID:21819543. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1743-6109.2011.02412.x>
- Faller, M. and Guo, F. 2008. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 1779:663-667.
- Flynt, A. S. and Lai, E. C. 2008. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Gen* 9:831-842.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. and Carmell, M. A. 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442:199-202. PMID:16751776.
- Girard, A. and Hannon, G. J. 2008. Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control. *Trends Cell Biol* 18:136-148. PMID:18282709 PMCID:PMC2995447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.01.004>
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. and Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* 21:4671-4679. PMID:12198169 PMCID:PMC125409. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf464>
- Han, J., Kim, D. and Morris, K. V. 2007. Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12422-12427. PMID:17640892 PMCID:PMC1924466. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701635104>
- Hannon, G. J. 2002. RNA interference. *Nature* 418:244-251. PMID:12110901. <http://dx.doi.org/10.1038/418244a>
- Henderson, I. R. and Jacobsen, S. E. 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447:418-424. PMID:17522675. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05917>
- Huang, V., Qin, Y., Wang, J., Wang, X., Place, R. F., Lin, G., Lue, T. F. and Li, L. C. 2010. RNAa is conserved in mammalian cells. *Plos One* 5:e8848. PMID:20107511 PMCID:PMC2809750. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008848>

- Janowski, B. A., Huffman, K. E., Schwartz, J. C., Ram, R., Nordseel, R., Shames, D. S., Minna, J. D. and Corey, D. R. 2006. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol* 13:787-792. PMID:16936728. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1140>
- Janowski, B. A., Younger, S. T., Hardy, D. B., Ram, R., Huffman, K. E. and Corey, D. R. 2007. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs, *Nat Chem Biol* 3:166-173. PMID:17259978. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio860>
- Kawasaki, H., Taira, K. and Morris, K. V. 2005. siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle* 4:442-448. PMID:15684610. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.4.3.1520>
- Kazazian Junior, H. H. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303:1626-1632. PMID:15016989. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1089670>
- Kim, D. H., Sætrom, P., Snøve Junior, O. and Rossi, J. J. 2008. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16230-16235. PMID:18852463 PMID:PMC2571020. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808830105>
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Nakashima, K., Taira, K. and Gage, F. H. 2004. A small modulatory dsRNA specifies the fate of adult neural stem cells. *Cell* 116:779-793. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00248-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00248-X)
- Lavrov, S. A. and Kibanov, M. V. 2007. Noncoding RNAs and chromatin structure. *Biochemistry (Mosc)* 72:1422-1438.
- Li, L.-C., Okino, S. T., Zhao, H., Pookot, D., Place, R. F., Urakami, S., Enokida, H. and Dahiya, R. 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17337-17342. PMID:17085592 PMID:PMC1859931. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0607015103>
- Lunyak, V. V. and Rosenfeld, M. G. 2005. No rest for REST: REST/NRSF regulation of neurogenesis. *Cell* 121:499-501. PMID:15907461. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.003>
- Mao, Q., Li, Y., Zheng, X., Yang, K., Shen, H., Qin, J., Bai, Y., Kong, D., Jia, X. and Xie, L. 2008. Up-regulation of *E-cadherin* by small activating RNA inhibits cell invasion and migration in 5637 human bladder cancer cells. *Biochem. Biophys Res Commun* 375:466-470. PMID:18725195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.059>
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-197. PMID:15260970. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>
- Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E. and Looney, D. J. 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305:1289-1292. PMID:15297624. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1101372>
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. and Birchler, J. A. 2004. Interrelationship of RNA interference and transcriptional gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69:433-438. PMID:16117678. <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.2004.69.433>
- Place, R.F., Li, L., Pookot, D., Noonan, E. J., and Dahiya, R. 2008. MicroRNA-373 Induces Expression of Genes with Complementary Promoter Sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5) (February 5): 1608–13. <http://dx.doi:10.1073/pnas.0707594105>
- Roush, S. and Slack, F. J. 2008. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 18:505-516 PMID:18774294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>
- Rossi, J. J. 2007. Transcriptional activation by small RNA duplexes. *Nat Chem Biol* 3:136-137. PMID:17301798. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio0307-136>
- Schwartz, J. C., Younger, S. T., Nguyen, N., Hardy, D. B., Monia, B. P., Corey, D. R. and Janowski, B. A. 2008. Antisense Transcripts Are Targets for Activating Small RNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (8) (August): 842-8. <http://dx.doi:10.1038/nsmb.1444>
- Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar, B., Whetstone, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P., Nakatani, Y. and Shi, Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 22:735-738. PMID:12700765. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01550>
- Slotkin, R. K. and Martienssen, R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8:272-285. PMID:17363976. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2072>

- Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. and Grewal, S. I. 2005. RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:152-157. PMID:15615848 PMCID:PMC544066. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0407641102>
- Ting, A. H., Schuebel, K. E., Herman, J. G. and Baylin, S. B. 2005. Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet* 37:906-910. PMID:16025112 PMCID:PMC2659476. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1611>
- Yahi, H., Fritsch, L., Philipot, O., Guasconi, V., Souidi, M., Robin, P., Poleskaya, A., Losson, R., Harel-Bellan, A. and Ait-Si-Ali, S. 2008. Differential cooperation between heterochromatin protein HP1 isoforms and MyoD in myoblasts. *J Biol Chem* 283:23692-23700. PMID:18599480 PMCID:PMC3259757. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802647200>
- Yao, M. C., Fuller, P. and Xi, X. 2003. Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. *Science* 300:1581-1584. PMID:12791996. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1084737>
- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J. A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931-1934. PMID:18048652. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1149460>
- Venables, J. P., Koh, C. S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L., Bramard, A., Paquet, E. R., Watier, V., Durand, M., Lucier, J. F., Gervais-Bird, J., Tremblay, K., Prinos, P., Klinck, R., Elela, S. A. and Chabot, B. 2008. Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Mol Cell Biol* 28:6033-6043. PMID:18644864 PMCID:PMC2547008. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00726-08>
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. and Martienssen, R. A. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297:1833-1837. PMID:12193640. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1074973>
- Yang, K., Zheng, X.-Y., Qin, J., Wang, Y.-B., Bai, Y., Mao, Q.-Q., Wan, Q., Wu, Z.-M. and Xie, L.-P. 2008. Up-regulation of p21WAF1/Cip1 by saRNA induces G1-phase arrest and apoptosis in T24 human bladder cancer cells. *Cancer Let* 265:206-214.
- Zhaoand, Y. and Epstein, R. J. 2008. Programmed Genetic Instability: A Tumor-Permissive Mechanism for Maintaining the Evolvability of Higher Species through Methylation-Dependent Mutation of DNA Repair Genes in the Male Germ Line. *Mol Biol Evol* 25:1737-1749. PMID:18535014 PMCID:PMC2464741. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn126>
- Wang, X., Wang, J., Huang, V., Place, R. F. and Li, L. C. 2012. Inducing of NANOG expression by targeting promoter sequence with small activating RNA antagonizes retinoic acid-induced differentiation. *Biochem J* 443:821-828. PMID:22339500 PMCID:PMC3327998. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20111491>
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. and Sänger, H. L. 1994. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90119-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90119-8)
- Wei, J., Zhao, J., Long, M., Han, Y., Wang, X., Lin, F., Ren, J., He, T. and Zhang, H. 2010. p21WAF1/CIP1 gene transcriptional activation exerts cell growth inhibition and enhances chemosensitivity to cisplatin in lung carcinoma cell. *BMC Cancer* 10:632. PMID:21087528 PMCID:PMC2995802. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-632>
- Younger, S. T. and Corey, D. R. 2011. Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res* 39(13):5682-91 PMID:21427083 PMCID:PMC3141263. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr155>

Cópia gratuita - venda proibida

Glossário

argonauta (*argonaute*): o mesmo que *slicer*.

cossupressão (*co-suppression*): fenômeno inicialmente descrito em plantas, no qual a inserção de transgenes em um organismo promove o silenciamento destas sequências e dos genes endógenos com similaridade nucleotídica. Uma das explicações para isso seria a inserção de duas cópias do transgene em posições muito próximas no genoma, mas de maneira invertida. A transcrição ininterrupta desta região geraria um dsRNA que promoveria, portanto, o silenciamento dos transgenes e dos genes endógenos com sequência semelhante. É o mesmo que: *quelling* e HGDS.

cognato: parecido, semelhante, relacionado. No contexto do livro, uma sequência cognata é aquela que apresenta sequência nucleotídica semelhante com o gene a que se refere.

dicer (cortadora no formato de cubos): é uma endoribonuclease do tipo III, responsável pela clivagem do dsRNA em siRNAs.

duplex: no contexto do livro, refere-se a qualquer RNA de dupla fita (siRNA, shRNA, dsRNA, hpRNA, etc.). De uma maneira mais ampla, refere-se a um complexo composto por duas estruturas.

experimental: um dsRNA (ou siRNA) experimental é aquele desenhado contra o gene alvo de interesse. O “dsRNA experimental” se contrapõe ao “dsRNA controle”.

HDGS (*homology-dependent gene silencing*): o mesmo que cossupressão e *quelling*.

knockdown: termo que reflete a redução não total no nível de transcritos de um gene. O termo *knockdown* é utilizado para expressar o efeito naturalmente parcial de silenciamento mediado por RNAi em contraposição ao termo *knockout*, que reflete uma redução total nos transcritos de um gene.

microRNA: pequenos RNAs (18-25 nt), capazes de regular a expressão gênica. O mecanismo mais comum de ação é o silenciamento gênico pós-transcricional (clivagem do RNA alvo ou inibição da tradução).

oligo guia (*guide strand*): o oligo do siRNA que é transferido para RISC. Este oligo irá direcionar RISC durante a procura, no citoplasma, por transcritos complementares.

oligo passageiro (*passanger strand*): o oligo do siRNA que é destruído, não sendo, portanto transferido para RISC.

oligo senso: o oligo do siRNA que não é complementar ao RNA alvo. Em teoria, o “oligo senso” pode ser o “oligo guia” ou o “oligo passageiro”.

oligo antissenso: o oligo do siRNA que é complementar ao RNA alvo. Em teoria, o “oligo antissenso” pode ser o “oligo guia” ou o “oligo passageiro”.

PTGS (*post-transcriptional gene silencing*): silenciamento gênico pós-transcricional. É uma *via endógena* que a maioria dos eucariotos possui, na qual um dsRNA é processado em siRNAs, que, por sua vez, direcionam RISC para o silenciamento gênico. Trata-se de um sistema de defesa natural contra vírus e transposons. A relação entre PTGS/RNAi é a mesma que “replicação do DNA”/PCR: ao passo que o PTGS e “replicação do DNA” são *processos naturais*, RNAi e PCR são *técnicas* de biologia molecular derivadas dos primeiros.

quelling (repressão): *fenômeno*, inicialmente descrito em leveduras, no qual a inserção de transgenes em um organismo promove o silenciamento destas sequências e dos genes endógenos com similaridade nucleotídica. Uma das explicações para isso seria a inserção de duas cópias do transgene em posições muito próximas no genoma, mas de maneira invertida. A transcrição ininterrupta desta região geraria um dsRNA que promoveria, portanto, o silenciamento dos transgenes e dos genes endógenos com sequência semelhante. É o mesmo que cossupressão e HGDS.

off-target: fora do alvo. Refere-se a qualquer transcrito que é silenciado devido a um pareamento inesperado com o siRNA.

RNAi (*RNA-mediated interference*): *técnica* de biologia molecular que permite o silenciamento gênico pós-transcricional potente através da introdução de duplexes de RNA. Ela é caracterizada pela clivagem do RNA alvo por RISC.

RNAi transitivo (*transitive RNAi*): *fenômeno* caracterizado pela dispersão do sinal de silenciamento em relação ao transcrito alvo. Isto ocorre porque alguns organismos possuem RdRPs capazes de estender *in vivo* a sequência do dsRNA original, usando o transcrito alvo como molde. Este novo dsRNA irá gerar “siRNAs secundários”, com o potencial de silenciar novas sequências.

RNA silencing: silenciamento de RNA. Expressão muito utilizada na pesquisa em plantas para referir-se ao PTGS.

slicer (cortadora): é a enzima central do complexo RISC, responsável pela clivagem do RNA alvo. Ela também é conhecida como argonauta e se trata de uma endoribonuclease.

transcrito: termo geral que se refere a qualquer RNA (mensageiro, transportador, ribossomal, entre outros).

Desvendando Expressões e Termos

Adendo

É muito comum observar na literatura científica o uso indiscriminado de termos e expressões como sinônimos. Apresentamos aqui uma separação conceitual entre eles de acordo com os pesquisadores que inicialmente os descreveram.

A via endógena: PTGS

A maioria dos eucariotos possui um sistema natural de defesa contra vírus e transposons chamado “silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS)” (Cogoni e Macino, 1997) ou “silenciamento de RNA” (Ding, 2000). Sua função é identificar dsRNAs, processá-los em siRNAs e promover a clivagem de transcritos com complementaridade ao oligo guia. De uma forma geral, o transcriptoma de uma célula sadia não possui dsRNAs longos, mas estas moléculas são geradas durante a replicação viral ou mobilização de transposons. Desta forma, o PTGS se trata de um sistema imune baseado em RNA.

Portanto, é inadequado se referir à “via de RNAi”, mas sim à “via de PTGS”. Trata-se do mesmo equívoco que dizer que um organismo apresenta a “via de PCR”, ao passo que o correto é “via de replicação de DNA”.

A técnica: RNAi

É possível utilizar a via natural de PTGS a seu favor, como uma ferramenta de biologia molecular. A ideia é administrar um duplex de RNA artificial que entrará na via endógena, silenciando seu gene de interesse. A esta *técnica* de silenciamento gênico mediado por RNA se dá o nome de Interferência por RNA (RNAi) (Rocheleau et al., 1997). Devido ao seu significado, a sigla “RNAi” é usada no feminino: “a RNAi” (a Interferência por RNA).

Os fenômenos: cossupressão, *quelling* e HDGS

Os primeiros relatos de silenciamento gênico mediado por RNA foram acidentais: pesquisadores, objetivando produzir

plantas com um determinado fenótipo intensificado, introduziram um número excessivo de transgenes associados àquela característica. Contudo, como consequência, eles obtiveram plantas com o fenótipo oposto ao esperado. Como se tratava de um novo evento biológico, cujo mecanismo molecular era desconhecido (PTGS), os seguintes nomes foram dados a estes fenômenos de inversão fenotípica: cossupressão (no caso de plantas, Napoli et al., 1990), *quelling* (em fungos, Romano e Macino, 1992) e HDGS (também em plantas, Matzke e Matzke, 1995).

As moléculas desencadeadoras: dsRNA, siRNA e derivados

A técnica de RNAi é desencadeada pela administração de determinados *tipos de moléculas*, tais como os dsRNAs, siRNA e outros. Portanto, não é correto afirmar que se “injetou um(a) RNAi”, mas sim que se “injetou um dsRNA”. Trata-se do mesmo erro que dizer que se “microinjetou uma PCR no embrião”, ao passo que o correto é dizer que se “microinjetaram moléculas de DNA no embrião”.

É muito importante compreender que a sigla “RNAi” não significa “RNA interferente” (para o qual não há acrônimo oficial). Infelizmente, este se trata de um dos equívocos mais comuns.

Tabela 1. Significados de expressões e siglas.

Termo em inglês	Categoria	Significado em inglês	Significado em português	Referência
PTGS	via endógena	<i>post-transcriptional gene silencing</i>	silenciamento gênico pós-transcricional	1
RNAi	técnica	<i>RNA-mediated interference</i>	Interferência (mediada) por RNA	8
<i>co-suppression</i>		<i>co-suppression</i>	cossupressão	7
<i>quelling</i>	fenômeno	<i>quelling</i>	repressão; supressão	9
HDGS		<i>homology-dependent gene silencing</i>	silenciamento gênico dependente de homologia	6
dsRNA		<i>double-stranded RNA</i>	RNA de dupla fita	4
siRNA	molécula desencadeadora	<i>short interfering RNA</i>	pequeno RNA de interferência; pequeno RNA interferente	3
não há*	molécula desencadeadora	<i>interfering RNA</i>	RNA de interferência; RNA interferente;	-
<i>knockdown</i>	efeito	<i>Knockdown</i>	redução não total; silenciamento	5

* Até 2012, havia no PUBMED mais de 77.000 artigos referentes à técnica de interferência por RNA. Contudo, foram encontrados apenas ~100 trabalhos (<0,12%) com a sigla “iRNA”, que significaria “*interfering RNA*” (RNA interferente). Isto evidencia claramente que este termo não é usual na área e não deve ser utilizado para evitar confusões entre RNAi e iRNA.

O efeito: *knockdown* (silenciamento)

A administração do duplex de RNA promove o silenciamento gênico pós-transcricional parcial. A este *efeito* de redução não total do nível dos transcritos dá-se o nome de *knockdown*, em contraposição ao *knock out* (redução total dos transcritos).

Portanto, não é adequado afirmar que se produziram “plantas de RNAi”, mas sim “plantas silenciadas” ou “plantas *knockdown*”. Trata-se do mesmo equívoco que se referir à produção de “animais de PCR”, ao passo que o correto é dizer “animais transgênicos”.

Bibliografia

- Cogoni C, Macino G. Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 16;94(19):10233-8.
- Ding SW. RNA silencing. Curr Opin Biotechnol. 2000 Apr;11(2):152-6.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. J Cell Sci. 2001 Dec;114(Pt 24):4557-65.
- Matzke MA, Matzke AJ. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? Trends Genet. 1995 Jan;11(1):1-3.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. 1990 Apr;2(4):279-289.
- Rocheleau CE, Downs WD, Lin R, Wittmann C, Bei Y, Cha YH, Ali M, Priess JR, Mello CC. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. Cell. 1997 Aug 22;90(4):707-16.
- Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol.

Cópia gratuita - venda proibida