



RNA E O SEU EFEITO REGULATÓRIO OCACIONADO POR MICROFRAGMENTOS DE INTEFERÊNCIA GÊNICA EM ORGANISMOS MULTICELULARES

RNA AND ITS REGULATORY EFFECT CAUSED BY MICROFRAGMENTS OF GENIC INTERFERENCE IN MULTICELLULAR ORGANISMS

Bruno Nonato Cruz Furtado¹, Simone Maria Klok²

Centro Universitário Campos de Andrade – UNIANDRADE, Paraná, Brasil

E-mail: brunofurtado56@gmail.com

Submetido em: 19 ago. 2022

Aceito em: 26 abr. 2023

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos fragmentos de RNAs de interferência originados a partir de erros em processos de duplicação, localizados em regiões intergênicas em organismos multicelulares. Esses miRNAs apresentam em sua estrutura uma cadeia composta por aproximadamente 22 nucleotídeos (nt), podendo variar entre 19 a 25 nt, sendo caracterizados por atuarem como reguladores moleculares em diversas vias de expressão, regulando negativamente a nível molecular o funcionamento gênico ao parear-se com a cadeia de RNA mensageiro. Para a realização deste trabalho, efetuou-se uma revisão sistemática da literatura (nacional e internacional) produzida preferencialmente nos últimos dez anos e divulgada por meio de artigos e periódicos publicados em revistas indexadas da área da Saúde, os quais abordaram o processo de bloqueio gênico antes e após a transcrição e a origem desses agentes regulatórios. Diante do exposto na literatura e dos recentes avanços científicos, miRNAs estabelecem importantes funções ao atuarem como agentes supressores da regulação gênica, fornecendo a perspectiva da sua funcionalidade em métodos de grande especificidade analítica frente à patologias de fundo molecular.

Palavras-chaves: RNA; transcrição; silenciamento gênico; RNA de interferência; regulação gênica.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small fragments of interference RNAs originated from errors in duplication processes, located in intergenic regions in multicellular organisms. These miRNAs present in their structure a chain composed of approximately 22 nucleotides (NT), which can vary between 19 and 25 NT, being characterized by acting as molecular regulators in several pathways of expression, negatively regulating at the molecular level the genetic functioning when pairing with the chain of messenger RNA. To carry out this work, a systematic review of the literature (national and international) produced preferably in the last ten years and published through articles and journals published in indexed journals in the health area, which addressed the process of gene block before and after transcription and the origin of these regulatory agents. Given the above in the literature and recent scientific advances, miRNAs establish important functions when acting as suppressive agents of genic regulation, providing the perspective of its functionality in methods of great analytical specificity in the face of molecular background pathologies.

Key words: RNA; transcription; gene silencing; interference RNA; gene regulation.



1. INTRODUÇÃO

Ao longo do processo de obtenção do conhecimento a respeito da matéria que forma um organismo, um dos grandes objetivos do campo científico foi descobrir sobre a maneira de transformar em fatos concretos as diversas teorias a respeito do funcionamento do corpo humano. Sobre de que maneira algumas características eram apresentadas por um determinado organismo e, sobretudo, pode-se comprovar que determinado acontecimento resultava de uma combinação de fatores inerentes ao mundo molecular de cada célula. Hoje, o foco científico está voltado para o mais recente modelo de estudo celular, o de análise genética das moléculas de microRNA (miRNAs), que sobrepondo-se sobre sequências gênicas regulam negativamente a ação funcional do gene alvo, sendo este o atual tema de pesquisa em desenvolvimento no ramo da Biologia Molecular [1; 2; 3; 4].

A temática “silenciamento gênico” refere-se a uma série de eventos por meio dos quais a expressão de um ou mais gênis são regulados negativamente, atuando como componentes indutores de modificações epigenéticas. Alterações epigenéticas na expressão gênica são características compartilhadas entre gerações e que não podem ser explicadas apenas por alterações na sequência de DNA, que eventualmente resultam na repressão ou ativação da expressão do gene [5; 6; 7; 8].

Após os primeiros estudos com plantas biotecnologicamente modificadas resistentes a vírus, foi observado que o silenciamento de RNA representava um sistema antigo de defesa contra vírus e retrotransposons (elementos genéticos móveis, conhecidos por se moverem no genoma). Atualmente, sabe-se que este constitui um mecanismo eficiente de controle gênico que atua principalmente no controle de genes envolvidos no desenvolvimento, equilíbrio do organismo e na manutenção da integridade do genoma [5; 6; 7; 8].

A área de genômica humana é o atual segmento responsável por responder a estas questões, também utilizado para aplicar uma análise completa no genoma humano. Com observação do controle da expressão gênica, as variações genéticas e a relação do gene com o ambiente apresentado, sobre a perspectiva regulatória de moléculas intranucleares que

representam todo um albergue de informações evolutivas [9; 10; 11].

O estudo dos ácidos nucleicos que ditam os processos de transição das informações, as características fenotípicas e o controle total de cada molécula funcional de um organismo humano, por décadas teve por prioridade a análise do ácido desoxirribonucleico (DNA). Tendo-o como agente principal da regulação dos genes, não atribuindo aspectos possíveis de interferência gênica causados por ação do ácido ribonucleico (RNA) [2; 3; 4; 7; 12].

O DNA é uma macromolécula formada de ácido nucleico polimérico, apresentando três constituintes básicos em sua estrutura: um açúcar pentamérico (desoxirribose); bases contendo nitrogênio (purinas e pirimidinas) e um grupo fosfato. Os nucleotídeos, assim chamados quando em estado definido, compostos pela interação química destes elementos unem-se formando extensos polímeros de cadeias nucleotídicas por intermédio da ligação 5'-3' fosfodiéster, resultante da interação entre as unidades de desoxirribose contíguas [1; 4; 8; 11; 12].

Com o conhecimento da estrutura que dá forma à dupla hélice de material genético e durante o processo de divisão celular, a conformação básica do DNA sofre induções por mecanismos oriundos do ambiente interno e externo que a levam a entrar em estado de multiplicação e transmissão das informações gênicas de uma célula a outra. Proteínas de restrição promovem a separação das fitas complementares e uma nova sequência de pares de base é originada para completar a fita molde [2; 3; 4; 7; 12].

Todo esse processo é traçado pelos vários pontos de sinalização que levam a célula a entrar em estado de divisão e, assim, a duplicação da sua molécula de DNA está direcionada à produção de proteínas responsáveis por quase toda a ação regulatória de um organismo. A ideia de que o RNA promoveria apenas o papel de constituinte intermediário diante do processo de transmissão de informações genéticas, codificadas pelo DNA, foi tido como simples fato de transição de informações por várias décadas. Isso ocorreu, até que se consolidou o conhecimento de que algumas funções do corpo humano eram reguladas pelo silenciamento de genes, possibilitando uma análise mais detalhada dos



ácidos nucleicos e dos acontecimentos até a tradução em proteínas [3; 10; 7; 11].

Com análises estruturais direcionadas, pode se observar que é durante o processo de transcrição que uma sequência de RNAs antisense (RNA fita simples complementar a um RNA mensageiro, que codifica a proteína com o qual hibrida bloqueando sua tradução em proteína) começa a ser transcrita da fita sentido de DNA, levando ao bloqueio de genes e suprimindo expressões genéticas. Esses RNAs ainda possuem sequências complementares ao RNA alvo da regulação, interagindo por emparelhamento de bases complementares [9; 10; 13; 14; 15].

Nos últimos anos, pesquisas e estudos científicos retrataram a comprovação de que o RNA interfere diretamente nos processos de expressão gênica. Esse processo de interferência consiste em regular negativamente, a nível transcricional e pós-transcricional a expressividade de alguns genes por intermédio da deterioração do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), bloqueando a continuidade da síntese proteica [9; 15; 16; 17].

Dois fatores principais estão envolvidos no processo de silenciamento da expressão gênica: os microRNAs (miRNAs) e os pequenos RNAs de interferência (siRNA), que apesar de não deterem da mesma característica de moléculas codificantes, desenvolvem ações precisas em algumas das funções celulares como formação de cromatina, proliferação celular e estabelecimento da homeostasia [9; 6; 8; 16].

Os miRNAs atuam de maneira regulatória, suprimindo mRNAs à partir de fragmentos transcritos endógenos que não codificam proteínas e possuem como alvo mRNAs endógenos [5]. A origem do conhecimento desses miRNAs data de poucos mais de vinte anos, em estudos elaborados com *Caenorhabditis elegans*, e que são hoje reconhecidos como fatores de regulação fundamentais da expressão gênica em organismos multicelulares [6; 7; 14; 15; 19; 20].

Os miRNAs são RNAs endógenos que têm por finalidade um papel regulatório importante tanto por clivagem do mRNA quanto por repressão da tradução, sendo essas moléculas responsáveis por compor uma das classes mais abundantes de agentes regulatórias em organismos multicelulares. Em organismos

vegetais, miRNAs estão envolvidos em muitos mecanismos do controle da divisão celular, exemplos: polaridade foliar e meristemática, mantimento da heterocromatina, embriogênese, desenvolvimento de meristemas, folhas, flores, anteras e sistema vascular [14; 15; 16; 18; 21].

Os miRNAs desempenham uma regulação pós transcricional na região 3' não traduzida e sua interferência depende do grau de complementaridade com o seu alvo. Se o miRNA inter-relacionar-se com alvos relativamente complementares de mRNA, ocorrerá um bloqueio na tradução, sendo este o fundamental mecanismo de atuação dos miRNAs em mamíferos. Entretanto, no caso de interação total haverá a destruição do mRNA [18; 23; 24].

Considerando tais prerrogativas, a justificativa para realização deste trabalho está embasada em demonstrar o método pelo qual ocorre o processo de silenciamento gênico. Bem como caracterizar detalhadamente os miRNAs, a sua localização no espaço tempo e a sua origem no ambiente celular elucidando os fatos e elementos moleculares principais de interferência do RNA durante a cascata das reações. Visto que esses elementos de interferência a nível transcricional e pós-transcricional induzem ao processo de silenciamento gênico quando entram em funcionalidade química com outros constituintes da replicação do material genético. Durante a realização deste estudo, será relatado ademais os atuais métodos de reconhecimento dos fragmentos de RNA, além de alguns casos de polimorfismo gerados [11; 13; 14].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de caráter exploratório descritivo, retrospectivo, qualitativo e quantitativo sobre o mecanismo de silenciamento gênico ocasionado por fragmentos de RNA construídos a partir da fita sentido de DNA. Com base em uma revisão sistemática da literatura (nacional e internacional) produzida preferencialmente nos últimos dez anos e divulgada por meio de artigos e periódicos publicados em revistas indexadas da área da Saúde, que abordaram o processo de bloqueio gênico antes e após a transcrição, bem como a regulação gênica gerada por RNAs de interferência. A busca dos artigos foi realizada entre os meses de fevereiro

e novembro de 2021, em diferentes bases de dados, LILACS, Medline, Pubmed, Biblioteca Virtual em Saúde e Scielo, e utilizando-se as palavras-chave: RNA, transcrição, silenciamento gênico, RNA de interferência, regulação gênica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização e comunicação dos microfragmentos de interferência

Nos últimos anos, o conhecimento sobre a biogênese e a forma de atuação dos miRNAs evoluiu e possibilitou de modo exponencial a análise científica dos métodos preditivos em genômica. Esses são uns dos acontecimentos que solidificam e dão estrutura a continuação de diversos segmentos analíticos que abordam o campo de estudo atrelado ao organismo humano, sendo processos iniciado em organismos geneticamente diferentes ou in vitro. O fato é que a transcrição desses genes ainda guarda detalhes complexos de difícil elaboração teórica interpretativa, tão logo seja tecnicamente provável que a etapa regulatória seja o momento chave na biogênese de miRNAs [15; 20; 22].

O principal ponto de entendimento para compreender o mecanismo de regulação é ter o conhecimento de que os miRNAs precisam, antes, ser caracterizados, atentando-se para alguns detalhes de grande importância. Exemplos: o fato de que para que uma molécula possa servir como material genético, ela deva: prover da capacidade de duplicar de modo preciso a informação e transferi-la às outras células durante a divisão; ter a capacidade de conservar informações genéticas sob uma forma biologicamente estável e de repassar essa informação a todas as partes de um corpo/conjunto celular. Além da capacidade de sofrer mudanças sob a forma de alterações mutagênicas [3; 4; 6; 18; 25].

MiRNAs são conhecidos como RNAs de fita simples, apresentando comprimento de 19 a 25 nucleotídeos (nt) de extensão, formados a partir de transcrições endógenas que podem demonstrar formações em grampo, constituindo uma extensa família de moléculas não codificantes que atuam como preceptoras em diversas vias de silenciamento genético. Podendo ser expressos em níveis muito

diferentes espacialmente e temporalmente funcionam como moléculas-guia, emparelhando-se aos RNAs mensageiros (mRNAs) alvos, levando à repressão translacional ou clivagem total do mRNA [10; 16; 22].

Inicialmente, são corpos moleculares processados como parte de uma transcrição anterior muito mais longa, tendo evidências de que a maioria dos miRNAs são resultantes de processos enzimáticos incorretos da enzima polimerase II (Pol II). Embora a enzima RNA polimerase III (pol III) também possa estar envolvida, tornando a transcrição de miRNAs um produto incompleto da transcrição de outra classe de pequenos RNAs nucleolares, sendo estes transcritos de modo independente ou codificado em íntrons de genes que codificam proteínas. Conforme demonstra a figura 1 a seguir, em que um fragmento em formato de grampo de cabelo está em processo de fragmentação ocasionado pela enzima polymerase [13; 14; 15; 20].

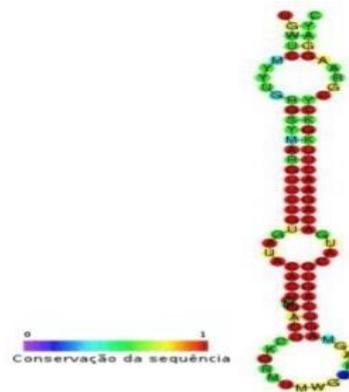


Figura 1: Imagem de um miRNA (RNA não codificador), denotando sua característica estrutural em forma de grampo de cabelo (harpin). Fonte (SILVA, 2012).

Os transcritos que geram miRNAs são caracteristicamente um pouco mais longos do que os demais RNAs transcritos pela enzima e contem sequência endógenas com mais de quatro uracilas seguidas, o que seria o sinal de término da transcrição para a RNA pol II. Vários estudos genéticos relatam a existência de três vias de silenciamento de RNA, em que corpos proteicos supressores de silenciamento codificadas por vírus evidenciaram que estas vias podem se sobrepor em alguns pontos. A primeira via é a de interferência citoplasmática

via siRNAs, que está envolvida na deterioração de RNA viral interferindo ou mesmo bloqueando o ciclo de infecção. A segunda é a via de silenciamento de mRNAs endógenos por meio de miRNAs. Os miRNAs regulam a expressão gênica negativamente por meio do pareamento de bases complementares a mRNAs alvo, resultando na quebra do mRNA ou na repressão de sua tradução [6; 8; 16; 18; 19].

A terceira via é a nuclear e, está associada à metilação de DNA e à formação de heterocromatina. Uma importante função para esta via é possivelmente proteger o indivíduo de desorganizações genômicas geradas por transposons. As três vias do silenciamento de RNA precisam de grupos de proteínas relacionadas em plantas, fungos, animais e protozoários, indicando a existência de um mecanismo antigo comum a estes organismos e às três vias, embora com diferenças significativas. Estudos científicos de engenharia química demonstraram que o silenciamento de RNA é um processo progressivo com pelo menos quatro etapas: iniciação, amplificação, sinalização sistêmica e manutenção. Conforme o conceito apresentado anteriormente, a figura 2 abaixo possibilita a observação e análise genérica do mecanismo de interferência gênica e o possível mecanismo de interferência [5; 6; 7; 25; 26].

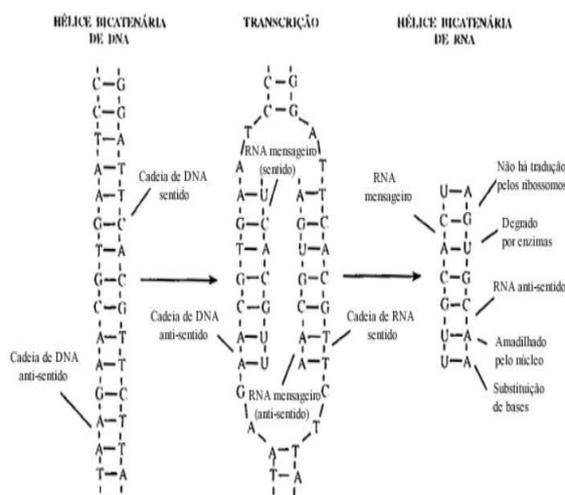


Figura 2: Imagem demonstrando a construção de fragmentos de RNA antisense a partir da fita sentida, o qual pode alterar a conformação da heterocromatina ou regular mRNAs extranuclearmente. Fonte (CRAVADOR, 1998).

Assim, a função de miRNAs começa a ser conceituada como uma troca de informações envolvendo diversos transmissores dentro da célula. A transmissão geralmente não se baseia a um efeito verdadeiro ou falso ou de liga e desliga de miRNAs, mas é mais como uma conversa contínua, sendo a expressão do próprio miRNA influenciada por muitos agentes na conversa a nível de transcrição, processamento e função [15; 18; 19].

A expressão do RNA alvo é igualmente gerida em vários níveis por miRNAs, incluindo efeitos epigenéticos, regulação do promotor, processamento de RNA, estabilidade e translação. A interação foi percebida pela primeira vez entre miRNAs e mRNAs que codificam proteínas, mas agora é reconhecido por ser mantido entre miRNAs e muitos outros tipos de RNAs. Por fim, a progressão de informações não se prende à célula onde começou. Pois a transferência célula-célula de miRNAs tem efeitos funcionais de grande abrangência, em que, alguns miRNAs são expressos em uma forma específica do estágio de desenvolvimento ou específica do tecido, enquanto outros parecem estar constitutivamente presente nos pontos em que estes fatores ocorrem simultaneamente [7; 14; 20; 27].

3.2 Origem dos microfragmentos de RNA

A observação que deu base à teoria de RNAs de interferência no controle da regulação gênica, ocorreu sistematicamente em 1993 quando se teve conhecimento do relato da clonagem e análise funcional do primeiro miRNA, em *Caenorhabditis elegans* (uma espécie de nematódeo da família Rhabditidae que mede cerca de 1 milímetro de comprimento, e que vive em ambientes temperados). Com a descoberta de *lin-4* e *let-7*, miRNAs precursores da classe de RNAs não codificadores de genes envolvidos na regulação gênica, que quando inativados em *C. elegans*, o resultado foi a diferenciação celular desregulada e a reiteração de tipos de células embrionárias em estágios futuros de desenvolvimento. Esses dois miRNAs desempenham suas funções inibindo a tradução de mRNAs alvo que contêm 3 sequências de região não traduzida (3' UTR) parcialmente complementares [15; 18; 19; 20; 25; 26; 27].



CUMMINS, 2006, relata em seus estudos duas classes de RNAs da família lin-4, uma com a composição nucleotídica de vinte e duas moléculas, os lin-4S tido como a espécie ativas de RNA em altas quantidades. A outra, por sua vez, os lin-4L, que seriam uma espécie menos abundante composta por aproximadamente sessenta moléculas nucleotídicas, podendo ser este um corpo molecular de processamento pós-transcricional de lin-4S. Usando uma analogia com o comprovado mecanismo de ação do lin-4 e let7, foi proposto que os miRNAs atuam como repressores antisentido da tradução do RNA mensageiro por complementariedade de base não perfeita com as 3 UTRs de um ou mais genes alvo [15; 18; 28; 29; 25].

MiRNAs e seus alvos demonstram constituir conexões regulatórias altamente complexas e diversificadas, logo que um único miRNA pode se ligar e regular muitos alvos de mRNA distintos e, inversamente, vários miRNAs diferentes podem se unir e controlar conjuntamente um único alvo de RNA. O ponto de estudo que alberga entre os vários centros de pesquisa, está envolvido em entender de que forma os miRNAs regulam determinados processos gênicos, para isto, é necessário o entendimento de como os próprios miRNAs são controlados [6; 14; 20; 22; 30; 31].

MiRNAs seguem uma posição constante de localização gênica, correspondente aos espaços intergênicos ou em direção antisentido para genes anotados, indicando que sua origem se forma de modo interdependente. A grande parte dos outros genes de miRNAs estão presentes em regiões intrônicas, que podem ser transcritas como parte dos genes anotados [6; 14; 20; 22; 30; 31].

3.3 Funcionalidade

MiRNAs atuam sendo guias de sequência imperfeita para conduzir um complexo de ribonucleoproteína (RNP) ao RNA complementar. Usando esse modelo, os miRNAs agem de maneira semelhante a outros componentes de RNA de RNPs, nomeadamente para fornecer um componente de ligação específico de sequência para permitir que o RNP atue em um determinado alvo. O complexo miRNA RNP é chamado de complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o RISC utiliza um pequeno RNA

(miRNA) para direcionar a sequência específica de recrutamento do RISC para o seu RNA alvo [4; 30; 31; 32; 33].

Geralmente, os miRNAs não agem para silenciar completamente seu gene alvo de interesse, mas para diminuir a sua expressão. Da mesma forma, os próprios miRNAs às vezes são considerados neste modelo sendo ativo ou inativo. Na verdade, existem exemplos onde miRNAs têm notável especificidade de tecido (por exemplo, miRNA-122 no fígado), existem também casos de forte indução de miRNAs em tempos de desenvolvimento. Frequentemente, miRNAs são expressos em vários tipos de células e tecidos e possuem diferentes níveis de expressões, mas raramente se encaixam no esquema de "ligado ou desligado" [3; 6; 14; 18; 26; 31; 33].

Existem muitos relatos dos mecanismos pelos quais os miRNAs reduzem à expressão de suas proteínas-alvo cognatas, onde pode-se incluir a degradação de RNA. Além disso, são relatados a deadenilação induzida, ligação de proteína cap alterada, ribossomo reduzido, ocupação e sequestro do mRNA da máquina de tradução. Esses processos não são mutuamente exclusivos e alguns resultam na diminuição dos níveis de mRNA enquanto outros atuam apenas para diminuir a expressão da proteína, assim como demonstra a figura 3 a seguir, em que um microfragmento adere-se à uma região codificadora. [3; 6; 14; 18; 26; 31; 33].

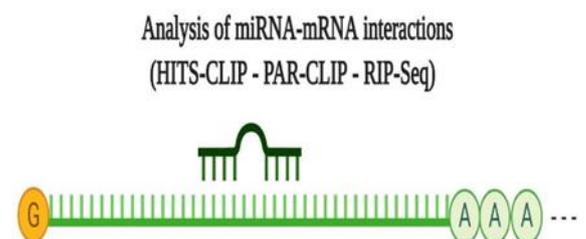


Figura 3 (Análise de interações miRNA-mRNA): Modelo de pareamento entre fragmento de RNA e a molécula de mRNA, demonstrando o mecanismo de interferência. Fonte (Pawlick et al., 2020).

3.4 Regulação de miRNAs



A expressão de miRNA pode ser regulada em várias etapas durante a biogênese do RNA, embora continue a se determinar qual etapa é controlada e como esse controle é alcançado. A regulação transcricional, ativação ou inibição, repressão epigenética e taxas de degradação controladas são possivelmente os mecanismos de controle principal, embora alguns miRNAs demonstrem ser controladas a nível pós-transcricional. As expressões de análise de perfil indicam que a maioria dos miRNAs estão, sob o controle de sinalização de desenvolvimento ou tecido específico, ou ambos [3; 31; 33].

Algumas pistas desses processos podem ser adquiridas quando se observa o relato de que a proliferação celular anormal é uma marca registrada dos cânceres humanos, em que há a especulação de que parece possível que a expressão de miRNA padrões pode denotar o estado maligno. Em alguns casos a expressão alterada de alguns miRNAs foi encontrada em vários tipos de tumores, contudo, o potencial de expressão de miRNA para informar o diagnóstico de câncer não foi explorado criteriosamente [6; 14; 20; 30; 34].

MiRNAs intrônicos são frequentemente regulados por seu gene hospedeiro e processado a partir do íntron, mas podem ter uma região promotora distinta, já miRNAs intergênicos normalmente têm elementos promotores autônomos. A meia-vida de um miRNAs é geralmente longa e muitos podem persistir por 5 dias ou mais; no entanto, alguns miRNAs têm rotatividade rápida, onde vários fatores podem ser responsáveis pela estabilidade dos miRNAs. Por exemplo, a sua biodisponibilidade em diferentes tecidos e a atuação dos complexos proteicos que atuam no processamento destes segmentos de interferência [26; 30; 31; 32; 33].

Múltiplos estudos têm usado miRNAs como diagnóstico isoladamente ou em combinação com outros biomarcadores conhecidos. Os estudos iniciais que examinaram a expressão de miRNAs, usaram tecidos para determinar reações funcionais e diagnósticas de miRNAs. Os fluidos corporais estão mais prontamente disponíveis e menos invasivos (em alguns casos) do que biópsias. MiRNAs são secretados por células através de exossomos e vesículas extracelulares, continuando estáveis nos fluidos corporais podendo ser separados de sangue (soro e plasma), saliva, urina, fezes, fluido folicular,

fluido sinovial, suco pancreático, bile, suco gástrico e outros fluidos corporais que são examinados como biomarcadores para doenças. Os miRNAs também têm a capacidade de indicar o tipo de célula que está sendo analisada, o exemplo mais conhecido é o miRNA específico do fígado, miR-122 [6; 14; 31; 32; 33].

Foi analisado, ainda, o potencial de atingir centenas de mRNAs devido à imperfeita complementaridade necessária para a ligação, logo que o sequenciamento de RNA para alvos de miRNA reconheceu centenas de alvos para um único miRNA. Uma maneira de abordar a função de um miRNA ou família de miRNAs, é determinar uma via ou função celular que provavelmente altera usando métodos preditivos [3; 8; 20; 30].

3.5 Regulação de miRNAs a nível sistêmico

Até agora, foram descritos miRNAs que se comunicam em um contexto celular único, contudo miRNAs têm a capacidade de se comunicar com outras células ou tecidos. Como discutido acima, miRNAs são secretados em exossomos ou microvesículas, esses secretados são muito estáveis e podem ser absorvido pelas células do tecido circundante ou se as vesículas atingirem a circulação pode atingir locais distantes [20; 30; 31].

A observação de que a expressão de miRNA parece integralmente maior em tecidos normais em comparação com tumores levou à hipótese de que a expressão de miRNA global reflete o estado de diferenciação celular. Para testar esta abordagem, foi explorado em um modelo experimental em que trataram a linha celular de leucemia mieloide HL-60 com transácido retinóico, um potente indutor de diferenciação neutrofílica. Como previsto, o perfil de miRNA demonstrou a inferência de muitos miRNAs coincidente com a maturação. Esses experimentos apoiam a hipótese de que mudanças inteiras na expressão de miRNA estão ligadas com a diferenciação, cuja revogação é uma marca conhecida de todos os cânceres humanos [8; 32; 33; 34].

Estudos observaram que perto de 9% de todos os genes de mamíferos têm mais de um local de miRNA alvo em suas 39 UTRs, com 1.314 sendo candidatos mais fortes com mais de dois sítios de ligação. Por outro lado, algumas



hipóteses indicam que nem todas as interações de miRNA - mRNA teriam um efeito biológico a menos que ambos miRNA e mRNA fossem expressos na mesma magnitude, ao mesmo tempo, na mesma célula e em concentração satisfatória. Isto é, atualmente não se sabe se alguns miRNAs controlam a expressão de genes de miRNA, ou seja, a progressão da transcrição de miRNA para miRNA maduro. As estimativas demonstram que existem cerca de 1.000 moléculas de miRNA por corpo celular, com algumas células podendo exceder 50.000 moléculas [31; 32; 35; 36].

A dinâmica de miRNAs demonstra que estes podem afetar a expressão de RNAs direta ou indiretamente para alterar a função celular, não surpreendentemente, RNAs também podem afetar a expressão de miRNA por meio de ligações exclusivas da sequência que alteram o processamento. Assim, miRNAs funcionam como guias específicos de sequência para direcionar um RNP funcional para o alvo RNA de interesse. Quando o objetivo é um mRNA que codifica uma proteína, o resultado mais imaginável da ligação do miRNA é a diminuição da expressão da proteína alvo. Contudo, o efeito geralmente não é para silenciar a expressão, mas sim um efeito mais mimetizado para diminuir os níveis de proteína podendo ser amplificado pela ligação de vários miRNAs a um único alvo, ou pelo direcionamento de várias proteínas na mesma via [6; 20; 31; 32; 33].

3.6 Localização dos miRNAs

Os genes de miRNA estão espalhados em todos os cromossomos humanos com exceção para o cromossomo Y. Aproximadamente 50% de miRNAs conhecidos são encontrados em grupo, sendo eles originados como transcritos primários policistrônicos. Os miRNAs em um determinado sítio são frequentemente relacionados a cada outro, indicando que o agrupamento de genes é um resultado de duplicação gênica, em que, um agrupado de genes de miRNA também costuma conter miRNAs não relacionados [30; 31; 33].

Inicialmente, pensou-se que a maioria dos genes de miRNA eram localizados em regiões intergênicas. Porém, recentes análises de localizações de genes de miRNA mostraram que a maioria (70%) dos genes de miRNA de

mamíferos estão localizados em unidades de transcrição definidas (TUs), combinando conjuntos de genoma atualizados e bases de dados de etiqueta de sequência expressa (EST) [14; 30; 37].

RODRIGUES et al., 2007, demonstrou que muitos genes de miRNA (117 de 161), foram encontrados nos íntrons na posição sensorial, que é mais do que o previsto, destes 117 miRNAs intrônicos, 90 miRNAs são encontrados nos íntrons de genes que codificam proteínas, enquanto 27 estão nos íntrons de RNAs não codificantes (ncRNAs). Em alguns casos, os miRNAs estão presentes em um exon ou em um íntron ('misto'). Assim, os genes de miRNA podem ser diferenciados com base em suas localizações genômicas: miRNAs intrônicos na codificação de proteínas; miRNA intrônico em TU não codificantes; e miRNA exônico em TU não codificante [31; 34].

3.7 Geração de miRNAs e o processo de silenciamento

A transcrição é feita de genes individuais ou grupos seletivos de genes (OPERONS), pela RNA polimerase (principal enzima envolvida no processo). A regulação da transcrição de um determinado gene ou operon depende do seu promotor, este promotor funciona como um gene regulador colocado antes do ponto de início da transcrição de um gene estrutural ou de um operon. A região promotora é reconhecida pela RNA polimerase e, desde que a transcrição não esteja bloqueada por nenhum repressor, esta correrá pela fita em busca do ponto de iniciação. A enzima RNA polimerase é um complexo proteico composto de cinco regiões ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, Ω), tendo ainda outros fatores auxiliando a sua função (Σ , ρ) [1; 8; 14; 30; 31; 33].

O ponto inicial da transcrição envolve a presença de fatores e enzimas que formam um complexo de reconhecimento, onde o fator Ω que reconhece o ponto de início da transcrição trazendo consigo a RNA polimerase. Após ser reconhecido, o fator Ω se dissocia para ser reutilizado em outra transcrição e a partir de então a RNA polimerase inicia a formação de polímeros de ribonucleotídeos complementares à cadeia de DNA que será transcrita. A presença de um outro fator, o NusA se liga a RNA polimerase indicando o início do processo de finalização da transcrição gênica, entretanto, o

ponto final da transcrição só é reconhecido pela presença do fator ρ . A sequência de reconhecimento do fator ρ geralmente é assinalada por sequências da mesma cadeia de DNA que podem se parear formando uma conformação em grampo [1; 3; 6; 11; 30; 38].

Após a transcrição, miRNAs sofrem clivagens nucleares pela RNase III endonuclease Drosha, produzindo 60 a 70 nt de miRNA primário (pré-miRNA) com um fosfato 5' e uma protuberância de 2 nt [39]. Drosha é uma proteína de 160 kDa, que é conservada em animais e que requer um cofator, a proteína do gene 8 da região crítica da síndrome de DiGeorge (DGCR8), em humanos, Drosha e DGCR8 formam um grande complexo proteico de 650 kDa. O produto Drosha - pré-miRNA, confinados ainda no núcleo precisa ser levado para o citoplasma [3; 11; 35; 36; 40; 41].

A exportação de pré-miRNA é mediada por um dos transportadores nucleares dependente de Ran receptor por meio da rede nuclear da membrana, dependente da proteína exportin-5 (Exp5). Seu cofator Ran-guanosina trifosfato (GTP), no citoplasma, é hidrolisado para difosfato de guanosina (GDP) e Exp5 / Ran-GDP em seguida libera sua carga. Quando Exp5 é esgotado por RNAi, os miRNAs maduros são diminuídos, mas o pré-miRNA não se acumula no núcleo. Este evento sugere que o pré-miRNA pode ser relativamente instável e também que pré-miRNA pode ser estabilizado por meio de sua interação com Exp5 [3; 11; 35; 36; 40; 41].

Na exportação, pré-miRNAs são processados em 22-nt duplex de miRNA no citoplasma pela próxima enzima de processamento, RNase III Dicer, sendo esta uma ribonuclease de 200 kDa que reconhece mRNAs alvo por meio de interações de complementariedade de pares base, que semelhante a Drosha, se associa a um parceiro contendo dsRBD. Esta é confinada ao citoplasma, cliva o pré-miRNA no citosol a cerca de duas voltas helicoidais das extremidades do pré-miRNA em que ocorre o pareamento de pares de base, produzindo RNA duplex para que este de fita dupla seja então desenrolado pela helicase, clivando-o em uma direção específica da fita. Um dos fios desenrolados é tão logo agrupado em um complexo de partícula ribonuclear (RNP), induzido por RNA complexo de silenciamento (RISC), cada RISC contém um membro do

Família de proteínas Argonaute, que se liga fortemente ao RNA no complexo, conforme demonstra a figura 4 a baixo [6; 28; 30; 31; 33; 35; 41].

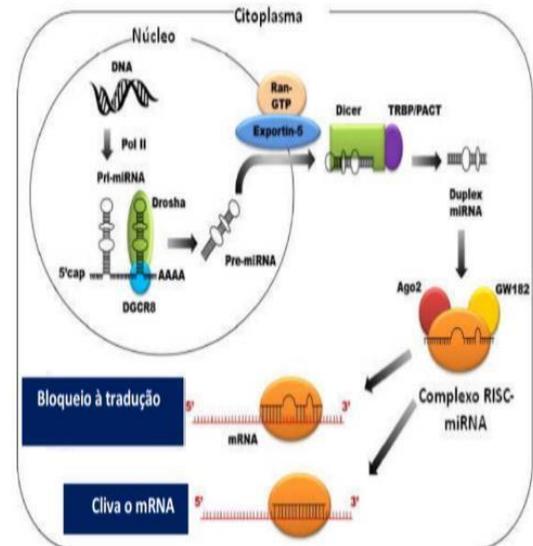


Figura 4: método de silenciamento por miRNAs. No citoplasma da célula, o miRNA maduro composto por uma dupla fita de RNA é aberto por uma helicase e em seguida é transferido para o complexo RISC. Se o miRNA for transportado pelo complexo RISC Ago2, o mRNA alvo é clivado e degradado, entretanto, se o miRNA for transportado pelo complexo RISC Ago1-4 ocorrerá a supressão da tradução. Fonte (SILVA, 2010).

O principal efetor de cada RISC é um membro da família de proteínas Argonaute (Ago), cujos membros todos contêm um domínio PAZ central (denominado após as proteínas do membro da família Piwi, Argonaute e Zwiille) e um domínio PIWI carboxi-terminal. Estudos estruturais despontam que o domínio PIWI se liga a pequenos RNAs em sua extremidade 5', enquanto o domínio PAZ se liga à extremidade 3' da fita simples RNAs. Análises genéticas em *Arabidopsis* apontaram que AGO1 está relacionada nas vias de silenciamento mediadas por miRNAs, enquanto AGO4 está envolvida em modificações na cromatina. O complexo RISC possui atividade catalítica que cliva especificamente o mRNA alvo sem afetar o siRNAs guia. A subunidade catalítica é conhecida como Slicer, e foi demonstrado que mutações em AGO2 de mamíferos bloqueiam a capacidade de clivagem do RISC, apontando



que AGO2 é a própria proteína Slicer [5; 14; 22; 30; 33; 41; 42].

MiRNAs maduros são eventualmente transferidos para proteínas Argonaute junto ao complexo efetor, conhecidos como 'miRNP', 'mirgonaute' ou, mais geralmente, 'miRISC' (complexo de silenciamento induzido por RNA contendo miRNA). Durante a montagem de RISC, o produto de clivagem (duplexes de miRNA 22-nt) são rapidamente convertidos em fios simples. Subsequentemente, um fio deste duplex de curta duração desaparece, enquanto a outra vertente permanece como um miRNA maduro para servir como guias no silenciamento de RNA, além de serem os efetores do silenciamento de genes, as proteínas Argonaute também contribuem para a biogênese de miRNA selecionando ou ligando-se a estes e posteriormente estabilizando miRNAs maduros [30; 31; 36; 40].

Drosha provavelmente diferencia não apenas se uma transcrição codifica um miRNA ou não, mas também se um miRNA primário transcrito é uma essência qualificada, além disso, Drosha é um fator determinante de que parte de uma transcrição primária se tornará o maduro miRNA. Os locais de clivagem escolhidos por Drosha em grande parte ditam onde a Dicer irá posteriormente dividir e, portanto, após a seleção da fita, qual fita de RNA permanece como o produto final. Muitos miRNAs têm extremidades heterogêneas, provavelmente como resultado de RNA-Drosha flexível e / ou Interações RNA-Dicer. Conhecer o ponto onde Drosha atua e a clivagem de Dicer é importante por dois detalhes principais: primeiro, os locais de clivagem apontam a sequência de miRNAs maduros que são expressos endogenamente ou ectopicamente para o propósito de RNA de interferência; em segundo lugar, os locais de clivagem influenciam diretamente a função de miRNAs [8; 40; 41].

3.8 Identificação de miRNAs – modo geral de categorização

MiRNAs são diferentes de pequenos RNAs interferentes (siRNAs), tão logo que os siRNAs são sintetizados a partir de uma extensa fita dupla de RNAs (dsRNAs). Quando um pequeno RNA é reconhecido por clonagem de DNA (cDNA), alguns critérios são importantes

para que este possa ser classificado como um miRNA. Inicialmente, a pequena sequência de RNA deve estar localizada em um braço da estrutura em grampo, que precisa de grandes voltas ou protuberâncias internas. As estruturas em grampos são comumente formadas de 80 nt em animais, mas os comprimentos são mais diversos em plantas. As pequenas sequências de RNA devem ser gravadas filogeneticamente em espécies puramente relacionadas [25; 30; 31; 36; 37].

A sequência é em regra menor na região do loop (circuito observado) do que no segmento de miRNA maduro. Em segundo lugar, sua expressão deve ser comprovada por hibridização com um RNA fracionado por tamanho da amostra, caracteristicamente por Northern blotting. O borrão caracteristicamente mostra a forma madura (uma banda 22-nucleotídeos) e a de grampo precursor (uma banda 70-nucleotídeos). Quando a expressão é ínfima para detecção, o precursor putativo do pequeno RNA clonado tem uma estrutura reputada em grampo que pode ser escrito como um miRNA. RNAs pequenos que não atendem à estas características podem ser qualificados sendo siRNAs ou outras classes provisórias [25; 30; 31; 36; 37].

3.9 Variações de polimorfismo

O mapeamento do genoma humano compreende uma análise precisa de cada conjunto de alelos que possa ser estudado afim de se determinar o correto funcionamento genético, evidenciando o estado ativo de cada segmento de DNA. Para isso, o sequenciamento é utilizado em muitas ocasiões para o reconhecimento de novos polimorfismos ou mutações que podem resultar em uma determinada doença [41; 43].

A contribuição relativa do mRNA na degradação e repressão translocacional tem sido testada usando ensaios de microarray e perfil de ribossomo. Observou-se a relação do efeito do miRNAs sendo mediado indiretamente por diminuição de expressão dos níveis gerais de mRNA alvo, sustentando a prerrogativa de que um modelo onde miRNAs causam diminuição da expressão de seus alvos é bem suportado. No entanto, nem todas as interações de miRNAs funcionais envolvem uma redução na expressão do gene alvo. Isto, porque a complementaridade da sequência entre o miRNAs e seu alvo está



localizada preferencialmente na extremidade 5' do miRNA, denominado seed18, ponto chave para levar ao processo de interferência [30; 31; 32; 33; 44].

Um aspecto da pesquisa de miRNAs é a capacidade de um único miRNAs ter funções opostas em sistemas diferentes, demonstrando a comunicação de miRNAs e o contexto dependente. Um exemplo é o miR-125b no câncer, regulado negativamente em vários tipos de cânceres, por exemplo: hepatocelular e mama, enquanto super expressos em colorretal, pancreático e algumas leucemias. Os resultados indicam que o miR-125b tem a capacidade tanto oncogênica quanto tumoral supressora sujeita ao tecido / ambiente. As modificações da extremidade 3' dos mRNAs alteram a estabilidade do RNA, principalmente por permitir o decapeamento da extremidade 5' seguido pela degradação da exonuclease [30; 31; 32; 45].

A modificação de miRNAs demonstrou ter várias funções, podendo ocorrer uridilação em ambos os miRNAs precursores (pré-miR) e miRNAs maduros, que embora essas modificações 3' do miRNA afetem a estabilidade, elas provavelmente não alteram o direcionamento de mRNA. Outra edição de RNA de transcritos de miRNAs primários, bem como precursores, ocorre como desaminação de adenosina em inosina, essa alteração não muda apenas o nucleotídeo, mas também a estrutura do miRNA precursor [32; 41; 44; 48].

Alterações na estrutura secundária de miRNAs têm a capacidade de alterar a forma como as proteínas de ligação ao RNA podem interagir, potencialmente inibindo o processamento de Drosha ou Dicer das formas primárias e precursoras. A regulação da expressão gênica baseada em miRNAs geralmente ocorre por meio de ligação de miRNA à região 3' não traduzida do mRNA alvo. O comprimento da 3'UTR é uma característica do gene alvo, mas pode ser alterada através do uso de clivagem alternativa e sinais de poliadenilação (PAS) [32; 41; 44; 48].

O PAS geralmente consiste em um hexanucleotídeo 5'AAUAAA, mas variantes de base única são descritas. Normalmente, após o códon de terminação um gene terá várias sequências semelhantes à AAUAAA, permitindo o uso alternativo. A poliadenilação alternativa pode encurtar ou alongar a 3'UTR

dependendo se um sinal a reverso se torna ativo ou se o PAS canônico for ignorado e um sinal próximo a esta região é empregado, assim, a poliadenilação alternativa pode resultar na perda ou ganho de sítios de ligação de miRNA [32; 41; 44; 48].

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são variações de base relativamente comuns em que uma substituição de base é herdada; geralmente, existem apenas dois alelos em um determinado local em sequência comum e o SNP (presente em ~ 1–5% dos indivíduos). SNPs são herdados e fisicamente ligados ao material genético vizinho, a maioria não muda o fenótipo celular, mas pode ser usado como um marcador de doença quando um gene próximo carrega uma mutação (muitas vezes a mutação é desconhecida e o SNP atua como um meio conveniente para inferir a mudança local). No entanto, vários SNPs mudam a função de seu host gene; alguns também alteram a função ou expressão do miRNA, podendo uma única mudança de base impactar a função do miRNA de várias maneiras [32; 41; 44; 46; 48].

Estima-se que no genoma humano existam mais de 10 milhões de variações do Sequência de DNA de diferentes tipos, sendo polimorfismos de mudança de um nucleotídeo (SNP) as mais encontradas. Para o estudo dos diferentes tipos de polimorfismo, são usadas diferentes metodologias e abordagens de acordo com as características de cada um. Para analisar repetições tandem curtas (STR) e número variável de repetições tandem (VNTR) a amplificação por PCR é frequentemente usada na análise do tamanho dos fragmentos amplificados. Além disso, se dispõe de várias técnicas que podem ser utilizadas em todos esses polimorfismos e que têm sido utilizadas até agora no estudo de grandes rearranjos: o OLA (ensaio de ligação de oligonucleotídeo), OLA semiquantitativo, MLPA (amplificação de sonda dependente de ligação multiplex), PCR quantitativo, PCR semiquantitativo multiplex, entre outros [43; 44; 47; 48].

MARTÍNEZ et al, 2007 relata em seu trabalho técnicas prévias de pesquisa, como polimorfismos de conformação de cadeia única (SSCP) ou eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), que facilita o reconhecimento de mutações pontuais nos pontos de secção analisados. No entanto, eles precisarão ser sequenciados para determinar a mutação detectada. Os autores relatam ademais,



diversas metodologias de alto padrão para sequenciamento de DNA com base em clusters, que empregam técnicas como pirosequenciamento, ou em sequenciamento por ligação permitindo sequenciar grandes quantidades de DNA, podendo exceder 100 Mpb (milhões de pares de bases) em um único ensaio. Atualmente chips de resequenciamento também têm sido usados para sequenciar fragmentos de DNA conhecidos, principalmente para a pesquisa de mutações causadoras de doenças [41; 44; 46; 47; 48].

3.10 Modo de atuação do profissional Biomédico na contribuição para o desenvolvimento de novas metodologias envolvendo miRNAs de interferência

Conforme a regulamentação vigente assegurada pela lei federal nº. 6.684, de 03 de setembro de 1979 e pelas Resoluções nº 78 e nº 83, de 29 de abril de 2002 do CFBM: o profissional Biomédico habilitado em biologia molecular ou em genética está apto a redigir e gerir projetos de cunho técnico científico voltados à área de sequenciamento, análise genética e molecular do genoma humano, podendo se utilizar dos mais recentes modelos de tecnologia oferecidos pelo campo da área de interesse biológico [49; 50].

Ademais, a atual importância gerada pela presença deste profissional no mercado de trabalho leva empresas voltadas a área da saúde, mais precisamente do ramo tecnocientífico e especialmente do ramo clínico, a adotarem medidas de captação estruturadas e de alto grau de qualidade para a apropriação desta mão de obra qualificada. Com isso, os atuais métodos e tratativas pedagógicas utilizados levam os centros de ensino a atuarem de maneira elaborada para a formação deste profissional [49; 50].

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o tema elaborado e aqui discutido, depreende-se do significado das moléculas de miRNAs e o papel desses constituintes moleculares no conceito de regulação gênica. É prontamente discutível que tais constituintes fazem parte de um complexo sistema de regulação, onde variados processos

de desequilíbrio biológico tenham seu fundo patológico envolvido com o ritmo descompensado da regulação do material genético ligado a irregularidade dos RNAs não codificantes.

Alguns aspectos atuais buscam a modulação desses corpos moleculares para atuarem como repressores em vias sistêmicas do desenvolvimento genético, como por exemplo o uso em organismos transgênicos. Outro ramo de total interesse é poder desenvolver sistemas capazes de identificar o papel desses constituintes em diferentes processos patológicos do organismo humano, ponderando aspectos de especificidade e tempo de meia vida, em que o efeito funcional das mudanças de expressão de miRNAs, perfis de expressão de RNA podem servir como marcadores de diagnóstico. Uma perspectiva futura é que os padrões de miRNA associados com resultados específicos podem, em última análise, fornecer conhecimentos nas etiologias subjacentes da doença e descobrir alvos terapêuticos. Uma perspectiva especialmente interessante é o potencial para miRNAs para servir como marcadores de alerta precoce para o câncer em estágio de iniciação ou progressão.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Andrade, João Antônio da Costa; DE AGRONOMIA, **Curso. APONTAMENTOS DE GENÉTICA**. 2009.
- [2] NUSSBAUM, Robert. **Thompson & Thompson genética médica**. Elsevier Brasil, 2008.
- [3] Costa, Everton de Brito Oliveira; Pacheco, Cristiane. **Micro-RNAs: Perspectivas atuais da regulação da expressão gênica em eucariotos**. Biosáude, v. 14, n. 2, p. 81-93, 2012.
- [4] Correia, J. H. R. Dias; Correia, A. A. Dias. **Funcionalidades dos RNA não codificantes (ncRNA) e pequenos RNA reguladores, nos mamíferos**. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, v. 8, n. 10, p. 1-22, 2007.
- [5] Zerbini, Francisco Murilo; Alfenas, Poliane Ferreira; Andrade, Ec De. **O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus**. Revisão anual de patologia de plantas, v. 13, p. 191-244, 2005.
- [6] França, Natália Regine de. **Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia**



nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 695-702, 2010.

[7] Barbosa, Angela Silva; Lin, Chin Jia. **Silenciamento de genes com RNA interferência: um novo instrumento para investigação da fisiologia e fisiopatologia do córtex adrenal**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 48, p. 612619, 2004.

[8] Menck, Carlos Frederico Martins. **A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica**. Estudos avançados, v. 24, p. 99-108, 2010.

[9] Cravador, Alfredo. **Os DNA sintéticos antissentido**. Química Nova, v. 21, n. 4, p. 441-452, 1998

[10] Read, A.P. E; Strachan, T. **Genética Molecular Humana**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Artmed Editora, 2001.

[11] Pinto, Joana Margarida Teixeira. **Recuperação de microRNA através de Partículas Magnéticas**. 2017.

[12] Woski, Stephen A.; Schmidt, Francis J. **DNA e RNA: Composição e estrutura**. Manual de bioquímica: com correlações clínicas, p. 29, 2011.

[13] Snustad, P. E; Simmons, M. J. **Fundamentos de Genética**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

[14] Brantl, Sabine. **Antisense-RNA regulation and RNA interference**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, v. 1575, n. 1-3, p. 15-25, 2002.

[15] Oberstrass, J.; Nellen, W. **Genes regulating with antisense RNA**. Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA, CRC Press, LLC, p. 171-195, 1997.

[16] Zeng, Yan; Cullen, Bryan R. **Sequencerequirements for micro-RNA processingandfunction in humancells**. Rna, v. 9, n. 1, p. 112-123, 2003.

[17] Matte, Ursula; Oliveira, Fernanda; GIUGLIANI, Roberto. **Atualizando o código genético: o RNA de interferência—um comentário sobre o prêmio nobel de medicina e fisiologia de 2006**. Clinical&BiomedicalResearch, v. 26, n. 3, 2006.

[18] Wagner, E. Gerhart H.; Simons, Robert W. **Controle de RNA anti-sentido em bactérias, fagos e plasmídeos**. Revisão anual de microbiologia, v. 48, n. 1, pág. 713-742, 1994.

[19] Delilhas, Nicholas. **Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs**. Molecular microbiology, v. 15, n. 3, p. 411-414, 1995.

[20] Lustosa, Cátia Valderês dos Santos Faria. **Interferência de RNA para silenciamento gênico da enzima NO sintase neuronal (nNOS) no modelo in vitro de neurodegeneração por interferon gama**. 2013.

[21] Aragão, Francisco JI; Ibrahim, Abdulrazak B.; Tinoco, M. L. **RNA interferente**. Ômicas, v. 360, p. 69-94, 2013.

[22] Lee, Yoontae et al. **MicroRNA genes are transcribedby RNA polymerase II**. The EMBO journal, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

[23] Silva, Michelle Paula. **Aplicação da técnica de interferência por RNA para inibição de tumor, e microRNAs com função supressora de tumor**. 2010.

[24] Rodríguez, Mariano Esteban. **ARN interferente: del descubrimiento a sus aplicaciones**. In: Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2007.

[25] Souza, Gabriela Regina Rosa. **Desenvolvimento de nanopartículas híbridas para terapia por RNA de interferência: silenciamento de genes-chave na sobrevivência celular em câncer de mama**. 2016.

[26] Bento, Flavia de Moura Manoel. **Silenciamento gênico por interferência de RNA (RNAi) em traça-do-tomateiro, Tuta absoluta (Meyrick), utilizando bactérias expressando dupla fita de RNA (dsRNA)**. 2017.

[27] Meister, Gunter. **Sequence-specific inhibition of microRNA-and siRNA-induced RNA silencing**. Rna, v. 10, n. 3, p. 544-550, 2004.

[28] Calin, George Adrian. **Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia** Proceedings of the national academy of sciences, v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

[29] Zeng, Y. **Principles of micro-RNA production and maturation**. Oncogene, v. 25, n. 46, p. 6156-6162, 2006.

[30] Wagner, E. Gerhart H.; Brantl, Sabine. **Kissing and RNA stability in antisense control of plasmid replication**. Trends in



biochemical sciences, v. 23, n. 12, p. 451-454, 1998.

[31] Nordström, Kurt; Wagner, E. Gerhart H. **Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA.** Trends in biochemical sciences, v. 19, n. 7, p. 294-300, 1994.

[32] Mott, Justin L.; Mohr, Ashley M. **Overview of microRNA biology. In: Seminars in liver disease.** NIH Public Access, 2015. p. 3.

[33] Nellen, Wolfgang; Sczakiel, Georg. **Ação in vitro e in vivo do RNA antisense. Biotecnologia molecular,** v. 6, n. 1, pág. 7-15, 1996.

[34] Lu, Jun. **Os perfis de expressão de microRNA classificam os cânceres humanos.** natureza, v. 435, n. 7043, pág. 834-838, 2005.

[35] JOHN, Bino. **Human microRNA targets.** PLoS Biol, v. 2, n. 11, p. e363, 2004.

[36] Kim, V. Narry; Nam, Jin-Wu. **Genomics of microRNA. TRENDS in Genetics,** v. 22, n. 3, p. 165-173, 2006.

[37] Cummins, J. M.; Velculescu, V. E. **Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis.** Oncogene, v. 25, n. 46, p. 6220-6227, 2006.

[38] Jobling, M.; Hurles, M. & Tyler-Smith, C. **Human Evolutionary Genetics: Origins, Peoples Disease, 2004.**

[39] Lu, Thomas X.; Rothenberg, Marc E. **MicroRNA. Journal of Allergy and Clinical Immunology,** v. 141, n. 4, p. 1202-1207, 2018.

[40] Januário, Arilton; Júnior, Bacelar. **A engenharia genética como nova metodologia de combate ao HIV: A terapia gênica, a interferência por RNA e suas aplicações.** 2015.

[41] Pereira, Tiago Campos. **Estudo de possíveis aplicações médicas da interferência por RNA.** 2005.

[42] Du, Tingting; Zamore, Phillip D. **microPrimer: the biogenesis and function of microRNA.** 2005.

[43] Martínez-Hervás, S.; García-García, A. B.; Chavesa, F. J. **Técnicas para el estudio del ADN y el ARN. Introducción al estudio de proteínas.** Av. diabetol, p. 419-424, 2007.

[44] Amaral, Murilo Sena. **Identificação de RNAs longos não-codificadores de proteínas regulados por micro-RNAs.** 2013.

[45] Pillai, Ramesh S. **MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA.** Rna, v. 11, n. 12, p. 1753-1761, 2005.

[46] Mohr, Ashley M.; MOTT, Justin L. **Overview of microRNA biology. In: Seminars in liver disease.** Thieme Medical Publishers, 2015. p. 003-011.

[47] Tanzer, Andrea; Stadler, Peter F. **Molecular evolution of a microRNA cluster.** Journal of molecular biology, v. 339, n. 2, p. 327-335, 2004.

[48] Silva, Tulio Conrado Campos **Identificação de RNA não codificador utilizando redes neurais artificiais de treinamento não supervisionado.** 2012.

[49] Silva, Grace Kelly Correia; Ventura, Rogéria Maria. **A Importância do Biomédico na Biologia Molecular e Hematologia Forense.** Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753), v. 10, n. 4, p. 166-175, 2020.

[50] Kischinevzky, Claudia Andrea Segal (Ed.). **Manual de Practicas Biologia Molecular de la Celula L.** UNAM, 2005.

[51] Pawlick JS, Zuzic M, Pasquini G, Swiersy A e Busskamp V (2021) **MiRNA Regulatory Functions in Photoreceptors.** *Frente. Cell Dev. Biol.* 8: 620249. doi: 10.3389 / fcell.2020.62