

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Pós-Graduação em Microbiologia

Michelle Paula Silva

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INTERFERÊNCIA POR RNA
PARA INIBIÇÃO DE TUMOR,
E microRNAs COM FUNÇÃO SUPRESSORA DE TUMOR**

BELO HORIZONTE
2010

MICHELLE PAULA SILVA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE INTERFERÊNCIA POR RNA
PARA INIBIÇÃO DE TUMOR,
E microRNAs COM FUNÇÃO SUPRESSORA DE TUMOR**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do Grau de Especialista em Microbiologia aplicada à Ciências da saúde .

Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca

**BELO HORIZONTE
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

ALUNA: MICHELLE PAULA SILVA

Nº matrícula: 2009699577

Pós-Graduação em Microbiologia – NÍVEL ESPECIALIZAÇÃO

Defesa da Monografia: 19 de fevereiro de 2010

Às **dezenove** horas do dia **19 de fevereiro de 2010**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a comissão examinadora, indicada pelo colegiado do programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: “**Aplicação da técnica de interferência por RNA para inibição de tumor de origem viral e microRNAs com função supressora de tumor**”, requisito para obtenção de grau de especialista em microbiologia na área da saúde.

A candidata foi considerada: _____

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca: _____
(Orientador)

Coordenador

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
I. INTRODUÇÃO	1
II. JUSTIFICATIVA	2
III. OBJETIVOS	3
IV. METODOLOGIA	4
V. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. RNAs não codificadores de proteínas.....	5
1.2. RNA Interferente	5
1.2.1. Mecanismos de Interferência por RNA	6
1.2.2. Definição de microRNA , siRNA e shRNA	7
1.2.3. Processamento de microRNAs	8
1.2.4. Mecanismo de silenciamento por microRNAs	10
1.2.5. Mecanismo de silenciamento por dsRNA	11
2. Alternativas na terapia gênica para repressão de tumores.....	12
2.1. microRNAs: novas oportunidades no tratamento do câncer.....	12
2.2. Vetores adenovirais com RNAi antiviral.....	13
VI. DISCUSSÃO	17
VII. CONCLUSÃO	18
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

Dedicatória

**Instruir-te-ei,
e ensinar-te-ei
o caminho que debes
seguir;
guiar-te-ei com os meus
olhos. (salmos 32:8)**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Um artificial multi-microRNA.....08

FIGURA 2: Biogênese de microRNAs09

FIGURA 3: Mecanismo de silenciamento por microRNAs11

FIGURA 4: Mecanismo de silenciamento por dsRNA.....12

FIGURA 5: O RNAi medeia a alteração do tropismo adenoviral.....16

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1- Genes adenovirais e respectivas funções14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dsRNA – RNA de fita dupla

microRNA – RNA pequeno

miRNA- RNA pequeno

mRNA - RNA mensageiro

nt – nucleotídeos

ncRNAs- RNAs não codificadores de proteínas

pb – pares de bases

p53- proteína p53

RISC – complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA - Ácido ribonucléico

RNase – RNA polimerase

RNAi – interferência de RNA

siRNA – RNA interferente pequeno

shRNA- short hairpin ou pequenos grampo

RESUMO

A oncogênese representa um importante problema de saúde pública, e por isso a terapia gênica tem avaliado a técnica de interferência por RNA, considerada uma técnica poderosa de estudo da função gênica e de desenvolvimento de terapêutica gene específica. A interferência mediada por RNA é um fenômeno de regulação pós transcricional que ocorre naturalmente nos organismos eucariotos e exerce o papel de eliminação de RNAs mensageiros, atuando principalmente na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus (Zerbini et al., 2006). Após esta descoberta, a terapia gênica tem investido no estudo de microRNAs com função supressora de tumor e também em moléculas de RNA interferente que, ao serem introduzidas nas células, induz a regulação negativa de genes (Ring et al., 2002). A ferramenta apresentada neste trabalho, portanto, foi a construção de vetores virais para se multiplicar e lisar especificamente as células tumorais. Como a marca de tumores humanos é a perda de função de p53, uma proteína supressora de tumor, o objetivo é remodelar o tropismo adenoviral através de um RNA interferente antiviral sob a expressão de um promotor dependente de p53. Este mecanismo de interferência por RNA promoveu a repressão de genes adenovirais e sua conseqüente multiplicação em células normais, pois estas células expressam normalmente p53. Entretanto, houve inibição de tumor por meio da multiplicação viral nas células p53 disfuncionais (Gürlevik et al., 2009).

ABSTRACT

The oncogenesis represents an important public health problem, and therefore gene therapy has evaluated the technique of RNA interference, considered a powerful technique for the study of gene function and development of gene-specific therapy. Mediated RNA interference is a phenomenon of post transcriptional regulation that occurs naturally in eukaryotic organisms and plays the role of elimination of messenger RNAs, working mainly in the body's defense against molecular parasites such as transposons and viruses (Zerbini et al., 2006). After this discovery, gene therapy has invested in the study of microRNAs with tumor suppressor function and also of interfering RNA molecules which, when introduced into cells, it induces downregulation of genes (Ring et al. 2002). The tool presented in this work, therefore, was the construction of viral vectors to multiply and specifically lyse tumor cells. As the brand of human tumors is the loss of function of p53 tumor suppressor protein, the aim is retune the adenoviral tropism via a viral RNA interference in the expression of a p53-dependent promoter. This mechanism of RNA interference suppression promoted adenoviral gene and its consequent multiplication in normal cells, since these cells normally express p53. However, there was tumor by inhibiting viral multiplication in cells dysfunctional p53 (Gürlevik et al. 2009).

I. INTRODUÇÃO

A terapia gênica tem desenvolvido novos mecanismos de ação em terapias anticâncer. Nesta perspectiva, vírus têm sido construídos com transgenes terapêuticos devido a eficiência com que alguns vírus têm de infectar, se multiplicar e subsequentemente lisar a célula hospedeira, além de se propagar-se de uma célula para outra e expressar o transgene na célula alvo. Este método tem inspirado a noção de que os vírus podem ser explorados na terapia gênica para resolver algumas limitações, tal como a ineficiente entrega do gene a um número suficiente de células (Kirn & Thorne, 2009). Com todas estas vantagens que alguns vírus possuem, ainda pode ser aplicada a técnica de interferência por RNA aos vetores virais. Esta associação, portanto, de vetores virais à técnica de RNA interferente torna-se uma nova ferramenta na inibição de tumores devido a capacidade de lise das células tumorais pelos vírus mediante o silenciamento gênico (Ring et al., 2002; Ryan et al., 2008).

II. JUSTIFICATIVA

Na busca de novas estratégias, a viroterapia oncolítica utiliza vírus capazes de se espalhar através do tecido do tumor, em virtude da multiplicação viral e lise celular concomitante. Os recentes avanços na biologia molecular permitiram a concepção de diversos vírus geneticamente modificados, como o adenovírus que especificamente se multiplica e lisa as células tumorais. No entanto, é necessário utilizar mecanismos gerais e modificações genéticas pelas quais estes vírus possam atingir a multiplicação nas células tumorais específicas com eficácia antitumoral na ausência de toxicidade (Everts et al., 2005, Zheng et al., 2008).

Sendo assim, a terapia gênica tem investido na introdução de microRNAs com função supressora de tumor e também na técnica de interferência por RNA em vetores virais. O RNA interferente tendo surgido como uma nova e promissora ferramenta para regular genes específicos, além de apresentar as vantagens de baixo custo, resultados rápidos, não provocar alterações permanentes no DNA e permitir o controle temporal da inativação gênica. E diante de um vetor com amplo espectro de infectividade, os adenovírus representam um bom modelo experimental para investigar a destruição seletiva de tumores (Zeng et al., 2002).

III. OBJETIVOS

Geral

- Descrever a técnica de silenciamento gênico pela interferência de RNA (RNAi).
- Aplicação da terapia gênica na repressão de tumores oncogênicos através de microRNAs em vetor adenoviral.

IV. METODOLOGIA

Este trabalho consistirá de uma revisão bibliográfica, com levantamento e análise do que já foi publicado no portal de periódicos da CAPES e Pubmed, além da leitura de livros que abordam informações sobre o tema.

V. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. RNAs não codificadores de proteínas

A partir da descoberta de que existem RNAs não codificadores de proteínas (ncRNAs) e que os mesmos atuam no controle da expressão de outros genes é verificado que este fato rompe com o dogma central da biologia. Os RNAs não codificadores de proteínas são uma grande classe de moléculas funcionais, apresentando diferenças em termos de sua função e tamanho. Uma classe relativamente nova de ncRNAs, chamadas microRNAs (miRNAs), tem recebido uma grande atenção na literatura nos últimos anos. Os miRNAs são endogenamente codificados por famílias de genes que demonstram uma conservação evolutiva surpreendente. Os miRNAs atuam em diversas funções fisiológicas, tais como a diferenciação, desenvolvimento, proliferação, como supressores de tumores e muitos outros. A descoberta e investigação de miRNAs faz parte de uma revolução na biologia que está mudando os conceitos básicos do dogma central da biologia molecular. Um único miRNA podem participar no controle da expressão de até várias centenas de genes codificadores de proteínas. Esta nova compreensão de ncRNAs, promete levar a importantes contribuições para a medicina (Robinson, 2009).

1.2. RNA interferente

Em 2006, Andrew Fire e Craig Mello receberam o prêmio Nobel de fisiologia e medicina pela descoberta de um mecanismo que permite silenciar a atividade de genes específicos e controlar o fluxo de informação genética na célula. Eles foram premiados pela descoberta dos mecanismos de interferência por RNA (RNAi),

publicada inicialmente em 1998 na revista *Nature*. A atribuição do prêmio em um intervalo de tempo tão curto, demonstra a importância e transcendência das pesquisas de Fire e Mello. O mecanismo recebeu o nome de RNAi (RNA interferente). O silenciamento gênico foi descrito pela primeira vez no nemátodo *C. elegans*, em 1998, quando foi observado que moléculas RNA dupla fita inibiam a expressão de um determinado gene com seqüência similar (Zerbini et al., 2006).

1.2.1. Mecanismos de interferência por RNA

O termo silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos por meio dos quais a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente. Descobertas recentes sugerem que o silenciamento de RNA está envolvido em vários tipos de modificações genômicas e de cromatina, incluindo metilação do DNA genômico, formação de heterocromatina e eliminação de DNA. Estas descobertas indicam que os mecanismos de silenciamento gênico controlam a expressão a nível transcricional e pós-transcricional, e que a maquinaria de silenciamento pode operar nos compartimentos nuclear e citoplasmático. Há 3 mecanismos demonstrados de interferência via RNAi para controle de expressão de genes alvos. A nível transcricional o RNAi impede a transcrição de genes alterando a formação de heterocromatina e a nível pós-transcricional realiza duas formas de controle: inibindo a tradução do RNA mensageiro (mRNA) alvo ou então controlando a destruição do mRNA alvo através do complexo RISC. Nestes dois últimos processos o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido (Chung et al., 2006; Zerbini et al., 2006).

1.2.2. Definição de microRNA , siRNA e shRNA

Os microRNAs são provenientes do próprio genoma do hospedeiro, correspondem à pequenas moléculas de RNA fita simples (fsRNA) constituídas por apenas 22 nucleotídeos (nt) e, por este motivo, foram denominadas microRNAs. Os microRNAs estão envolvidos na regulação da expressão gênica de eucariotos e são processados a partir de transcritos endógenos que não codificam proteínas. A maioria dos genes que codificam microRNAs se localizam em regiões intergênicas, sugerindo que são transcritos a partir de unidades transcricionais independentes (Lagos-Quintana et al., 2001). Até o momento identificaram-se 462 genes que codificam microRNAs no genoma humano e estima-se que este número seja ainda bem maior. Análises bioinformáticas indicam que um único microRNA atue em diversos RNAs mensageiros, influenciando múltiplas vias de sinalização concomitantemente e apresentando enorme potencial regulatório. Os miRNAs tem sido relacionados a diferentes patologias humanas, inclusive o câncer (Ryan et al., 2008).

Enquanto os microRNAs são codificados no genoma do hospedeiro, os pequenos RNAs de interferência (siRNAs) são geralmente provenientes de outros precursores, podendo ser produzidos durante uma infecção viral, a partir de um transgene, transposon, gene endógeno ou introduzido artificialmente. Os siRNAs são compostos por RNA dupla fita (dsRNA) com 19 nt. A introdução de siRNAs artificiais em células animais pode induzir a degradação de moléculas de mRNAs complementares (Zeng et al., 2002).

A interferência por RNA pode também ser realizada através da introdução de pequenos grampos de RNAs (shRNAs) nas células (**FIGURA 1**). O shRNAs geralmente

são inseridos nas células em cassetes de expressão compostos por um promotor, uma pequena seqüência de DNA que codifica um shRNA e uma seqüência de terminação da transcrição. Um shRNA tem origem a partir de um pré microRNA (pré-miRNA) constituído por uma fita simples de RNA, os quais por sua vez são transformados em microRNAs envolvidos com a repressão de tradução (Chung et al., 2006; Rossi et al. 2008).

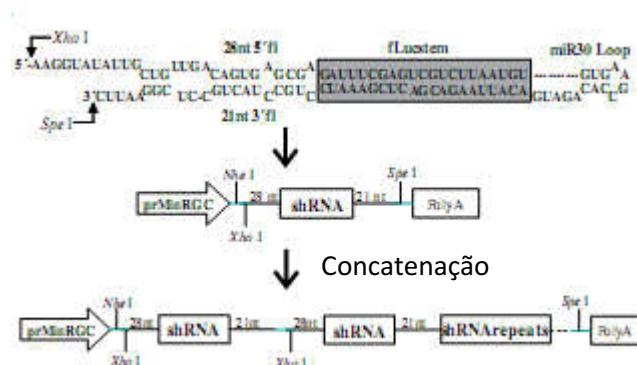


FIGURA 1: Um artificial multi-microRNA. Os shRNAs são entregues em cassetes de expressão de duração relativamente curta. É mostrado a concatenação de diferentes shRNAs a fim de vários fatores de regulação serem entregues em um curto trecho de RNA sob o comando do promotor prMinRGC. Fonte: Gürlevik et al., 2009.

1.2.3. Processamento de microRNAs

A ativação de miRNAs ocorre através de um processo de várias etapas e inicia-se com uma transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito primário (pri-miRNA) contendo *cap* 5' e uma cauda poli (A). Em seguida a enzima Drosha digere o pri-miRNA no núcleo, liberando pequenos grampos de RNA (pré-miRNA). Após a formação de pré-miRNAs com aproximadamente 70 nt, ele é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (exp5), uma proteína de exportação que utiliza a Ran-GTP como co-fator. Posteriormente, ocorre o processamento pela enzima Dicer. Uma vez no citoplasma, o pré - miRNA é processado pela Dicer, gerando um

miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto é incorporado em um complexo de enzimas denominado RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA), que inclui as proteínas argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar de genes alvo (**FIGURA 2**) (Zeng et al., 2005).

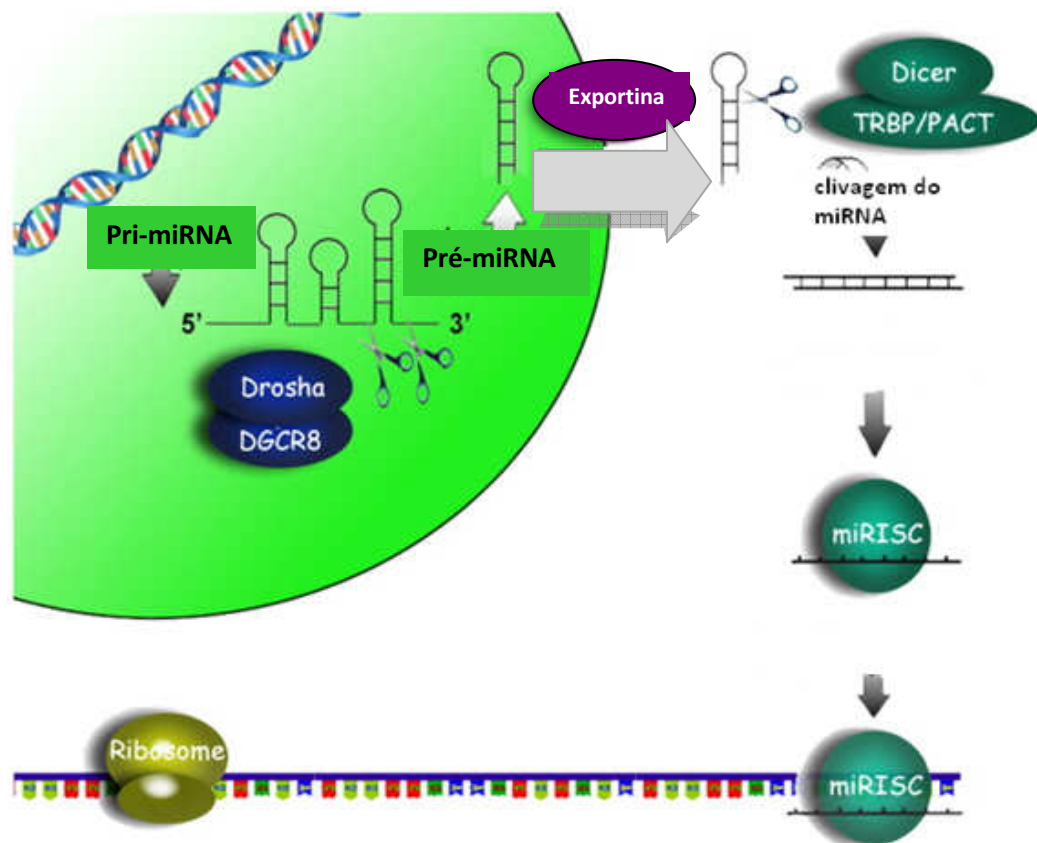


FIGURA 2: Biogênese de microRNAs. O processamento de microRNAs inicia-se com transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito primário (pri-miRNA). A enzima Drosha cliva o pri-miRNA no núcleo produzindo o pré-miRNA. O pré-miRNA contendo aproximadamente 70 nt é transportado ao citoplasma pela exportina-5. Uma vez no citoplasma, o pré - miRNA é processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. A fita antisense é incorporada a um complexo de enzimas denominado RISC que guia a fita até ao mRNA. Fonte: Lawrie, 2013.

1.2.4. Mecanismo de silenciamento por microRNAs

Os microRNAs exercem uma regulação pós transcricional na região 3' não traduzida e sua ação depende do grau de complementaridade com o mRNA alvo. Se o microRNA interagir com alvos parcialmente complementares de mRNA, haverá um bloqueio na tradução, sendo este o principal mecanismo de atuação dos miRNAs em mamíferos. Entretanto, no caso de complementaridade total haverá a destruição do mRNA (**FIGURA 3**). Em função de os miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular vários mRNAs. Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 mRNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória de sinalização celular (Ricerte et al., 2006).

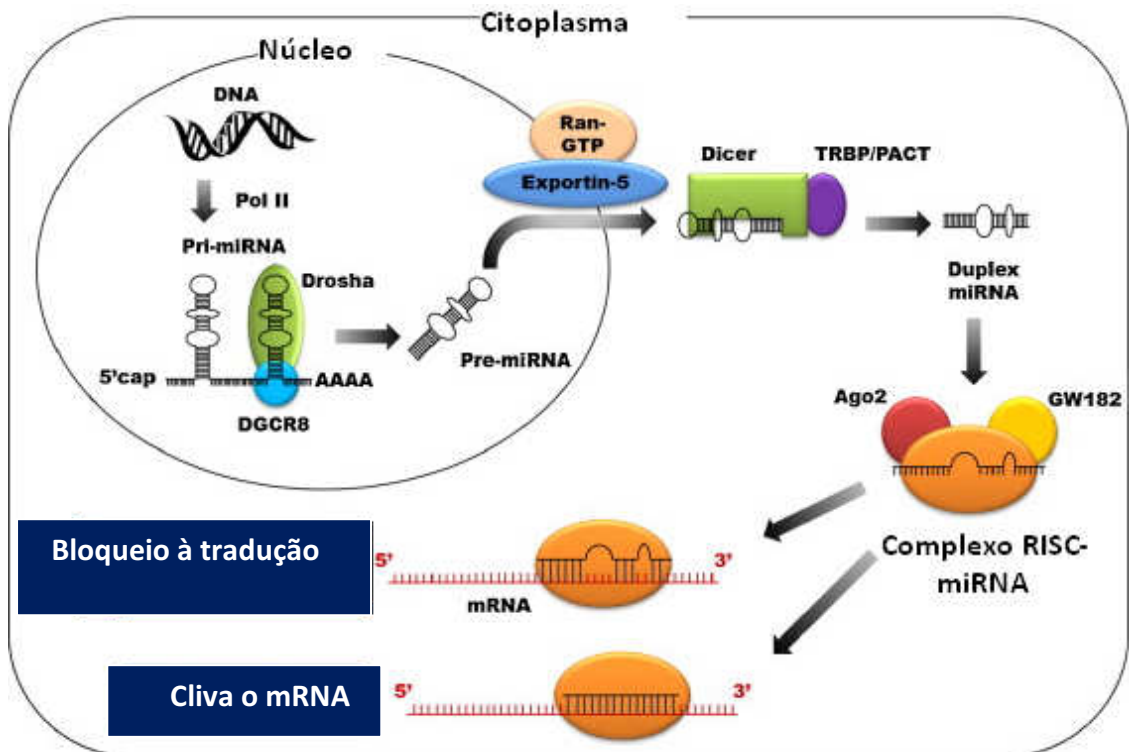


FIGURA 3: Mecanismos de silenciamento por microRNAs. No citoplasma da célula, o microRNA maduro constituído por uma dupla fita de RNA é aberto por uma helicase e posteriormente é transferido para o complexo RISC. Se o microRNA for transportado pelo complexo RISC Ago2, o mRNA alvo é clivado e degradado, entretanto, se o microRNA for transportado pelo complexo RISC Ago1-4 ocorrerá apenas a supressão da tradução. Fonte: Nohata et al.; 2013.

1.2.5. Mecanismo de silenciamento por dsRNA

O dsRNA exógeno quando introduzido na célula é clivado pela enzima denominada Dicer, em fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos, designados siRNA. Esses siRNAs associam-se a outras proteínas celulares formando um complexo chamado RISC. Uma helicase presente neste complexo abre a dupla fita do siRNA, de forma que a fita anti-senso localiza sítios específicos complementares no mRNA, onde se liga causando sua degradação (**FIGURA 4**).

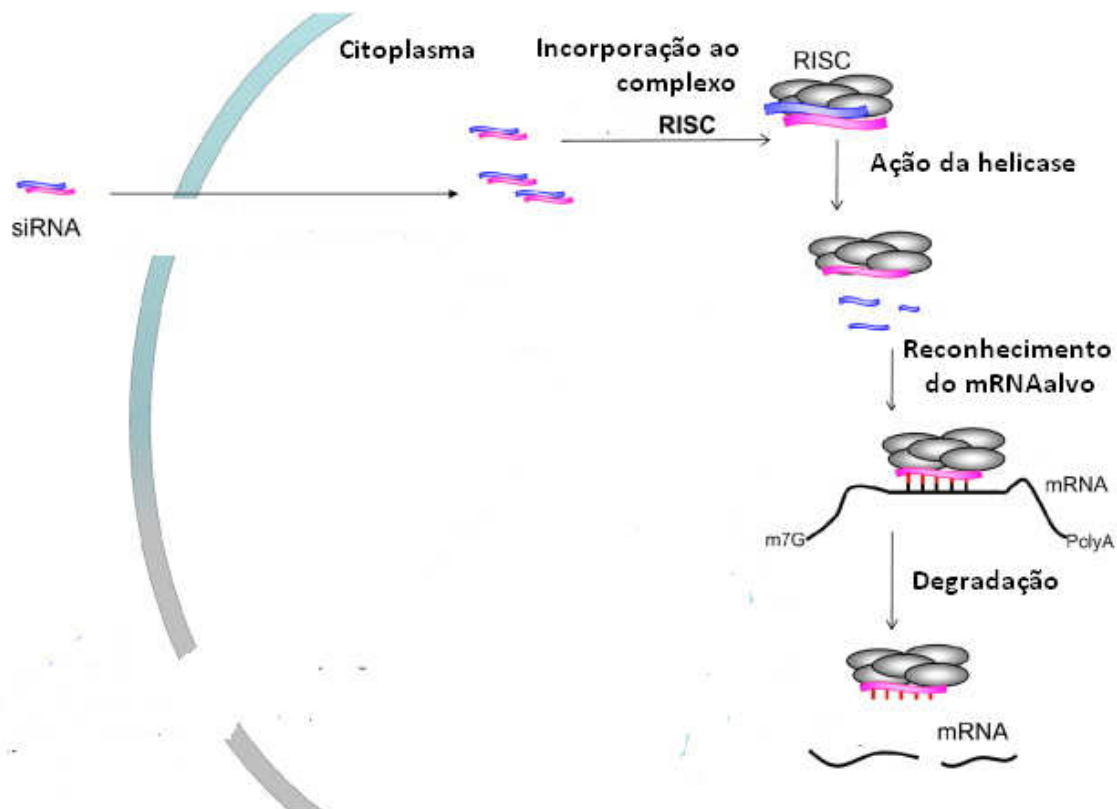


FIGURA 4: Mecanismo de silenciamento por dsRNA. RNAs dupla fita são processados pela enzima DICER produzindo siRNAs. A fita antisense do siRNA é incorporada ao complexo RISC guiando-o ao mRNA alvo. Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o mRNA, degradando-o. Fonte: Takahashi, Y. et al.; 2009. Modificado.

2. Alternativas na terapia gênica para repressão de tumores

2.1. microRNAs: novas oportunidades no tratamento do câncer

Alguns estudos sugerem possíveis ligações entre microRNAs e câncer. A expressão alterada de miRNAs vindo sendo relacionada a diversos tipos tumorais, podendo funcionar como oncogenes ou genes supressores de tumor. Em seres humanos 50 % dos genes que codificam microRNAs estão localizados em sítios genômicos associados ao câncer. Os genes miR-15 e miR-16 estão relacionados em mais da metade da leucemias linfocíticas crônicas (LLC) de células B. Foi observado que uma mutação no locus gênico de miR-15 e miR-16 diminuiu a expressão destes microRNAs em células de pacientes com LLC. Estes miRNAs também estão menos

expressos em adenomas hipofisários, sendo esta expressão inversamente correlacionada com o tamanho do tumor. Estes achados sugerem que miR-15 e miR-16 atuem como genes supressores de tumores. Interessantemente, um estudo recente mostrou que miR-15 e miR-16 regulam negativamente a expressão de BCL2, um oncogene anti-apoptótico que se apresenta super expresso em diversos cânceres humanos, incluindo leucemias e linfomas (Ichimi et al., 2009).

Outros microRNAs relacionados à câncer são o miR-143 e miR-145. Os níveis destes microRNAs estão significativamente diminuídos em tumores colorretais e em linhagens celulares de câncer linfóide, mama, próstata e colo uterino, sugerindo que possam atuar como supressores tumorais. Outra família de microRNAs let-7, que inclui doze homólogos em humanos, também são supressores de tumor, atuando no câncer de pulmão (Ricerte et al., 2006).

2.2. Vetores adenovirais com RNAi antiviral

Os adenovírus pertencentes à família *Adenoviridae*, são vírus de DNA fita dupla linear com aproximadamente 36 kb, não envelopados, encapsulado em um capsídeo icosaédrico que mede cerca de 70-100 nm de diâmetro e com amplo espectro de infectividade. O ciclo de multiplicação dos adenovírus é do tipo lítico ou latente, podendo também provocar transformação oncogênica ao induzir um crescimento descontrolado da célula onde ocorre a multiplicação. O local de multiplicação é o núcleo da célula hospedeira, sendo a transcrição viral regulada por duas classes de genes precoce e tardia. Os genes E1A e E1B; E2A e E2B; E3 e E4 codificam as proteínas precoces enquanto que os genes L1, L2 e L3, L4 e L5 proteíνας tardias (**QUADRO 1**) (Murray et al., 2006).

QUADRO 1. Genes Adenovirais e respectivas funções	
Gene	Funções
E1A	Ativa a transcrição de genes precoces, incluindo proteínas que auxiliam o vírus a escapar da resposta imune. Desregula o crescimento celular. Inibe a ativação de elementos de resposta ao interferon.
E1B	Liga-se ao supressor de crescimento celular p53, promovendo a transformação celular. Bloqueia a apoptose.
E2	Ativa alguns promotores. Produz a proteína terminal no DNA e a DNA polimerase.
E3	Impede a inflamação por fator de necrose tumoral-α (TNF- α).
E4	Limita o efeito citopatológico viral.

QUADRO 1: Genes Adenovirais e respectivas funções.

Fonte: Murray et al., 2006.

Recentemente, os vetores adenovirais ganharam uma importância crescente nas aplicações de terapia gênica e, em particular, na terapia contra o câncer. Os adenovírus estão dentre os mais proeminentes e mais conhecidos para transferência de genes em células de mamíferos e humanos por possuírem um largo espectro de infectividade celular. Os Adenovírus apresentam muitas vantagens, entretanto, têm sido limitados na sua capacidade de eliminar tumores oncogênicos (Cody et al., 2009).

Portanto, para atingir o alvo sem provocar efeitos colaterais é montada uma estratégia em introduzir vetores adenovirais com fatores de regulação, tal como shRNAs. A interferência de RNA é útil para a regulação de genes virais, de preferência genes do grupo de proteínas precoces envolvidas na multiplicação, tais como E1A, E1B, E4 (Thomas et al., 2007).

Para otimizar o processo foi construído uma rede de RNAi antiviral, sendo alvo desta rede os mRNAs dos genes E1A, E1B e E4, isto para obter a vantagem de muitos fatores de regulação serem codificados em um curto trecho de RNA (Thomas et al., 2007). As etapas de produção e uso de um vetor adenoviral foi realizada pela produção de um shRNAs antiviral e um promotor sensível ao ativador transcricional p53. O uso deste promotor é outro fator de regulação que está sendo alvo de muitos estudos. A escolha deste promotor se deve ao fato de que a maioria dos tumores humanos ocorre por causa de alterações no gene p53. A proteína p53 responde a danos no DNA "prendendo-se" na fase G1, ou então desenvolvendo o processo apoptótico, sendo considerado, portanto, como um gene supressor de tumor (Murray et al., 2006).

Assim, um RNAi antiviral expresso especificamente apenas nas células tumorais, por não haver a expressão de p53, o vírus se multiplica normalmente, lisando a célula tumoral. Este é um método que mostrou eficácia antitumoral por meio de uma via de transdução de sinal. Em contrapartida, nas células normais os produtos de p53 ativa a rede de RNAi antiviral e conseqüentemente há a repressão de multiplicação do vírus **(FIGURA 5) (Gürlevik et al., 2009).**

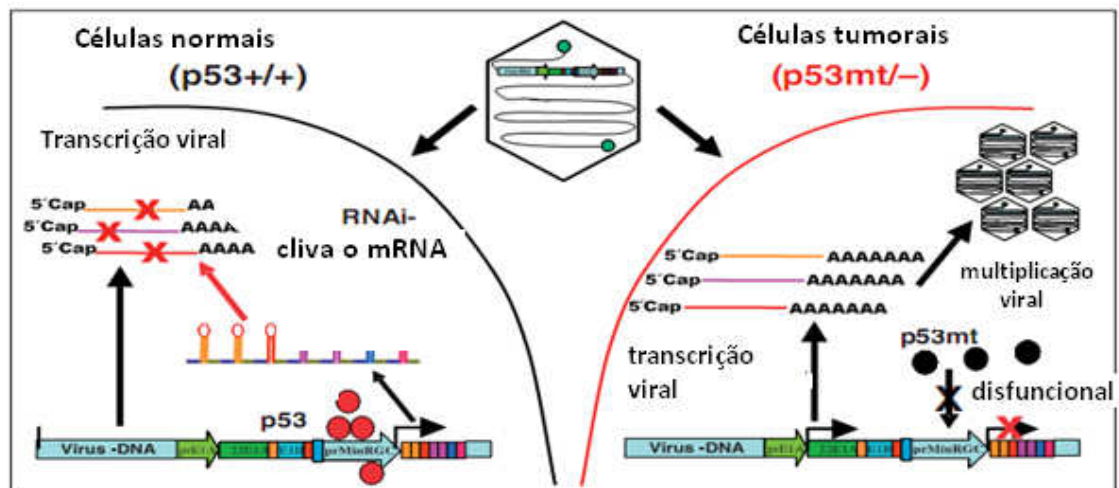


FIGURA 5: O RNAi medeia a alteração do tropismo adenoviral. O esquema mostra uma célula mediante uma infecção adenoviral com RNAi antiviral em resposta a p53. O promotor é altamente ativo por p53 em células normais, mas não em células p53 disfuncionais. A célula com expressão de p53 não apresenta multiplicação viral e, em contrapartida, a célula com p53 disfuncional apresenta a multiplicação viral. Fonte: Gürlevik et al., 2009.

VI. DISCUSSÃO

O RNA não codificante passará a assumir, cada vez mais, o papel principal na biologia do século XXI. Após as descobertas de que genes podem ser silenciados e de que vários genes exercem papel regulatório como supressores de tumores a busca por terapias alternativas tornam-se necessárias.

VII. CONCLUSÃO

A aplicação de novas terapias depende de meio eficazes para combater o tumor. A via de transdução de sinal p53 é uma das vias mais estudadas na terapia contra o câncer, uma vez que a maioria dos tumores está relacionada à deficiência de produtos de p53. Os estudos demonstraram que a especificidade do tumor pode ser melhorada através da construção de vetores virais RNAi antiviral com promotores específicos, tal como o promotor p53. Este método mostrou eficácia antitumoral ao atingir a meta de silenciamento gênico seguida de ausência de toxicidade. A estratégia garantiu a multiplicação viral apenas em células p53 disfuncionais, havendo assim uma destruição seletiva de células tumorais. Enquanto isso, nas células normais os produtos de p53 ativam a rede de RNAi antiviral e dessa forma os genes envolvidos na multiplicação viral são inibidos.

Outra vertente de estudos mostram também que existem microRNAs com função supressora de tumor. É comprovado baixos níveis de determinados microRNAs em células tumorais. Este é outro mecanismo molecular que pode ser explorado como alternativa na terapia gênica para repressão de tumores.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrew, N., Blackford and Roger, J. A. (2009) Adenovirus E1B 55-Kilodalton Protein: Multiple Roles in Viral Infection and Cell Transformation. *Journal of Virology*, 83: 4000-4012.
2. Barbosa, A.S.; Lin, C.J. (2004) Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.48, 5 .
3. Berk, A.J., (2005) Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*, 24 (52) :7673-85.
4. Chung YS, Kim MK, Lee WJ, Kang C. Silencing E1A mRNA by RNA interference inhibits adenovirus replication. *Archiv. Virol.* 2007;152:1305–1314.
5. Chung, K.H, Hart, C.C, Bassam, S., Avery, A., Taylor, J., Patel, P.D., Vojtek, A.B. and Turner, D.L. (2006) Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res.*13;34(7):e53.
6. Cody, J.J and Douglas, J.T. (2009) Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy *Cancer Gene Therapy* 16, 473–488; doi:10.1038/cgt.2009.3.viroterapia do cancer
7. Dobbstein, M., (2004) Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 273:291-334.
8. Everts, B., vander, P. H.G., (2005) Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther.*,12(4):438-440
9. Gürlevik, E., Woller, N., Schache, P., Malek, N.P., Wirth, T.C., Zender, L., Manns, M.P., Kubicka, S. and Kühnel F. (2009) p53-dependent antiviral RNA-interference facilitates tumor-selective viral replication., *Nucleic Acids Res.* 37(12):84.
10. He, L., Lopes, L.P., Stanchina, E., Xuan, Z, Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Peter, P.S, Linsley, Caifu Chen, C., Lowe, S.W., Michele A.

Cleary,M.A. and Hannon,G.J. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134 .

11. Hongxia,Z., Xia,X.Z., and Zuoshang, X., (2005) An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res.*; 33(6): e62.

12. Ichimi,T., Enokida, H., Okuno, Y., Kunimoto, R., Chiyomaru,T. Kawamoto, K., Kawahara,K., Toki, K., Kawakami,K., Nishiyama, K., Tsujimoto,G., Nakagawa, M., Seki, N., (2009) Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder câncer. *International Journal of Cancer.*, 125: 345-352.

13. ICTV Taxonomy and Index to Virus Classification and NomenclatureTaxonomic lists and Catalogue of viruses . Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>> acesso em 06 de janeiro de 2010.

14. Jincheng,L., Donath ,S., Li,Y., Qin,D., Bellur, S., Prabhakar and Li,P. (2010) miR-30 Regulates Mitochondrial Fission through Targeting p53 and the Dynamin-Related Protein-1 Pathway. *journal.pgen.1000795*. doi: 10.1371.

15. Lagos-Quintana, M; Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001).

16. Leppard,K.N., (1997) E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. *J Gen Virol.*, 78:2131-8.

17. Madigan,M.T., Martinko,J.M. and Parker,J. (2004) *Microbiologia de Brock.*, 10:240-241.

18. Murray,P. R., Rosenthal,K. S. and Pfaller,M.A. (2006) *Microbiologia médica.*, 5: 523-529.

19. Ricerte,F., R.,M, J.C e Kimura (2006) MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 50

n° 6: 1102-1107.

20. Ring,C.J. (2002) Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J GenVirol.*, 83:491-502

21. Rossi ,J.J.,(2008) Expression strategies for short hairpin RNA interference triggers. *Hum Gene Ther.*;19(4):313-7.

22. Ryan L,R., Udreau,B.O., Monteys,A.M, and Davidson,B.L . (2008) Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs , doi: 10.1261/rna.1062908 *RNA 2008.* 14: 1834-1844.

23. Robinson, V.,L., (2009) Rethinking the central dogma: noncoding RNAs are biologically relevant. *Urol Oncol.*, 27(3):304-6.

24. Steinwaerder, D.S., Carlson,C.A., Lieber, A., (2000)DNA replication of first-generation adenovirus vectors in tumor cells. *Hum Gene Ther.*, 11(13):1933-48.

25. Sun,M., Melegari,M., Sridhar, S.,Charles E. Rogler, C.E. and Zhu,L. (2006) Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown. *BioTechniques*, 41:59–63.

26. Thomas,W., Florian,K., Stefan,K., and Lars,Z. (2007) Restricted tumor virus oncolytic better transduction spectrum. WO/2007/003612.

27. Toby,N., Trahair , Ian, E.. Alexander, Peter, B., Rowe and . Smythe, J.A. (2000) The adenovirus E4 ORF6 and E1b 55 kDa proteins cooperate in a p53-independent manner to enhance transduction by recombinant adeno-associated virus vectors . *Journal of General Virology*, 81: 2983-2991.

28. Wang,Y., Hallden,G., Hill,R., Anand,A., Liu,T.C., Jennelle Francis,J., Brooks,G., Lemoine,N. and Kirn,D.E3 gene manipulations affect oncolytic adenovirus activity in immunocompetent tumor models .*Nature Biotechnology*, 21: 1328–1335

29. Zeng,Y., Wagner,E.J., and Cullen,B.R., (2002) Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate mRNAs When Expressed in Human Cells. *Mol. Cell*, 9, 1327-1333.

30. Zerbini, F.M., Alfenas, P.F., e Andrade, E.C. (2006) O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. Dep. de fitopatologia/Bioagro, Universidade Federal de Viçosa.
31. Zheng, X., Rao, X.M., Gomez, J.G., Hao, H., McMasters, K.M., Zhou, H.S., (2008) Adenovirus E1B55K region is required to enhance cyclin E expression for efficient viral DNA replication. *J Virol.* 82(7):3415-27.
32. Zhou, H., Xia, X.G., Xu, Z., (2005) An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res.*;33(6):e 62.
33. Yu, Z., Renato Baserga, R., Chen, Wang, C., Lisanti, M.P and Pestell, R., G., (2010) microRNA, Cell Cycle, and Human Breast Cancer. *The American journal of pathology.*, doi:10.2353.
34. Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R. (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.*, 24(1):138-48.
35. Nohata, N., Hanazawa, T., Kinoshita, T., Okamoto, Y., Sek, N. (2013) MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: Aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 40 (2) 143-149.
36. Takahashi, Y., Nishikawa, M., Takakura, M. (2009) Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy.
37. Lawrie, C. H. (2013) MicroRNAs in hematological malignancies.