

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Átilla Ferreira Cavalcanti

**Produção de Linhagens de Células HeLa
Estavelmente Silenciadas para o Gene NRF2
Através de Vetor Lentiviral**

Rio de Janeiro
2018

Átilla Ferreira Cavalcanti

**Produção de Linhagens de Células HeLa
Estavelmente Silenciadas para o Gene NRF2
Através de Vetor Lentiviral**

Dissertação de Mestrado Profissional submetida ao curso de Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

**Orientadores: Prof. Dr. Ulisses Gazos Lopes
Prof. Dr. Aíslan de Carvalho Vivarini**

Coorientador: Dra. Karina Luiza Dias Teixeira

**Rio de Janeiro
2018**

Ficha Catalográfica

C376p Cavalcanti, Átilla Ferreira
Produção de Linhagens de Células HeLa
Estavelmente Silenciadas para o Gene NRF2 Através
de Vetor Lentiviral / Átilla Ferreira Cavalcanti.
- Rio de Janeiro, 2018.
93 f.

Orientador: Ulisses Gazos Lopes.
Coorientador: Karina Luíza Dias Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, 2018.

1. Vetores Lentivirais. 2. RNA de Interferência.
3. shRNA. 4. Silenciamento Gênico. 5. NRF2. I.
Lopes, Ulisses Gazos, orient. II. Teixeira, Karina
Luíza Dias, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Ulisses Gazos Lopes.

***“O impossível existe até que
alguém duvide dele e prove o
contrário.”***

Albert Einstein

***Dedico totalmente este trabalho a minha
mãe Maria Zulena Ferreira Cavalcanti (In
memoriam), minha maior incentivadora e
que sempre acreditou no meu potencial,
quando todos me ignoraram, ela continuou
acreditando.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Ulisses Gazos Lopes e Dra. Karina Luiza Dias Teixeira, pela orientação, confiança e compreensão e a oportunidade de conhecer e trabalhar com a biologia molecular.

Ao Dr. Áislan de Carvalho Vivarini, por toda sua ajuda na bancada, me ajudou com todas as minhas dúvidas, a qual sempre sanou com muita eficiência e prontidão, e pelos ensinamentos práticos e teóricos.

A Dr^a. Renata Pereira Meirelles, por todas as suas contribuições, além de sua grande simpatia.

À minha querida mãe Maria Zulena Ferreira Cavalcanti (in memoriam), por todos os sacrifícios feitos, todo apoio, compreensão e amor. Por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Por nunca esmorecer a luta que sempre foi tão grande. Por ser minha mãe guerreira e ao meu pai Antonio Cavalcanti pelo carinho e incentivo em todos os momentos da minha caminhada, incondicionalmente.

À minha querida esposa Laís Cristina por seu amor e por estar sempre ao meu lado e aos meus queridos filhos Ana Cristina, Luísa Cristina e Marcus Vinícius meu amor por vocês não tem explicação.

A Bianca esposa do Áislan pela imensa ajuda na formatação dos textos, figuras e tabelas e tudo relacionado ao Word.

Aos colegas do Laboratório Parasitologia Molecular, Victor Brasil, Carolina Rath, José Vitorino, Celso, as alunas de IC Amanda e Gabi Brum e Jorge Mansur pelo apoio, amizade e por me ajudarem sempre no que foi preciso.

A todos aqueles que, de alguma forma, estiveram presentes durante a realização deste trabalho e puderam contribuir para o meu sucesso.

RESUMO

Cavalcanti, Átilla Ferreira. **Produção de Linhagens de Células HeLa Estavelmente Silenciadas para o Gene NRF2 Através de Vetor Lentiviral**. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

O estudo da biologia celular através de manipulação genética por métodos de transfecção não viral tem sido desafiador devido aos problemas de baixa eficiência de transfecção e à dificuldade em obter uma transdução estável. Vetores lentivirais são ferramentas fundamentais para modificação celular. Sua utilização ganhou destaque devido à capacidade desses em integrar ao genoma de células que estão ou não em divisão. A tecnologia de interferência por RNA (RNAi) tem sido largamente utilizada em estudos de função gênica e protocolos de terapia gênica. Os algoritmos disponíveis atualmente permitem gerar moléculas de RNAi com alta especificidade e eficiência para reduzir a expressão de um gene alvo. Esta técnica em nosso trabalho foi utilizada na tentativa de inibição da expressão do fator transcricional NRF2 em células HeLa. NRF2 é um importante fator de transcrição que regula a expressão de enzimas desintoxicantes de fase II e genes antioxidantes, sendo o principal mediador celular na adaptação a estresse oxidativo e interage com inúmeras proteínas, regulando aproximadamente 200 genes diretamente. Para a produção do vetor lentiviral foram utilizadas 5 diferentes construções carreadoras do shRNA para inibição da expressão de NRF2 em células HeLa. Após transdução e seleção das células HeLa com puomicina na concentração de 2 µg/ml por 7 dias, a eficiência do vetor foi avaliada *in vitro* por RT-PCR em tempo real. Os resultados demonstraram que as construções shNRF2.1, shNRF2.3 e shNRF2.5 apresentaram melhor eficiência de inibição respectivamente (99,9%, 84,5% e 85,2%) da expressão dos RNAs do NRF2 quando comparado ao controle. As construções shNRF2.2 não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle. Vetores lentivirais carreando shRNA foram eficientes para *knockdown* do gene do NRF2 e, portanto, os resultados do presente estudo mostram a viabilidade de silenciamento

gênico de NRF2 nas linhagens celulares HeLa, mediante o uso da interferência de RNA.

Palavras-Chave: Vetores Lentivirais, RNA de Interferência, shRNA, Silenciamento Gênico, NRF2.

ABSTRACT

Cavalcanti, Átilla Ferreira. **Production of Stably Silenced HeLa Cell Lineages for the NRF2 Gene Through Lentiviral Vector.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertation (Professional Master of Training for Biomedical Research). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

The study of cell biology through genetic manipulation by non-viral transfection methods has been challenging because of the problems of low transfection efficiency and the difficulty in obtaining a stable transduction. Lentiviral vectors are fundamental tools for cellular modification. Its use has gained importance because of their ability to integrate into the genome of dividing and non-dividing cells. RNA interference (RNAi) technology has been widely used in gene function studies and gene therapy protocols. The currently available algorithms allow the generation of RNAi molecules with high specificity and efficiency to reduce the expression of a target gene. This technique in our work was used in an attempt to inhibit the expression of transcription factor NRF2 in HeLa cells. NRF2 is an important transcription factor that regulates the expression of phase II detoxifying enzymes and antioxidant genes, being the main cellular mediator in the adaptation to oxidative stress and interacts with innumerable proteins, regulating approximately 200 genes directly. For the production of the lentiviral vector, 5 different shRNA carrier constructs were used for inhibition of NRF2 expression in HeLa cells. After transduction and selection of HeLa cells with puromycin at the concentration of 2 µg / ml for 7 days, vector efficiency was evaluated in vitro by real-time RT-PCR. The results showed that the shNRF2.1, shNRF2.3 and shNRF2.5 constructs presented better inhibition efficiency respectively (99.9%, 84.5% and 85.2%) of NRF2 mRNA expression when compared to control. The shNRF2.2 constructs did not present significant differences when compared to the control. Lentiviral vectors carrying shRNA were efficient for knockdown of the NRF2 gene and therefore the results of the present study show the feasibility of gene silencing of NRF2 in HeLa cell lines by the use of RNA interference.

Keywords: Lentiviral vectors, Interference RNA, shRNA, Gene Silencing, NRF2.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Diversas fontes de geração de siRNAs e o mecanismo de ação mediado por RISC | 27 |
| Figura 2: Biogênese de miRNAs. | 29 |
| Figura 3: Mecanismo de interferência de RNA..... | 30 |
| Figura 4: Esquema de um cassete de expressão de shRNA que poderia ser inserido em vetor de transferência gênica | 32 |
| Figura 6: Estrutura viral de um virion da família Retroviridae. | 35 |
| Figura 7: Representação esquemática do genoma do provírus do HIV-1 | 36 |
| Figura 8: Esquema simplificado do ciclo de vida de um lentivírus..... | 37 |
| Figura 9: Representação esquemática das gerações de vetores lentivirais..... | 41 |
| Figura 10: Domínios funcionais de NRF2 e sua interação com outras proteínas..... | 48 |
| Figura 11: Via de ativação e regulação negativa de NRF2 sob distintos estímulos . | 49 |
| Figura 12: Rede de Interatoma e Reguloma proposto para NRF2 | 50 |
| Figura 13: NRF2 é controlado por duas vias distintas e em dois domínios diferentes | 52 |
| Figura 14: Plasmídeo shRNA mission e construções para silenciar NRF2 (Sigma-Aldrich) | 55 |
| Figura 15: Mapa dos plasmídeos utilizados para produção dos vetores lentivirais .. | 56 |
| Figura 16: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo das construções shNRF2 e dos plasmídeos de empacotamento e envelope viral..... | 71 |
| Figura 17: Aumento da expressão de shScramble em relação ao controle positivo (WT) na linhagem de células HeLa mediante tratamentos com shRNAs | 73 |
| Figura 18: Efeito do Silenciamento das construções de shNRF2 (1, 2, 3 e 5) na linhagem de células HeLa mediante tratamentos com shRNAs..... | 74 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Principais classes de pequenos RNAs não codificadores com ação regulatória | 22 |
| Tabela 2: Resumo das principais características dos vetores virais mais utilizados | 39 |
| Tabela 3: Sequências de iniciadores utilizados para PCR em tempo real..... | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'/3' UTR - *Untranslated Transcription Region* – Região gênica não transcrita 5'e 3'

Amp^r - gene de resistência a ampicilina

ARE - *Antioxidant Response Elements* (Elemento de Resposta Antioxidante)

bZip - *Basic Leucine-Zipper* (Zipper de Leucina Básico)

°C - Graus Celsius

cDNA - DNA complementar

CDS - *Coding DNA Sequence* (Região Codificante do DNA)

CMV - promotor do citomegalovírus humano

CNC - *Cap'n'Collar*

cPPT/CTS - *central polypurine do HIV-1/central termination sequence* (polipurina central do HIV-1 / sequência de terminação central)

DGCR8 - *DiGeorge syndrome critical region gene-8* (Gene-8 da região crítica da síndrome de DiGeorge)

DMEM - *Dulbecco's modified eagle medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP - deoxirribonucleotídeos trifosfatos

dsRNA - *Double strand RNA* – (RNA dupla fita)

DO - Densidade óptica

FIV – Feline immunodeficiency vírus – (Vírus da imunodeficiência felina)

g - Unidade de aceleração

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* – (Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase)

GSSG - Glutaciona oxidada

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSH - Glutaciona reduzida

GSK3β - Glicogênio Sintase Quinase-3β

GST - Glutaciona S-transferase

HEK - *Human Embryonic Kidney Cells* (Células renais embrionárias humanas)

HeLa - Henrietta Lacks (Linhagem de células de adenocarcinoma cervical humano)

HIV - Human Immunodeficiency Vírus – (Vírus da imunodeficiência humana)

HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 2

HO-1 - Heme-oxigenase 1

IFN- β - Interferon beta

Kb - Quilobases

Keap1 - *Kelch ECH associating protein 1*(Proteína tipo Kelch associada ao ECH 1)

LTR - *Long Terminal Repeats* (Repetição Terminal Longa)

lncRNA - *long non-coding RNAs* (RNAs longos não codificantes)

M - Molar

miRNA - microRNA

μg - micrograma

mg - miligrama

μL - microlitro

mL - mililitro

Neh - *Nrf2-ECH homology*

ng - nanograma

NQO1 - NADPH quinona oxirredutase

NRF2 - (*Nuclear factor (erythroid-derived 2-like 2)*)

nt - Nucleotídeos

ORI - Origem de replicação

ORF - open reading frame (Fase aberta de leitura)

Pb - pares de base

PBS - *Phosphate Buffer Saline* (Solução salina tamponada com fosfatos)

pDNA - DNA plasmidial

piRNAs - *piwi-interaction RNAs* (RNAs que interagem com piwi)

poliA - Poliadenilação

pré-miRNA - Molécula precursora de microRNA

pri-miRNA - microRNA primário

PTGS - Post transcriptional gene silencing (Silenciamento gênico pós-transcricional)

RCLs - *Replicant Competent Lentivirus* (Lentivírus Competentes em Replicação)

R2D2 – dsRNA binding protein (proteína de ligação de dsRNA)

RISC - *RNA Induced Silencing Complex* (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)

RNAm - RNA mensageiro

RNAnc - RNA não-codificador

RNAi - Interferência mediada por RNA

RNAr - RNA ribossomal

RNA^t - RNA transportador

RPM - Rotações por minuto

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR - Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase

SFB - Soro Fetal Bovino

shRNA - *short hairpin RNA* (RNA curto em forma de grampo)

SIN - *Self-inactivating* (vetores auto-inativantes)

siRNA - *short interfering RNA* (RNA curto de interferência)

SIV - Simian immunodeficiency vírus – (Vírus da imunodeficiência símia)

RSV - Respiratory Syncytial Vírus - (Vírus sincicial respiratório)

sMaf - small musculoaponeurotic fibrosarcoma (fibrossarcoma musculoaponeurótico pequeno)

snRNA - small nuclear RNAs (pequenos RNAs nucleares)

snoRNA - small nucleolar RNAs (pequenos RNAs nucleolares)

sncRNA - small non-coding RNAs (pequenos RNAs não codificantes)

SOD – Superóxido dismutase

ssRNA - fita simples RNA

SV40 - *simian virus 40*

TAE - *Tris-Acetate-EDTA Buffer* (Tampão Tris-Acetato-EDTA)

TLR - receptor do tipo Toll

UFC - unidade formadora de colônia

VSV-G - vírus da estomatite vesicular

WPRE – *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (elemento regulatório pós transcricional do vírus da hepatite da marmota)

WT - Wild type (Tipo selvagem)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 18 |
| 2. Objetivos | 19 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 19 |
| 3. Revisão Bibliográfica | 20 |
| 3.1 Tipos de RNAs (codificantes e não-codificantes)..... | 20 |
| 3.1.1 RNA codificante - O RNA mensageiro..... | 20 |
| 3.1.2 RNA não codificante..... | 21 |
| 3.1.2.1 RNA Ribossomal..... | 22 |
| 3.1.2.2 RNA Transportador..... | 23 |
| 3.1.2.3 miRNAs (microRNAs)..... | 23 |
| 3.1.2.4 siRNAs (<i>short interfering RNAs</i>)..... | 24 |
| 3.1.2.5 piRNAs (<i>piwi-interaction RNAs</i>)..... | 24 |
| 3.2 Silenciamento gênico por RNA de interferência – RNAi..... | 24 |
| 3.2.1 Mecanismo de ação dos RNAi mediado por siRNA..... | 26 |
| 3.2.2 Mecanismo de ação dos RNAi mediado por miRNA..... | 28 |
| 3.2.3 Estratégias experimentais de silenciamento com RNAi..... | 29 |
| 3.2.4 shRNA (short hairpin RNA)..... | 31 |
| 3.3 Utilização de vetores lentivirais como ferramenta de silenciamento gênico..... | 32 |
| 3.3.1 Vetores..... | 32 |
| 3.3.2 Métodos biológicos..... | 33 |
| 3.3.3 Lentivírus e ciclo de vida..... | 33 |
| 3.3.4 Vetores lentivirais..... | 38 |
| 3.3.5 Vetores lentivirais de 1ª Geração..... | 42 |
| 3.3.6 Vetores lentivirais de 2ª Geração..... | 43 |
| 3.3.7 Vetores lentivirais de 3ª Geração..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 Aplicações dos Vetores Lentivirais..... | 45 |
| 3.5 NRF2 (<i>Nuclear Factor Erythroid-2–Related Factor 2</i>): Estrutura, expressão gênica e função..... | 46 |
| 3.5.1 Via de sinalização de NRF2 e suas interações | 49 |
| 4. Justificativa..... | 53 |
| 5. Material e Métodos | 54 |
| 5.1 Preparo de bactérias competentes | 54 |
| 5.2 Vetores plasmidiais | 54 |
| 5.2.1 Obtenção dos plasmídeos | 54 |
| 5.2.2 Transformação da linhagem <i>E. coli</i> DH5 α | 56 |
| 5.2.3 Extração de DNA plasmidial em baixa escala – miniprep | 56 |
| 5.2.4 Extração de DNA plasmidial em larga escala – Maxiprep..... | 57 |
| 5.3 Linhagens celulares e condições de cultivo | 58 |
| 5.4 Transfecção – Produção dos Lentivírus (Protocolo de TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2015)..... | 59 |
| 5.5 Transdução das partículas virais (Protocolo de TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2015) | 60 |
| 5.6 Transfecção – Produção dos Lentivírus (Protocolo modificado de TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2015)..... | 60 |
| 5.7 Transdução das partículas virais (Protocolo modificado de TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2015)..... | 61 |
| 5.8 Seleção das células com Puomicina..... | 61 |
| 5.9 Western blot..... | 62 |
| 5.9.1 Extração de proteínas totais..... | 62 |
| 5.9.2 Quantificação de proteínas | 62 |
| 5.9.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS | 62 |
| 5.9.4 Transferência das proteínas para membrana de PVDF..... | 63 |
| 5.9.5 Bloqueio da membrana de PVDF e reação com anticorpo | 63 |
| 5.9.6 Desligamento do anticorpo da membrana | 64 |
| 5.10 qRT-PCR em Tempo Real | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 5.10.1 Extração de RNA total..... | 64 |
| 5.10.2 Síntese da primeira fita de cDNA | 65 |
| 5.10.3 PCR quantitativo em Tempo Real..... | 65 |
| 5.11 Análises Estatísticas | 66 |
| Soluções | 67 |
| 6. Resultados e Discussão | 70 |
| 6.1 Protocolos de transfecção e transdução | 70 |
| 6.2 Análise da Integridade dos plasmídeos usados na transfecção das células HEK 293FT para produção dos vetores lentivirais. | 70 |
| 6.3 Avaliação da expressão de NRF2 por <i>western blotting</i> em Células HeLa | 72 |
| 6.4 Efeito do silenciamento com shRNAs sobre o Gene NRF2 em Células HeLa . | 72 |
| 7. Conclusão | 75 |
| 8. Perspectivas | 75 |
| 9. Referências Bibliográficas | 76 |

1. Introdução

Os métodos de estudo da biologia celular através da manipulação genética tem sido desafiadores devido aos problemas de baixa eficiência de transfecção e à dificuldade de obter uma transdução estável. Os vetores lentivirais são considerados vantajosos na transferência gênica por serem capazes de inserir um gene exógeno de forma estável nas células-alvo, inclusive em células quiescentes, e por sua habilidade de empacotar grandes seqüências de nucleotídeos (de 10 a 12 Kb). Outra vantagem é a possibilidade de transduzir com eficiência vetores para o *knockdown* de genes pela técnica de RNA de interferência. Além de permitir o estudo da função de genes específicos, o *knockdown* promovido pelos RNAs de interferência (RNAi) permite que características indesejáveis que possam acompanhar fenótipos de interesse induzidos pelo bloqueio da expressão de genes específicos sejam atenuadas pela inibição parcial da expressão. Os algoritmos disponíveis atualmente para a tecnologia de interferência por RNA (RNAi) permitem gerar moléculas de RNAi com alta especificidade e eficiência para reduzir a expressão de um gene alvo, esta tecnologia tem sido utilizada amplamente em estudos de função gênica e protocolos de terapia gênica. Esta técnica em nosso trabalho foi utilizada na tentativa de inibição do fator transcricional NRF2.

NRF2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2-like 2)*) é um fator transcricional ativado na presença de estresse celular e regula a expressão de genes antioxidantes de fase II. Nosso grupo descreveu a importância da ativação do fator transcricional NRF2 dependente de proteína quinase R (PKR) na infecção por *Leishmania*. Permitindo maior ativação de NRF2 e inibição do estresse oxidativo através de enzimas antioxidantes e favorecimento da infecção por *Leishmania*.

Neste Contexto, o mecanismo de RNAi utilizando shRNA (short hairpin RNA) através de vetor lentiviral surgiu como um método mais estável e eficiente na reprodução experimental para inibir a expressão gênica do fator transcricional NRF2 de forma estável e utilizar esta ferramenta para estudos em nosso grupo e aprimorar para estabelecer as melhores condições para o desenvolvimento de técnicas de transfecção e transdução, sempre buscando suprir limitações existentes e buscar métodos mais apropriados.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Obtenção de linhagens de células HeLa estavelmente silenciadas para o gene NRF2 através do vetor lentiviral e padronização/otimização das condições de silenciamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar cinco diferentes construções de NRF2 (*shNRF2* – *Sigma-Aldrich*) e realizar a transformação em bactérias competentes, seleção de colônias e extração plasmidial.
- Realizar a transfecção de células HEK 293FT para produção de lentivirus e posterior transdução viral em células HeLa (linhagem de células de adenocarcinoma cervical humano) com as cinco diferentes construções.
- Avaliar a eficiência do silenciamento para cada uma das construções *shNRF2* através de RT-PCR e escolher a melhor linhagem silenciada, mantendo as células estavelmente que serão utilizadas em experimentos para o laboratório.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Tipos de RNAs (codificantes e não-codificantes)

As fitas de RNA apresentam estruturas secundárias e terciárias que possuem papel fundamental nos processos de transcrição, processamento, tradução e localização do RNA (CRUZ & WHESTHOF, 2009; MAUGER; SIEGFRIED; WEEKS, 2013). Eles podem ser divididos em duas classes: codificantes e não-codificantes. Os RNAs codificantes são conhecidos como RNAs mensageiros (RNAm), carregando a informação para a síntese de uma proteína.

Já os RNAs não-codificantes (RNAnc) não carregam em sua sequência a informação para a síntese de uma proteína, porém, podem apresentar outras funções importantes nos processos de controle da expressão gênica (DEJBALI *et al.*, 2012; LI; ZHU; LUO, 2016; QUINN & CHANG, 2016).

3.1.1 RNA codificante - O RNA mensageiro

Os RNAs mensageiros possuem fundamental importância como intermediários que transportam a informação genética do DNA aos ribossomos, servindo de mediador da síntese proteica no qual representam o grupo mais complexo de RNAs. Sua diversidade tem origem principal nas etapas em que o pré-RNAm passa antes de se tornar RNA mensageiro maduro em células eucarióticas. Essas etapas são o processamento por *splicing*, a poliadenilação ou adição da cauda poli-A na porção 3' e a adição do cap metilado na porção 5' do RNAm (SHABALINA; OGURTSOV; SPIRIDONOV, 2006; LI; ZHU; LUO, 2016), e estão associados a numerosos fatores proteicos e a complexos que desempenham um papel essencial na tradução e metabolismo do RNAm em células eucarióticas (BREAKER, 2012; SERGANOV & NUDLER, 2013). Após o seu processamento o RNAm é exportado para o citoplasma, onde será traduzido pelo complexo ribossomal (FRIBOURG *et al.*, 2001). Embora o RNA apresente uma estrutura primária simples, os RNAs podem formar estruturas complexas e alternativas, com características energéticas semelhantes (GARTLAND & SUEOKA, 1966; ADAMS; LINDAHL; FRESCO, 1967; SPITALE, 2014).

3.1.2 RNA não codificante

Embora RNAs mensageiros sejam responsáveis por aproximadamente 90% dos transcritos das células eucarióticas, representam apenas 1% - 2% dos RNAs totais, sugerindo que um grande número de moléculas são RNAs não codificantes (PONTING & BELGARD, 2010). Atualmente sabe-se que os RNAs que não codificam proteínas desempenham importantes funções relacionadas à regulação da expressão de genes, alterando o fluxo da informação genética tradicional. Até os meados dos anos 80, as famílias de RNAnc conhecidas eram apenas as de RNA ribossomal e RNA transportador. Recentemente foi demonstrado que a maioria dos RNAs transcritos em células humanas são RNAnc originados de introns ou regiões intergênicas (SAINI et al., 2007).

Os RNAs não codificantes podem ser classificados em RNAnc “funcionais” e RNAnc “regulatórios”. Os funcionais incluem os RNAs ribossomais (RNAr), RNAs transportadores (RNAt), *small nuclear RNAs* (snRNA) e *small nucleolar RNAs* (snoRNA). Os “regulatórios” podem ser divididos em *long non-coding RNAs* (lncRNA) e *small non-coding RNAs* (sncRNA) (KIM & SUNG, 2012; LI; ZHU; LUO, 2016). Os sncRNAs são classes de pequenos RNAs que não codificam proteínas. Os principais são: siRNAs (*short interfering RNAs* - pequenos RNAs de interferência), microRNAs (miRNAs) e piRNAs (*piwi-interaction RNAs*) (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009) (**Tabela 1**). Estas moléculas estão envolvidas no mecanismo de RNAi (RNA de interferência) que ocorre em vários organismos eucariontes. Todas as classes podem influenciar diferentes aspectos do funcionamento genômico em eucariotos, incluindo, formação de heterocromatina (LIPPMAN *et al.*, 2004), repressão e degradação do RNA mensageiro (TOMARI *et al.*, 2005), tradução (PILLAI *et al.*, 2005), transcrição (TAFT *et al.*, 2009), proliferação celular e apoptose (BRENNECKE *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2003) e desenvolvimento e manutenção de células germinativas (FORSTEMANN *et al.*, 2005; KLATTENHOFF *et al.*, 2008; LUCCHETTA *et al.*, 2009). Dentre a variedade de RNAnc existentes, os mais estudados, que causaram uma revolução com a sua descoberta na década de 90, pertencem às classes dos pequenos RNAs, cujos representantes são os siRNAs e os miRNAs.

Tabela 1: Principais classes de pequenos RNAs não codificadores com ação regulatória.

| | Tamanho em Nucleotídeos | Origem | Função primordialmente associada |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|--|
| Micro RNAs (miRNAs) | 19-25 | Endógena a partir de dsRNAs | Repressão da tradução |
| RNAs de interferência (siRNAs) | 21-23 | Endógena e Exógena a partir de dsRNAs | Clivagem do RNA mensageiro |
| Interação-piwi RNAs (piRNAs) | 26-31 | Endógena a partir de ssRNAs | Controle no desenvolvimento germinativo |

Fonte: (CHU & RANA, 2007 modificado).

3.1.2.1 RNA Ribossomal

O ribossomo é uma grande partícula de ribonucleoproteína responsável por sintetizar proteínas em todas as células, utilizando RNAm como moldes e RNAt como substrato. Ribossomos de bactérias possuem duas subunidades uma grande 50S e uma pequena 30S que juntas compõem o ribossoma 70S. Já os ribossomos eucarióticos possuem as subunidades 40S e 60S e ribossomo 80S. Além disso, vários fatores proteicos atuam nos ribossomos em várias fases da tradução (RAMAKRISHNAN, 2002). A biogênese do ribossomo em eucariotos ocorre no nucléolo, um compartimento especializado dentro do núcleo. A síntese começa com o processamento do pré-RNAr 5S e 35S por RNA polimerases distintas e requer a importação de proteínas ribossômicas do citoplasma. Os componentes de RNA maduros (RNAr 5,8S, 25S / 28S e 5S para a subunidade 60S e 18S para a subunidade 40S), pré-RNAr são liberados seguindo um caminho complexo que envolve digestões endo e exonucleotídicas. Concomitantemente, pré-RNAr são amplamente modificados e vinculados pelas proteínas ribossômicas antes das subunidades pré-40S e pré-60S montadas e são exportadas separadamente para o citoplasma (VENEMA & TOLLERVEY, 1999). RNAr e proteínas ribossômicas são

produzidos em quantidades equimolares e sua síntese é rigorosamente regulada por uma variedade de condições de crescimento (WOOLFORD, 1991).

3.1.2.2 RNA Transportador

RNA transportador são moléculas de ácido nucléico mais abundantes entre as pequenas moléculas de RNA não codificantes, constituindo de 4 % a 10 % de todo o RNA celular. São fundamentais na maquinaria de tradução, pois são eles que entregam os aminoácidos aos ribossomos para traduzir a informação genética (RODNINA & WINTERMEYER, 2011). Os RNAs Transportadores possuem seqüências altamente conservadas, estruturas secundárias em forma trevo e estruturas terciárias em forma de L. (JUHLING *et al.*, 2009).

3.1.2.3 miRNAs (microRNAs)

Os miRNAs são definidos como moléculas endógenas de RNA com aproximadamente de 19 a 25 nucleotídeos capazes de atuar como reguladores pós-transcricionais, sua biogênese ocorre no núcleo. Foram descritos inicialmente atuando na regulação de genes endógenos envolvidos no controle do desenvolvimento temporal (estágios larvais L1, L2, L3, L4 até adulto) no nematóide *Caenorhabditis elegans* (LEE *et al.*, 1993). Eles apresentam características em comum por serem processados a partir de um precursor em forma de grampo. Além disso, conseguem se ligar a seqüências complementares na região 3'UTR (*untranslated region*), região não traduzível de um determinado RNAm resultando no seu silenciamento ou na sua degradação (LEE & AMBROS, 2001).

Os miRNAs estão distribuídos por todo genoma (KIM & NAM, 2006). Estudos demonstram que os miRNAs possuem importantes atividades biológicas regulando aproximadamente 20 a 30% de todos os transcritos nos genes humanos, sendo que um único miRNA pode atuar na regulação de diversos processos biológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular (TAY *et al.*, 2008), neurogênese (SMIRNOVA *et al.*, 2005; LIU & ZHAO, 2009), angiogênese (NICOLI *et al.*, 2012) e apoptose (HE *et al.*, 2010).

3.1.2.4 siRNAs (*short interfering RNAs*)

São moléculas de pequenos RNAs com ação de interferência e são caracterizadas por terem aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos (nt) e são produzidos a partir de precursores de RNA de dupla cadeia (dsRNA) a nível citoplasmático que agem regulando a expressão gênica ao nível pós-transcricional de forma sequência específica (ELBASHIR *et al.*, 2001). Diversas categorias de transcritos podem servir de fonte de dsRNAs para a geração de siRNAs (CARTHEW *et al.*, 2009).

3.1.2.5 piRNAs (*piwi-interaction RNAs*)

Os piRNAs ainda não possuem sua biogênese e mecanismos bem elucidados até o momento (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009), apenas, sabe-se que representam uma classe com aspectos distintos dos miRNAs e siRNAs. Se comparado com estes, a estrutura dos piRNAs é relativamente maior, possuindo de 20 a 30 nt de tamanho, com precursores de RNAs de fita simples (ssRNAs) (KLATTENHOFF *et al.*, 2008). Sua função está associada principalmente com a regulação gênica responsável pelo desenvolvimento de células germinativas (CARMELL *et al.*, 2007). Além disso, estudos já sugerem uma possível participação de piRNAs na regulação da expressão gênica em células somáticas (PAL-BHADRA *et al.*, 2002; PAL-BHADRA *et al.*, 2004; GRIMAUD *et al.*, 2006) e em mecanismos relacionados a aprendizagem e memória em *Drosophila melanogaster* (ASHRAF *et al.*, 2006).

3.2 Silenciamento gênico por RNA de interferência – RNAi

O termo RNAi é um termo geral no qual uma molécula de dsRNA ao ser incorporada na forma ativa a um complexo citoplasmático, se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no RNAm-alvo, ocasionando assim o silenciamento, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA (PETERSEN *et al.*, 2006). A interferência mediada por RNA é um fenômeno que naturalmente ocorre nos organismos eucariotos e parece exercer, primordialmente, um papel na eliminação de RNAs mensageiros anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus (BAULCOMBE, 1999; KETTING *et al.*, 1999). RNAi é um processo conservado na evolução das espécies, que se caracteriza por ser um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico

pós-transcricional (*post transcription gene silencing* - PTGS) atuando sobre o RNAm. (CARTHEW & SONTHEIMER, 2009).

Os primeiros relatos referentes a ação de RNAi, datam de 1983 com a observação de eventuais fenômenos de silenciamento gênico em *Aspergillus flavus* a partir da ação de dsRNA (SCHMIDT *et al.*, 1983; SCHMIDT, 2004). Este fenômeno também foi observado em outras espécies de plantas, fungos e outros organismos, porém, o mecanismo que levava ao silenciamento gênico ainda era desconhecido. (NAPOLI *et al.*, 1990; COGONI & MACINO, 2000). Em 1998, Fire e colaboradores utilizaram pela primeira vez o termo “Interferência por RNA”. Buscando silenciar diversos genes no nematoide *Caenorhabditis elegans*, este grupo utilizou RNAs senso e antisenso separadamente e duplas fita de RNA, demonstrando que dsRNA tinha uma ação supressora mais potente e específica em detrimento da administração das fitas isoladas. Assim ficou claro a existência de um processo de regulação gênica mediado por RNA, até então não caracterizado. Andrew Z. Fire e Craig C. Mello ganharam em 2006 o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por este trabalho.

Estudos genéticos demonstraram a existência de três vias de silenciamento de RNA (XIE *et al.*, 2004). Estudos com proteínas supressoras de silenciamento codificadas por vírus demonstraram que estas vias podem se sobrepor em alguns pontos (DUNOYER *et al.*, 2002).

A primeira via é a de silenciamento citoplasmático via siRNAs, que está envolvida na degradação de RNA viral interferindo, ou mesmo bloqueando, o ciclo de infecção. O dsRNA pode originar-se da transcrição de um gene endógeno, de um transgene, ou de um intermediário da replicação de vírus com genoma de RNA. Em vírus com genoma de DNA, dsRNA pode ser formado por meio do anelamento de transcritos sobrepostos complementares (BAULCOMBE, 2004). A segunda via é a de silenciamento de RNAm endógenos via miRNAs. Os miRNAs regulam a expressão gênica negativamente por meio do pareamento de bases específicos a RNAm alvo, resultando na clivagem do RNAm ou na repressão de sua tradução (BAULCOMBE, 2004). A terceira via é nuclear e está associada à metilação de DNA e à formação de heterocromatina. Uma importante função para esta via é provavelmente proteger o indivíduo de desorganizações genômicas causadas por transposons (BAULCOMBE, 2004).

siRNAs e miRNAs estão envolvidos no processo de silenciamento pós-transcricional e, ou interferência mediada por RNA (KAWASAKI *et al.*, 2004). miRNAs atuam de forma análoga aos siRNAs regulando negativamente RNAs mensageiros alvo, porém diferenciam-se destes pela origem e pela natureza do gene alvo (ZENG *et al.*, 2003).

3.2.1 Mecanismo de ação dos RNAi mediado por siRNA

Diversas categorias de transcritos podem servir de fonte de dsRNAs para a geração de siRNAs (CARTHEW *et al.*, 2009)

O mecanismo de RNAi mediado por siRNA envolve duas etapas: a etapa iniciadora e a etapa efetora.

Na etapa inicial, dsRNA longos, os quais são produzidos por genes endógenos, partículas virais, elementos de transposição ou transgenes experimentais, são reconhecidos por uma proteína com afinidade pelo RNA, a R2D2 (TABARA *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003). Este complexo é reconhecido e clivado pela enzima Dicer que é capaz de reconhecer duplas fitas de RNA (BERNSTEIN *et al.*, 2001). A clivagem gera RNAs de interferência de aproximadamente 21 a 23 nt, caracterizados por um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos não pareados na extremidade 3' hidroxil terminal (ELBASHIR *et al.*, 2001). Tais fragmentos são conhecidos como siRNA, também constituídos de duas fitas. A fita antisense (ou fita guia) contém sequência de nucleotídeos similar à sequência alvo do RNAm, enquanto a fita sense (fita passageira) possui sequência nucleotídica parcialmente complementar a esta mesma sequência alvo (TAKAHASHI; NISHIKAWA; TAKAKURA, 2009; SASHITAL & DOUDNA, 2010).

Na etapa efetora, os siRNAs são incorporados em complexo de nuclease multicompetente, o denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (HAMMOND *et al.*, 2000). Os componentes ativos do RISC são endonucleases denominadas proteínas argonautas, responsáveis pela quebra da fita de RNAm complementar ao siRNA inserido no complexo (PREALL & SONTHEIMER, 2005). Como os fragmentos produzidos pela Dicer são de fita dupla, em teoria cada fita poderia agir como molde para identificação do RNAm complementar. Entretanto, apenas uma das fitas, que passa a ser denominada fita guia, se liga à proteína argonauta e atua no silenciamento gênico (GREGORY *et al.*, 2005). O reconhecimento das fitas guias e passageira é realizado por proteínas argonautas

associada a complexos Dicer e proteína de ligação ao RNA de cadeia dupla (dsRPBS) que contribuem para a seleção da cadeia, sendo ditados por parâmetros duplex específicos, tais como termodinâmica, identidade de nucleotídeo 5' e estrutura. Proteínas argonautas são reconhecidas por ter uma preferência de ligação por RNAs pequenos com nucleotídeos de uridina e adenosina na extremidade 5', enquanto 5' citidinas e guanosinas são selecionadas contra durante o carregamento de RISC. Isso se deve em parte a um loop de seletividade conservada no domínio da proteína argonauta (NOLAND & DOUDNA, 2013). Após a etapa de reconhecimento, a fita antisense (ou fita guia) do siRNA é acoplada ao complexo, sendo a fita sense (fita passageira) descartada pela ação da proteína argonauta e posteriormente degradada. Assim, o complexo RISC se torna ativo para a ação catalítica (MACRAE *et al.*, 2008). A fita antisense então se anela à sequência alvo complementar no RNAm e o mecanismo de degradação é ativado, ocorrendo, assim, o silenciamento pós-transcricional da expressão gênica (TAKAHASHI; NISHIKAWA; TAKAKURA, 2009; SASHITAL & DOUDNA, 2010). **(Figura 1)**

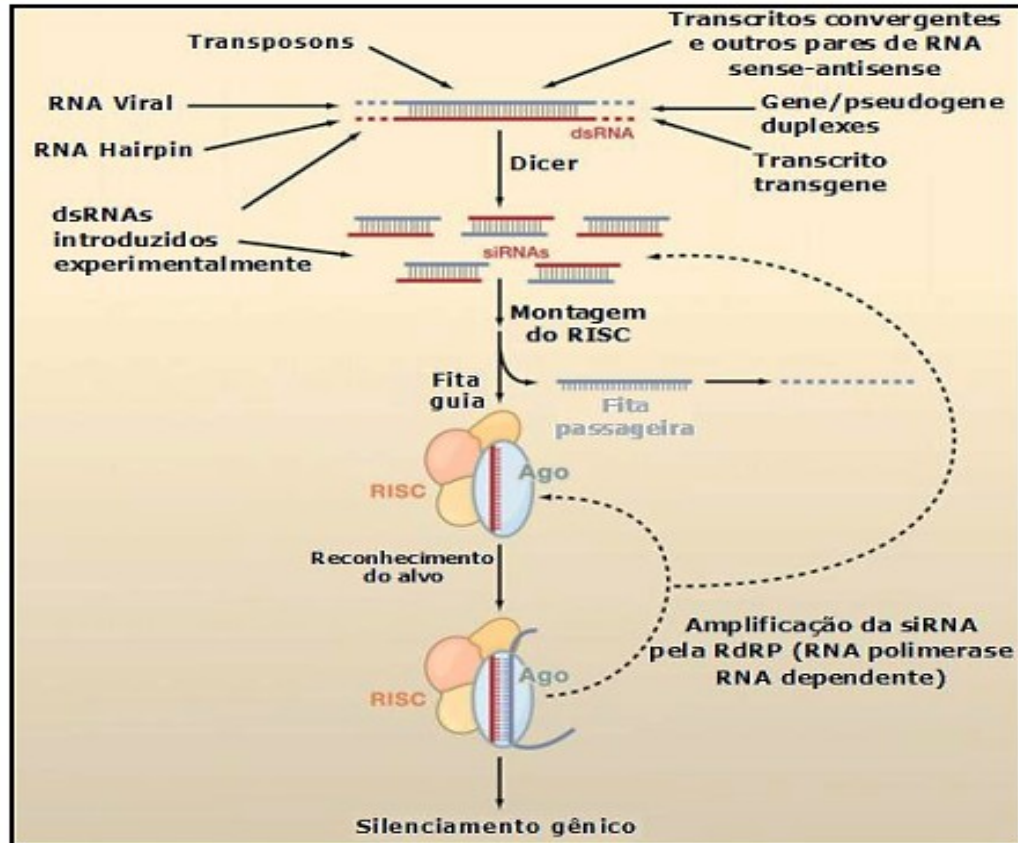


Figura 1: Diversas fontes de geração de siRNAs e o mecanismo de ação mediado por RISC (CARTWEW *et al.*, 2009 modificado).

3.2.2 Mecanismo de ação dos RNAi mediado por miRNA

Embora sejam muito semelhantes aos siRNA, o miRNA é produzido por uma via de síntese diferente. Como são de origem endógena, a biogênese se inicia no núcleo com a ação de uma RNA polimerase de classe I ou III que gera transcritos primários de miRNAs (pri-miRNAs), contendo cap 5' e cauda poli (A) a 3' (LEE *et al.*, 2004). O pri-miRNA apresenta uma estrutura característica dos miRNAs em forma de grampo em seu arcabouço que é clivada ainda no núcleo pela RNase III, Drosha e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene-8*) que apresenta um domínio de ligação para dsRNA. A clivagem resulta no microRNA precursor (pré-miRNA) com cerca de 70-200 nucleotídeos (LEE *et al.*, 2003). Em seguida, o pré-miRNA gerado é exportado para o citoplasma de forma ativa pelo complexo Ran-GTP/Exportina-5, sendo processado novamente por outra enzima da classe RNase III, Dicer, resultando em um miRNA maduro fita dupla, contendo aproximadamente 22 nucleotídeos (BERNSTEIN *et al.*, 2001). Apenas uma das fitas do duplex de miRNA, correspondente à seqüência do miRNA maduro, é incorporada ao complexo multimérico denominado RISC sendo a outra degradada, neste complexo estão as proteínas argonautas como principais componentes, e que será direcionado para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvo (SCHWARZ *et al.*, 2003; GREGORY *et al.*, 2006). Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' UTR não traduzida do RNAm alvo em animais.

Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis proteicos de seus genes alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (KIM, 2005) **(Figura 2)**.

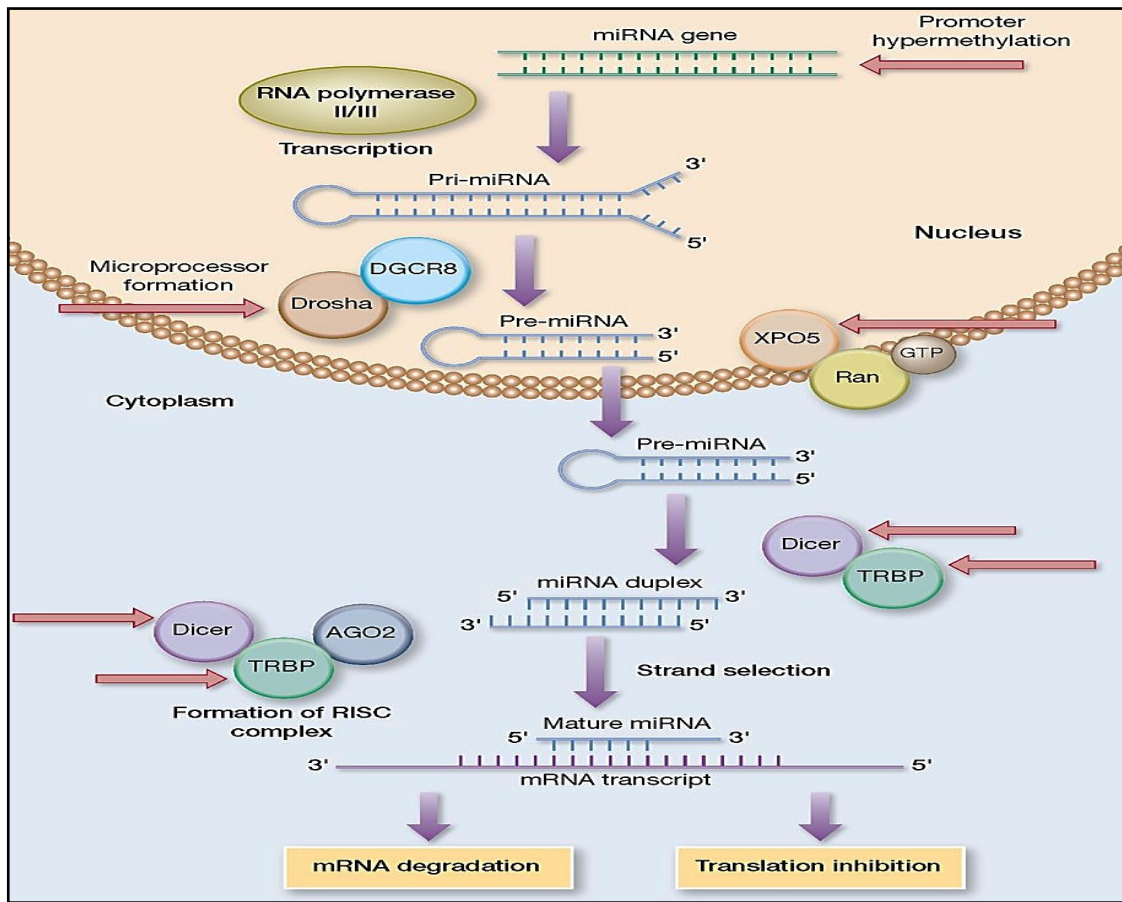


Figura 2: Biogênese de miRNAs (Retirado de *American Association for Cancer Research*, 2003).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' UTR não traduzida ou CDS (coding RNA sequence) depende do grau de complementaridade com o RNAm alvo, podendo ocorrer por inibição traducional ou degradação do RNAm. O pareamento de modo imperfeito com o RNAm acarreta a inibição traducional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em animais (BRENNECKE *et al.*, 2005). Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o RNAm, levando-o à degradação (similar ao mecanismo de RNAi) (BRENNECKE *et al.*, 2005). No entanto, já foram descritos exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos (VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2006).

3.2.3 Estratégias experimentais de silenciamento com RNAi

Experimentalmente, pode-se mimetizar o processo biológico de RNAi mediante o uso de moléculas curtas de RNA fita dupla, conhecidas como siRNAs sintéticos (MEISTER & TUSCHL, 2004; TAKAHASHI; NISHIKAWA; TAKAKURA,

2009; SASHITAL & DOUDNA, 2010). Nestas estruturas sintéticas, a fita antisense possui sequência nucleotídica totalmente complementar à sequência alvo do RNAm. A indução do mecanismo de RNAi mediado por siRNAs sintéticos está ilustrado na **(Figura 3a)**. Assim, o uso de siRNAs sintéticos - que agem como silenciadores gênicos - tem se destacado em estudos científicos sobre papéis de genes na biologia celular e no processo saúde-doença, bem como na busca de potenciais alvos terapêuticos (FREDERICO & MENCK, 2007; PASTUSZKA & MACKAY, 2010).

Outra forma de induzir o mecanismo de RNAi, é introduzir na célula vetores de expressão que codificam o shRNA, sejam eles vírus ou DNA plasmidial. Uma vez no núcleo das células, a sequência de interesse codificada pelo vetor será transcrita

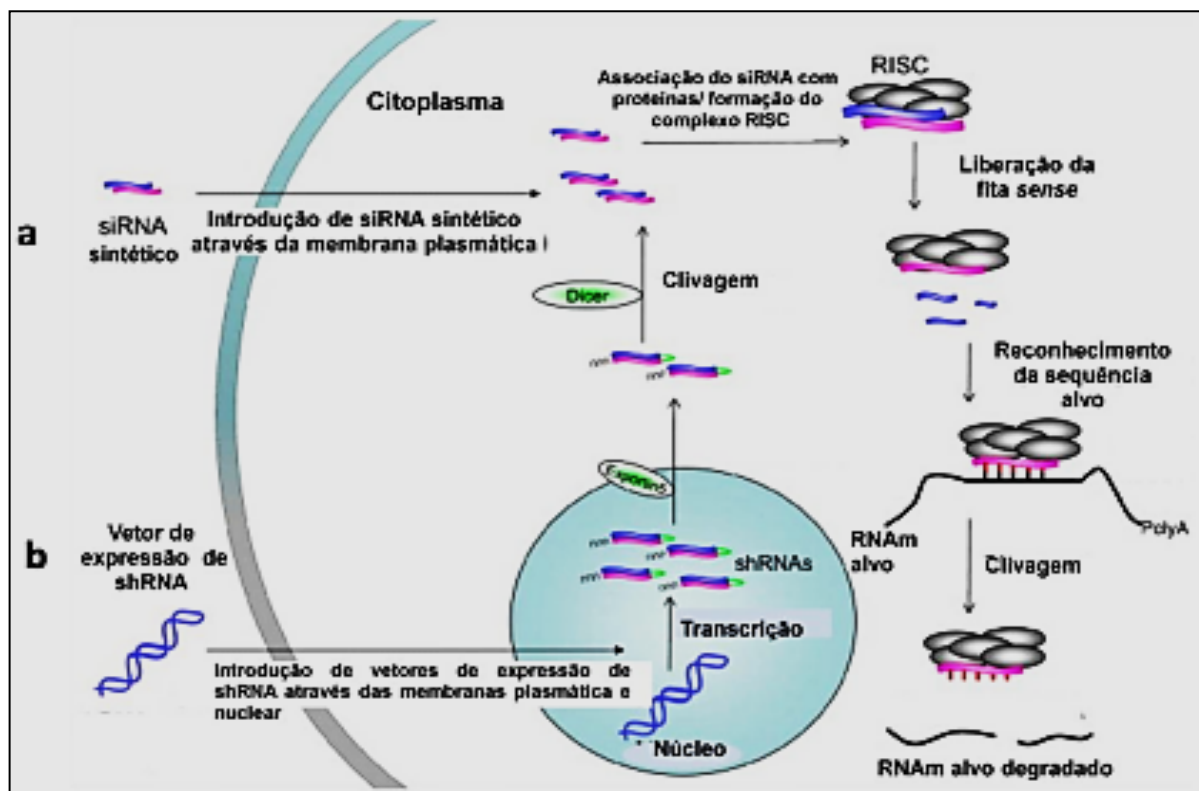


Figura 3: Mecanismo de interferência de RNA. a) Ilustração do mecanismo de interferência de RNA (RNAi) mediada por short interfering RNA (siRNA). Moléculas curtas de RNA fita dupla, também denominados siRNAs sintéticos, são transfectados na célula. Uma vez no citoplasma, os siRNAs sintéticos associam-se a proteínas celulares, formando o complexo RISC. O complexo RISC separa as duas fitas, acoplado-se apenas à fita antisense que reconhece a sequência alvo no RNAm. O RNAm é então degradado, finalizando o mecanismo de interferência. b) RNAi mediada por vetores de expressão de grampos curtos de RNA, short harpin (shRNA). Vetores de expressão são transfectados na célula. Uma vez no núcleo, os shRNAs são transcritos e exportados para o citoplasma, onde sofrem clivagem pela enzima Dicer. Os fragmentos gerados na clivagem, os siRNAs, associam-se ao mesmo complexo RISC, o qual irá degradar o RNAm alvo (TAKAHASHI; NISHIKAWA; TAKAKURA, 2009 Modificado).

naturalmente pela maquinaria celular o que resulta em silenciamento estável de longa duração na célula. Os transcritos são sequências de RNA fita dupla na forma de grampos curtos, por esse motivo são denominados de shRNA (*short hairpin RNA*). A transcrição do shRNA é controlada por sequências promotoras para as RNA polimerases II ou III, dependendo do tipo de expressão desejada. Altos níveis de shRNAs são obtidos com promotores de RNA Pol III. Já os shRNAs sob controle de promotores de RNA pol II são transcritos como precursores longos que mimetizam os pri-miRNAs, podem ser expressos especificamente em um dado tecido e por serem efetivos em baixos níveis, evitam a saturação dos componentes da via de RNAi (AAGAARD & ROSSI, 2007; KIM & ROSSI, 2007).

3.2.4 shRNA (short hairpin RNA)

É uma molécula de RNA em forma de grampo que é criada geralmente por meio do processamento de moléculas nas células alvo (PADDISON *et al.*, 2002). Os shRNAs podem ser produzidos a partir de plasmídeos ou vetores virais desenhados para um silenciamento gênico transitório ou a longo prazo (AMARZGUIOUI; ROSSI; KIM, 2005). Essencialmente, vetores exógenos codificando uma construção de shRNA transfectam na linhagem celular desejada, este vetor é levado até o núcleo celular onde é expresso como um pri-shRNA. Uma nuclease denominada Drosha, quebra o pri-shRNA em um fragmento menor, denominado pré-shRNA. Uma proteína de membrana especializada, denominada exportina-5 (Exp5), transfere pre-shRNA para o citoplasma, onde é reconhecido e processado pela enzima Dicer, gerando fragmentos curtos de RNA fita dupla (LIU *et al.*, 2004). Estes fragmentos curtos de RNA são também siRNAs, formados por duas fitas de nucleotídeos complementares (fitas sense e antisense), Sendo finalmente transformado em siRNA. Após o processamento pela Dicer, a molécula de siRNA é incorporada ao complexo RISC e utilizada na clivagem de RNAm alvos como descrito anteriormente (DE FOUGEROLLES *et al.*, 2007) (**Figura 3b**).

A estrutura básica de um vetor de expressão de shRNA contém um promotor em conjunto com uma sequência sense de 19 a 22 nucleotídeos, uma sequência base loop de 3 a 10 nucleotídeos seguido da sequência antisense complementar e uma terminação de 4 a 6 Timinas, como um terminador da transcrição (AAGAARD & ROSSI, 2007), conforme mostra a **Figura 4**. Geralmente os promotores utilizados são do tipo Pol III, tais como U6 e H1 (BODEN *et al.*, 2003). Promotores do tipo Pol

II, também são utilizados, mas para expressar miRNAs artificiais e não shRNAs (LIAO & TANG, 2016).

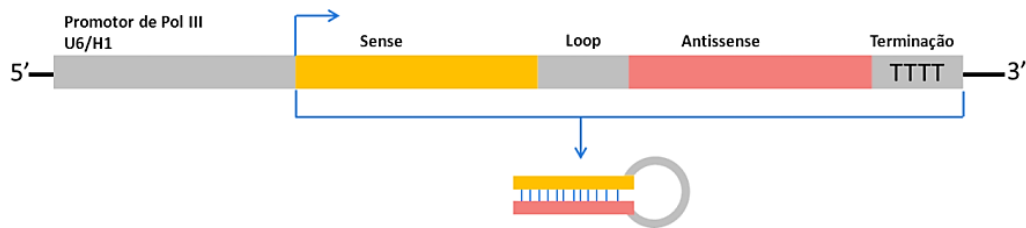


Figura 4: Esquema de um cassete de expressão de shRNA que poderia ser inserido em vetor de transferência gênica. Esses vetores possuem um promotor específico para Pol III no qual a transcrição termina com a formação de um *short hairpin*, consistindo das sequências *sense* e *antisense* pareadas seguida de uma região de *loop*. (AAGAARD & ROSSI, 2007 Modificado).

3.3 Utilização de vetores lentivirais como ferramenta de silenciamento gênico

3.3.1 Vetores

Existem várias maneiras de transferir um gene para células alvo. Em geral conseguimos através de um vetor. O vetor ideal deve apresentar características básicas como capacidade de acomodação de um transgene de tamanho considerável, baixa imunogenicidade e citotoxicidade, expressão estável dos transgene, direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos, custo baixo e fácil manipulação e produção (NARDI *et al.*, 2002). Os métodos de entrega gênica podem ser classificados em duas categorias métodos físico-químicos e métodos biológicos (TILEMANN *et al.*, 2012) As vantagens dos métodos físico-químicos incluem a facilidade de produção do vetor, a reduzida limitação no tamanho do “cassete de expressão” e os riscos de biossegurança mínimos. Por outro lado, das limitações fazem parte a baixa eficácia de transfecção e o efeito transitório devido à degradação intracelular. As vantagens dos métodos biológicos incluem a alta eficácia na transferência de genes e a capacidade de expressão dos transgenes por longos períodos (quando são usados vírus integrativos). As principais limitações são a reduzida capacidade de “clonagem de sequências longas de ácidos nucleicos”, inconsistências com a bioatividade e pureza entre os estoques de vetores e riscos relacionados com a biossegurança (LY *et al.*, 2007).

3.3.2 Métodos biológicos

Os métodos biológicos incluem os vetores de origem viral. As partículas virais, por natureza, são agentes infecciosos capazes de expressar sua informação genética nas células infectadas (PALÙ *et al.*, 1999) e são uma eficiente forma de atravessar as barreiras existentes para chegar ao interior da célula alvo (ANDERSON, 1998). O vírus utiliza o seu mecanismo natural de adsorção, reconhecimento do receptor celular para penetrar na célula, facilitando a internalização do material genético (FRIEDMANN, 1997). A família dos retrovírus vem recebendo muita atenção de cientistas nas últimas décadas por ser causadora de doenças graves em humanos, como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e por seu valor como alvo de experimentação em terapia gênica. Os vetores retrovirais podem ser distribuídos em três classes: oncovetores, Spumavetores e lentivetores (HU & PATHAK, 2000; BRECKPOT; AERTS; THIELEMANS, 2007). Dentre esses, os vetores lentivirais são considerados vantajosos na transferência gênica por serem capazes de inserir um gene exógeno de forma estável nas células-alvo, inclusive em células quiescentes, e por sua habilidade de empacotar grandes seqüências de nucleotídeos (de 10 a 12 kb) (DALY & CHERNAJOVSKY, 2000; WORGALL, 2005). Além disso, a biologia dos vírus desta família é a mais bem conhecida devido às numerosas pesquisas do HIV em nossa comunidade científica.

3.3.3 Lentivírus e ciclo de vida

Os lentivírus compreendem espécies da família Retroviridae, que inclui o Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), alguns vírus que infectam ungulados, como o vírus da imunodeficiência bovina, vírus da anemia infecciosa equina, vírus da artrite-encefalite caprina e Maedni-Visna vírus, além dos vírus patogênicos humanos Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2) (*ICTV–International Committee on Taxonomy of Viruses, 2006*). A família Retroviridae compreende uma família de pequenos vírus esféricos (com tamanho entre 80 – 120nm) que apresentam como material genético duas fitas-positivas de ssRNA. Apresentam como característica marcante a capacidade de retrotranscrever o RNA viral em uma molécula de DNA complementar (cDNA) capaz de se integrar de forma estável ao genoma da célula alvo (ESCORS *et al.*, 2012). A estrutura viral dos virions (partículas virais infectantes) dessa família está representada na **(Figura 6)**. O núcleo viral é formado pelo material genético e proteínas estruturais e

enzimáticas (proteínas do nucleocapsídeo - NC, transcriptase reversa - RT, integrase - IN e protease - PR), delimitados pela camada de proteínas do capsídeo (CA). Externo ao núcleo, proteínas da matriz (MA) viral formam outro invólucro que interage com o núcleo viral e com o envelope do virion. O envelope compõe a camada mais externa e consiste em uma membrana lipoproteica derivada da célula com proteínas virais adicionais. As glicoproteínas do envelope apresentam uma unidade transmembrana (TM), responsável pelo ancoramento da glicoproteína na membrana lipídica, e uma unidade de superfície (SU), que reconhece os receptores celulares da célula-alvo durante a infecção (JONES & MORIKAWA, 1998; ESCORS & BRECKPOT, 2010).

Quanto ao genoma, os retrovírus podem ser divididos em simples ou complexos, de acordo com sua organização. Retrovírus de genoma complexo, como os lentivírus, apresentam além da organização básica, vários genes acessórios e regulatórios. Para fins de caracterização do genoma lentiviral, tomaremos por base o genoma do vírus HIV-1 (**Figura 7**), por se um vírus altamente estudado e caracterizado e do qual são derivados a maior parte dos vetores lentivirais. O genoma do HIV-1 é organizado em elementos *cis-acting* e *trans-acting*. Elementos regulatórios *cis-acting* são sequências não-codificantes essenciais para a integração e transcrição viral que devem, necessariamente, estar presente no cDNA a ser integrado. Essas sequências interagem ou fornecem sítios de ligação para proteínas codificadas pelos elementos *trans-acting*, que incluem nove genes responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e acessórias da partícula viral, como os genes gag, pol e env (STEVENSON, 2002; PLUTA & KACPRZAK, 2009). Entre as sequências *trans-acting*, o gene gag é responsável pela codificação de uma poliproteína que é posteriormente clivada nas proteínas estruturais da matriz (MA), do capsídeo (CA), do nucleocapsídeo (NC) e a proteína acessória p6; o gene env

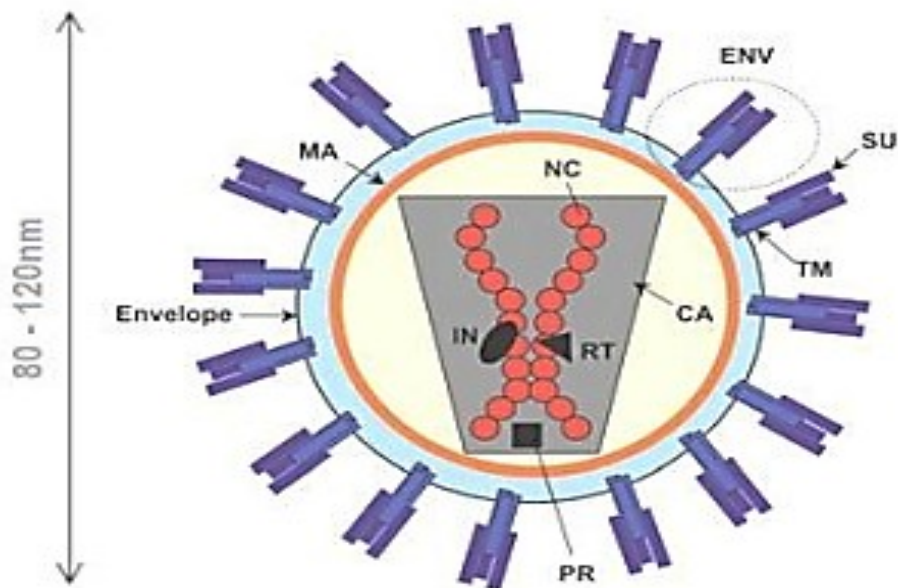


Figura 5: Estrutura viral de um virion da família Retroviridae. O virion de forma esférica é composto por um núcleo viral (estrutura cônica) formado pelo complexo de proteínas do nucleocapsídeo (NC) que envolve as duas fitas de material genético (ssRNA), integrase (IN), protease (PR), transcriptase reversa (RT) e capsídeo (CA). A matriz (MA) interage com o núcleo e com o envelope. A glicoproteína do envelope (ENV) é formada pela unidade de superfície (SU) ligada não-covalentemente à unidade transmembrana (TM), que ancora a glicoproteína no envelope (ESCORS *et al.*, 2012 Modificado).

codifica a glicoproteína precursora do envelope viral, que é clivada nas glicoproteínas transmembrana (TM) e de superfície (SU) do envelope viral; e o gene pol codifica as enzimas transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN) que acompanham o ssRNA do virion. A enzima transcriptase reversa promove a retrotranscrição das fitas de ssRNA viral em uma única molécula de cDNA, que se integra ao genoma hospedeiro. A integração é catalisada pela enzima integrase, e o DNA integrado é denominado DNA proviral ou provírus. A enzima protease é responsável pela clivagem das poliproteínas Gag e Pol, e consequente maturação dos virions recém-formados (KATZ, 1994; ESCORS & BRECKPOT, 2010). Duas proteínas regulatórias também são transcritas: *tat* (*transcriptional transactivator*), que é responsável pela ativação do promotor LTR, e *rev* (regulator of virion gene expression) que regula o transporte do RNAm transcrito do núcleo para o citoplasma. Além dessas proteínas, o genoma do HIV-1 ainda codifica quatro proteínas acessórias: *nef* (*negative effector*), *vif* (*viral infectivity factor*), *vpr* (*viral protein r*) e *vpu* (*viral protein u*), consideradas acessórias por estarem

DNA proviral HIV-1

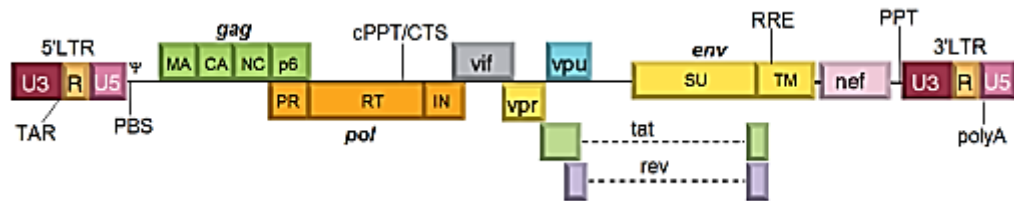


Figura 6: Representação esquemática do genoma do provírus do HIV-1. O genoma é flanqueado pelas regiões 5' e 3' LTR, que controlam a expressão dos genes virais. Os elementos trans-acting correspondem aos nove genes (em caixas). Gag, pol e env codificam proteínas estruturais e enzimas, tat e rev codificam proteínas regulatórias e vif, vpr, vpu e nef proteínas acessórias. Os elementos cis-acting (TAR, PBS, cPPT/CTS, RRE, PPT e polyA) regulam a atividade promotora, transcrição e integração (MAIER; VON KALLE; LAUFS, 2010 Modificado).

relacionadas à patogenicidade do vírus, mas não essenciais à expressão e replicação (FRANKEL & YOUNG, 1998; CHINNASAMY *et al.*, 2000).

O DNA proviral do HIV-1 apresenta ainda diversos elementos cis-acting, como as sequências 5' e 3' LTR (*Long Terminal Repetitive Sequences*), que abrigam as regiões funcionais U3, U5 e R. A região U3 corresponde ao promotor do vírus e contém regiões enhancers e TATA box; a região U5 está relacionada com a transcrição reversa do RNA e contém a região PBS (*primer binding site*), que dá início à transcrição reversa; e as regiões R marcam o início da transcrição (ESCORS *et al.*, 2012). A região 5'LTR apresenta ainda a sequência TAR (*transactivation response element*) na qual a proteína tat se liga para ativar o promotor, e a região 3'LTR apresenta uma sequência de poliadenilação (*polyA*), marcando o final da transcrição. Outros elementos *cis-acting* importantes são o sinal de empacotamento (psi ou Ψ) que sinaliza às proteínas virais para realizar o empacotamento apenas do RNA viral transcrito, a região cPPT/CTS (*central polypurine tract/central termination sequence*), a sequência PPT (*polypurine tract*), que corresponde ao sítio de início da síntese de fitas de DNA positivas durante a transcrição reversa, e o elemento RRE (*rev response element*) (WATANABE & TEMIN, 1982; RATTRAY & CHAMPOUX, 1989; CHARNEAU; PIERRE; ALIZON, 1992; PLUTA & KACPRZAK, 2009).

No ciclo de vida dos lentivírus (**Figura 8**) o fluxo gênico ocorre da molécula de RNA do virion para uma molécula de cDNA, que se integra ao núcleo e transcreve em RNA novamente.

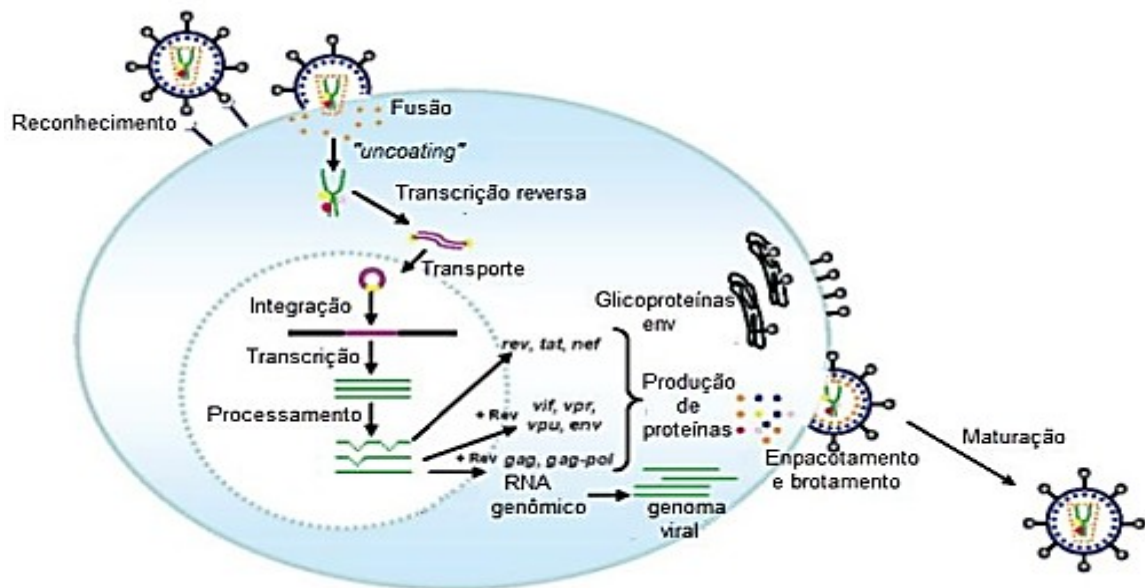


Figura 7: Esquema simplificado do ciclo de vida de um lentivírus. O receptor de membrana da célula alvo reconhece a glicoproteína do envelope do virion, mediando a fusão. O núcleo viral liberado dentro da célula forma um complexo de integração, formado por algumas proteínas do núcleo e pelo material genético. O RNA é retrotranscrito e o cDNA se integra ao genoma da célula, onde utiliza a maquinaria celular para transcrição e processamento de RNA. O RNA transportado ao núcleo é usado na montagem de novas partículas virais. Apenas as fitas ssRNA do vírus são empacotadas na formação dos virions devido ao sinal de empacotamento. No brotamento, os virions adquirem a membrana lipídica e glicoproteínas do envelope. A maturação se dá pela ação da enzima protease (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012 Modificado).

Na infecção, as glicoproteínas do envelope interagem com receptores da membrana da célula-alvo. A interação promove alterações conformacionais no envelope, expondo o peptídeo de fusão presente no domínio transmembrana da glicoproteína, permitindo a fusão do virion à membrana celular. O tipo de glicoproteína determina o receptor e, conseqüentemente, o tipo celular que o vírus é capaz de infectar, estando diretamente relacionado ao seu tropismo (BUKRINSKY *et al.*, 1993). A fusão leva à interiorização do núcleo viral no citoplasma. Segue-se um processo denominado "uncoating", no qual as proteínas do núcleo viral se reorganizam, algumas delas permanecem no complexo com o material genético do virion, outras são liberadas no citoplasma e algumas podem permanecer ligadas à membrana no sítio de fusão. A reorganização leva à formação de complexo de transcrição reversa, denominado complexo pré-integração, no qual ocorre a retrotranscrição do RNA viral em cDNA, mediado pela enzima transcriptase reversa do complexo. As duas fitas de ssRNA são transcritas em uma única fita dupla de dsDNA (BUKRINSKY *et al.*, 1993). O complexo é transportado ao núcleo através do poro nuclear e integra-se ao

genoma da célula hospedeira pela ação da enzima integrase do complexo, originando o provírus. Nos lentivírus, diferente de outros retrovírus como nos gammaretrovírus, o transporte do complexo pré-integração ao núcleo se dá de forma ativa, o que permite que o vírus se integre em células quiescentes (BUKRINSKY *et al.*, 1993). Nos gammaretrovírus, é essencial que a célula esteja em processo de divisão, momento no qual a membrana nuclear desaparece e o complexo integra-se ao genoma alvo (LEWIS & EMERMAN, 1994). Integrado ao genoma, o DNA viral é transcrito e processado pela maquinaria celular, transportado ao citoplasma, onde é traduzido nas proteínas virais. As duas fitas de ssRNA não processadas recebem o sinal de empacotamento que é reconhecida por proteínas Gag e Pol recém traduzidas e ocorre a montagem dos virions. Os novos virions são liberados por brotamento através da membrana celular, onde incorporam a camada lipídica e as glicoproteínas do envelope. Depois de liberado, ocorre a maturação dos virions pela ação da enzima protease, que cliva as poliproteínas Gag e Pol, formando as proteínas necessárias à organização do virion (STEVENSON, 2002; ESCORS *et al.*, 2012).

3.3.4 Vetores lentivirais

O uso de retrovírus para construção de vetores foi introduzido apenas nos anos 80 (MANN; MULLIGAN; BALTIMORE, 1983). Desde então, vários vetores virais foram construídos como estratégia para modificação celular, como os vetores adenovirais (VOLPERS & KOCHANNEK, 2004), vetores adenoassociados (DAYA & BERNIS, 2008), gammaretrovirais (MAETZIG *et al.*, 2011) e os vetores lentivirais (ESCORS *et al.*, 2012) (**Tabela 2**). Os vetores lentivirais ganharam destaque para aplicações em pesquisa e ensaios clínicos devido à sua capacidade de se integrar de forma estável ao genoma da célula hospedeira, garantindo uma expressão estável e duradoura do transgene, e por serem capazes de transduzir células que não estão em divisão (NALDINI *et al.*, 1996a, 1996b).

Tabela 2: Resumo das principais características dos vetores virais mais utilizados

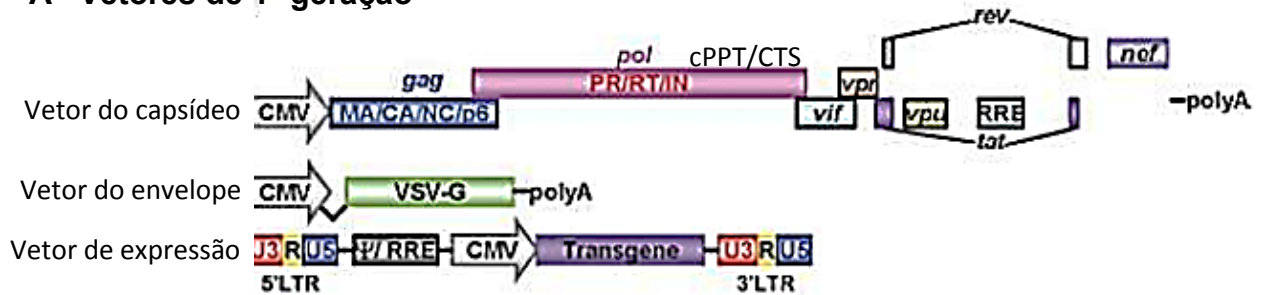
| | VETORES LENTIVIRAIS | VETORES GAMMARETROVIRAIS | VETORES ADENOVIRAIS | VETORES ADENOASSOCIADOS |
|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Genoma | ssRNA | ssRNA | dsDNA | ssDNA |
| Capacidade de empacotamento | 12kb | 7-7,5kb | 37kb | 4,9kb |
| Transdução de células quiescentes | Sim | Não | Sim | Não |
| Integração ao genoma | Sim | Sim | Não | Raramente |
| Duração da expressão | Duradoura | Duradoura | Transitória | Transitória |
| Título viral | 10^6 - 10^7 | 10^6 - 10^7 | 10^{11} - 10^{12} | 10^6 - 10^8 |
| Respostas imunológicas | Pouca | Pouca | Extensa | Extensa |
| Questões de biossegurança | Mutação por inserção | Mutação por inserção | Resposta inflamatória/ Toxicidade | Resposta inflamatória |

Fonte:(MAIER; VON KALLE; LAUFS, 2010 Modificado)

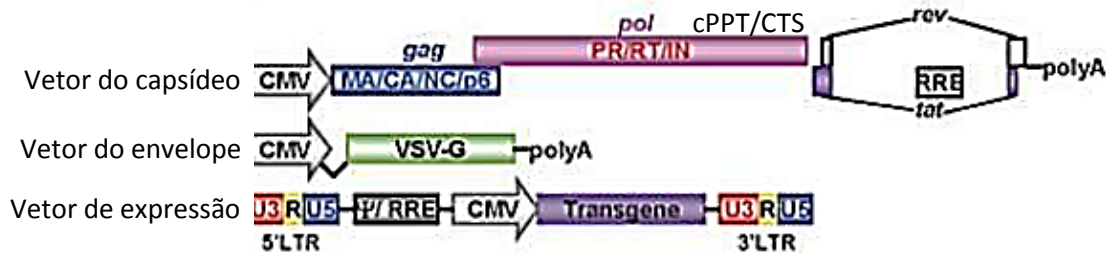
Grande parte dos vetores lentivirais utilizados são derivados do vírus HIV-1. Sendo que são necessárias diversas modificações no genoma retroviral para tornar a utilização desses vetores eficiente e segura. A estratégia geral para produção de vetores lentivirais seguros é separação dos elementos essenciais à integração e transcrição do transgene (elementos *cis-acting*) daqueles usados para produção das proteínas que formam a partícula viral (elementos *trans-acting*) (ESCORS & BRECKPOT, 2010). No genoma do HIV-1, todos esses elementos são encontrados juntos no provírus, o que permite que, quando integrado à célula hospedeira, o provírus possa gerar virions completos, capazes de infectar outras células. Na produção do vetor lentiviral, esses elementos são separados em diferentes plasmídeos (vetores). Um plasmídeo, denominado vetor de expressão lentiviral, carrega o transgene e os elementos *cis-acting* para que esse seja integrado à célula alvo. Esse vetor fornece o cDNA que será usado como molde para a produção do RNA do vetor lentiviral durante a produção do vírus. Separadamente, um ou mais plasmídeos acessórios carregam os elementos *trans-acting* que produzirão as proteínas estruturais do capsídeo e envelope durante a formação das partículas virais (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008). Para a produção dos vírus que serão utilizados na transdução da célula-alvo os plasmídeos são co-transfectados em uma célula produtora, normalmente a célula HEK-293T (NALDINI *et al.*, 1996a). Nesse

processo, a célula produtora possui todos os elementos necessários para formação de partículas virais, porém na montagem das partículas somente o vetor de expressão é empacotado e quando os vírus formados são transfectados nas células alvo, entregam a essa apenas o vetor de expressão. Assim, o transgene é integrado e expresso na célula-alvo devido à presença dos elementos cis-acting, porém a célula transduzida não é capaz de gerar RCLs (em inglês, *Replicant Competent Lentivirus* – Lentivírus Competentes em Replicação), aumentando a biossegurança do vetor utilizado. A divisão do genoma em diferentes plasmídeos dificulta ainda a formação de RCLs por recombinação entre os vetores na célula produtora (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008; SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012). Outra modificação realizada é a substituição do gene env que codifica a glicoproteína do envelope do HIV-1 pelo gene para a glicoproteína do envelope do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV-G) (COIL & MILLER, 2004). Esse processo apresenta duas vantagens para a formação de vírus como veículos virais: 1) a glicoproteína de envelope original do HIV-1 é reconhecida por receptores de células CD4 (linfócitos T), limitando o tipo celular que o vírus é capaz de infectar, enquanto a glicoproteína VSV-G é reconhecida por resíduos comuns de fosfatidilserina presente na membrana de uma grande variedade de células; a substituição aumenta o tropismo do vírus e faz com que ele seja capaz de transduzir um número muito maior de células, incluindo células que não sejam de mamíferos; 2) o VSV-G é substancialmente mais estável que a glicoproteína do envelope do HIV-1, possibilitando a purificação dos vírus formados por ultracentrifugação e obtenção de títulos virais maiores (BURNS *et al.*, 1993). A substituição também dificulta a formação de RCLs por recombinação, uma vez que diminui a homologia existente entre o gene VSV-G e vestígios do gene env do HIV-1 presente no vetor do capsídeo. De acordo com as modificações adicionais que foram realizadas, os vetores lentivirais podem ser divididos em três gerações (**Figura 9**).

A Vetores de 1ª geração



B Vetores de 2ª geração



C Vetores de 3ª geração

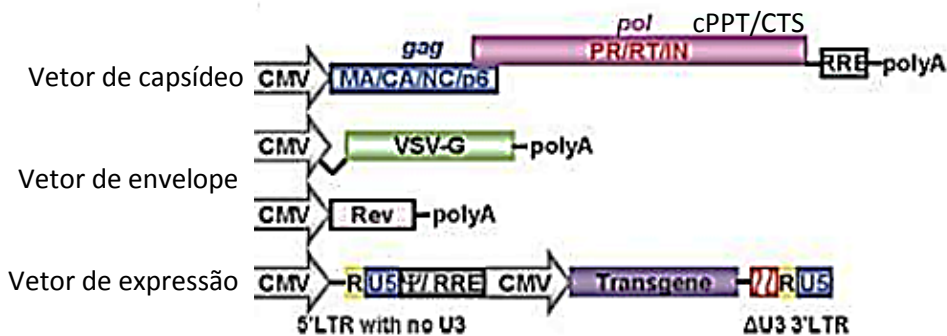


Figura 8: Representação esquemática das gerações de vetores lentivirais. (A) Na primeira geração o vetor do capsídeo apresenta quase todos os genes do DNA proviral do HIV-1, com exceção do gene env para o envelope. O gene VSV-G é codificado por um vetor diferente e o vetor de expressão apresenta as sequências LTRs e expressão do transgene regulado por um promotor interno (CMV). (B) Na segunda geração de vetores lentivirais foram removidos os genes acessórios vif, vpr, vpu e nef responsáveis pela patogenicidade do vírus. (C) na terceira geração o gene tat foi removido do vetor do capsídeo e o gene Rev é expresso a partir de um vetor separado. A deleção do promotor U3 da sequência LTR e adição do promotor de CMV aumenta a biossegurança, gerando vetores auto-inativantes. (SAKUMA;BARRY; IKEDA, 2012 Modificado).

Os vetores de 1ª geração apresentam grande parte do genoma original do HIV-1 presente no vetor do capsídeo e é composto por três plasmídeos. Para a 2ª geração, os genes acessórios relacionados à patogenicidade do HIV-1 foram removidos do vetor do capsídeo, para aumento da biossegurança. Nos vetores lentivirais de 3ª geração a biossegurança foi aumentada através da remoção do

gene tat do vetor do capsídeo e da modificação das sequências LTRs do vetor de expressão e adição de um promotor para regular a expressão do RNA do vetor, normalmente o promotor do citomegalovírus (CMV).

3.3.5 Vetores lentivirais de 1ª Geração

Os vetores lentivirais de primeira geração apresentam três plasmídeos: o vetor do capsídeo, responsável pela codificação das proteínas estruturais do capsídeo e matriz e das enzimas virais; um vetor do envelope com o gene original env substituído pelo VSV-G e um vetor de expressão com a construção desejada (**Figura 9A**). O vetor do capsídeo apresenta os genes originais do HIV-1 de codificação das proteínas estruturais e enzimas gag e pol, os genes regulatórios tat e env e os genes acessórios vif, vpr, vpu, nef, com remoção parcial apenas do gene env. O envelope é codificado pelo gene VSV-G presente no vetor do envelope. Esses dois vetores são desprovidos de sinal de empacotamento (Ψ) e das sequências LTR regulatórias do HIV-1, a fim de evitar a formação de RCLs. A expressão desses vetores na célula produtora é regulada pelo promotor CMV ou RSV (promotor do Vírus do Sarcoma de Rous). As sequências LTR e Ψ estão presentes apenas no vetor de expressão, portanto apenas o mRNA desse vetor é empacotado na formação dos vírus. O vetor de expressão apresenta ainda a sequência RRE e um promotor interno para regular a expressão do transgene (SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012). Essa primeira geração de vetores lentivirais foi especialmente desenvolvida de forma a evitar a formação de RCLs, com aumento da biossegurança na sua utilização. Entretanto, a presença das sequências LTR no vetor de expressão, que possuem a sequência U3 promotora do HIV-1, poderiam ativar proto-oncogenes quando inseridos no genoma da célula-alvo. Além disso, os elementos vif, vpr, vpu e nef estão relacionados à patogenicidade do vírus e apresentam ação citostática e citotóxica (DELENDÁ, 2004; COCKRELL & KAFRI, 2007). A identificação dos elementos dispensáveis à ação integrativa do vetor foi essencial para o desenvolvimento de vetores de 2ª geração, com segurança aumentada.

3.3.6 Vetores lentivirais de 2ª Geração

Para os vetores de 2ª geração houve a remoção dos genes acessórios vpr, vif, vpu e nef do cassete do capsídeo, que foi composto, portanto, apenas pelos genes gag, pol, tat e rev. Os demais vetores permaneceram inalterados (**Figura 9B**). Os genes vpr, vif, vpu e nef são importantes para a replicação do HIV-1 em células primárias in vivo. O HIV-1 desprovido de vif não apresenta replicação quando infectados em linfócitos, pois a proteína vif é necessária para inativar alguns fatores antivirais da célula hospedeira (FOUCHIER *et al.*, 1996; HARRIS *et al.*, 2003). Sabe-se também que a proteína vpu age de forma semelhante, neutralizando o agente antiviral Tetherina da célula infectada (NEIL; ZANG; BIENIASZ, 2008; SAKUMA *et al.*, 2009). Além dessas, a proteína nef promove a degradação de proteínas do hospedeiro, como as proteínas MHC de classe I e CD4, promovendo uma evasão do sistema imune e maior produção de vírus (COLLINS *et al.*, 1998). Apesar de serem importantes para a infecção do HIV-1, a remoção desses genes do vetor lentiviral não afeta sua atividade. A segurança nesses vetores foi melhorada com a múltipla atenuação dos genes virais, entretanto a possibilidade de ativação de proto-oncogenes adjacentes ao local de inserção do vetor de expressão pelo promotor U3 presente na sequência LTR ainda é possível. Essas e outras modificações foram necessárias nos vetores de 3ª geração para construção de vetores mais seguros (ZUFFEREY *et al.*, 1997).

3.3.7 Vetores lentivirais de 3ª Geração

Nos vetores de 3ª geração, modificações foram realizadas no vetor do capsídeo e de expressão. No vetor do capsídeo houve a remoção do gene tat e separação do gene rev em um quarto plasmídeo, aumentando a dificuldade de recombinação dos plasmídeos e formação de RCLs. No vetor de expressão, a sequência 3'LTR foi modificada para produção de vetores auto-inativantes (SIN – do inglês *Self-inactivating*) e o promotor U3 da região 5'LTR foi substituído por um promotor forte (CMV ou RSV) para regular a expressão do vetor (**Figura 9C**). O gene tat é indispensável para transcrição do provírus integrado ao genoma no ciclo de infecção do HIV-1. Ele reconhece o sítio TAR presente na região 5'LTR, regulando a região promotora U3, que ativa a transcrição do genoma. A remoção do gene tat foi possível devido à substituição do promotor U3 5'LTR no vetor de

expressão. A ação promove a independência de *tat* na transcrição do vetor, sem afetar a eficiência de produção (DULL *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1998).

A construção de vetores SIN já havia sido bem-sucedida para vetores baseados em MLV e a mesma abordagem foi realizada para os vetores baseados em HIV-1 (YU *et al.*, 1986). O vetor SIN é construído pela remoção de parte do U3 (Δ U3) na região 3'LTR, o que promove a inativação da atividade promotora e enhancer presente nessa sequência. No ciclo normal do HIV-1, as regiões LTR das extremidades 5' e 3' do provírus são igualmente compostas pelas regiões U3, R e U5. Enquanto a região 5' U3 age como promotor, a região 3' R funciona como sítio polyA que sinaliza o final da transcrição, que ocorre de 5'R a 3'R. O RNAm produzido na transcrição do vetor não possui, portanto, região 5'U3 promotora. Essa região é produzida por duplicação da 3'U3 durante a transcrição reversa no complexo de integração, portanto uma exclusão da sequência 3'U3 do material a ser integrado leva à mesma exclusão na sequência 5'U3 duplicada durante a inserção. Nos vetores SIN, a transcrição do RNAm do vetor de expressão na célula produtora é regulada por um promotor diferente do 5'U3 e toda região consecutiva ao promotor é transcrita. O sinal de empacotamento presente no RNAm do vetor de expressão faz com que esse seja corretamente empacotado na formação das partículas virais. Quando as partículas virais são transduzidas na célula-alvo, a deleção 5'U3 é transferida por duplicação para a região 5'LTR, formando um vetor integrado incapaz de se replicar. A expressão da construção gênica desejada é regulada pelo promotor interno e os mRNAs gerados não possuem o sinal de empacotamento (MIYOSHI *et al.*, 1998; ZUFFEREY *et al.*, 1998; GINN *et al.*, 2003).

A produção de vetores SIN aumenta a segurança dos vetores lentivirais de 3ª geração por diversos motivos: 1) a formação de RCLs é pouco provável, visto que a região promotora original do vírus está desligada no material integrado; 2) a ativação de proto-oncogenes adjacentes ao local da inserção por atividade promotora da região 3'U3 é evitada ; 3) a translocação da construção inserida por empacotamento da mesma após infecção por um tipo selvagem de vírus é reduzida pois o mRNA transcrito no vetor integrado não apresenta sinal de empacotamento e 4) a interferência transcricional pelas sequências LTR é reduzida (PICANÇO-CASTRO, 2008; SAKUMA; BARRY; IKEDA, 2012).

Outras modificações foram feitas no vetor de expressão para melhorar sua eficiência. As sequências cPPT e CTS foram adicionadas para melhorar a

importação do complexo de integração para o núcleo (SIRVEN *et al.*, 2000) e a adição do elemento regulatório da transcrição do vírus da hepatite de marmota (WPRE) aumenta a estabilidade de transcrito e a expressão (ZUFFEREY *et al.*, 1999).

3.4 Aplicações dos Vetores Lentivirais

Vetores lentivirais têm sido usados eficientemente na transdução de grande variedade de tipos celulares, em tanto em células em divisão, quanto estacionárias, como: células hematopoéticas, células dendríticas e neurônios (NALDINI *et al.*, 1996b; DULL *et al.*, 1998; POESCHLA *et al.*, 1998; DEMAISON *et al.*, 2002). O interesse em sua utilização reside-se no fato desses vetores serem capazes de infectar células em divisão e estacionárias e ainda por integrar o DNA no genoma hospedeiro. Nesses vetores, o DNA clonado no vetor de expressão é integrado ao genoma e expresso pela maquinaria celular. A expressão é guiada pelo promotor interno da construção gênica do vetor de expressão, que também é integrado ao genoma. Por estar integrada, a construção é ainda replicada durante a divisão celular, gerando células descendentes que também expressam o gene (MILLER, 1997).

Os vetores de expressão lentivirais podem ser construídos com estruturas gênicas complexas, para produção de uma ou mais proteínas pela célula. Para isso, são produzidos vetores multigênicos, nos quais a mesma construção gênica guia a produção de duas ou mais proteínas. Esse processo pode ser feito através da inserção de mais de um cassete de expressão no vetor, no qual cada proteína é expressa independentemente, cada qual guiada por um promotor diferente (YU *et al.*, 2003), ou através da construção de vetores policistrônicos, no qual a expressão dos genes é regulada por um mesmo promotor interno. Na construção de vetores policistrônicos, as sequências gênicas são ligadas por um componente IRES (Sítio interno de ligação do ribossomo), que possibilita a expressão de duas proteínas independentes transcritas pelo mesmo promotor (ZHU, 2001) ou pela adição do peptídeo 2A, que cliva a poliproteína produzida em proteínas independentes (SZYMCZAK *et al.*, 2004).

Sendo assim, os vetores lentivirais podem ser utilizados para expressão de diversas construções gênicas de forma duradoura nas células de interesse. A utilização de promotores internos específicos a determinadas linhagens celulares na

construção lentiviral a ser transduzida pode ser uma alternativa para expressão direcionada de genes. As construções podem ser transduzidas com o objetivo de se expressar genes constitutivos para análise do desenvolvimento celular ou para produção de proteínas recombinantes. (KOOTSTRA; MATSUMURA; VERMA, 2003; DA ROSA *et al.*, 2012). Vetores lentivirais também podem ser usados para produção de animais transgênicos (MCGREW *et al.*, 2004), para regulação da expressão gênica na célula-alvo, através do fornecimento a essa de fatores para regulação transcricional ou pós-transcricional (MILLER, 1997) e para reprogramação celular através da expressão de fatores de transcrição específicos (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011). A construção de vetores lentivirais através de modificações moleculares ou inserção de transgenes de interesse é importante para diversas aplicações em biotecnologia. Entre os vetores virais disponíveis para transferência gênica, os vetores lentivirais foram escolhidos devido sua capacidade de se inserir no genoma da célula hospedeira e de transduzir células que não estão em divisão.

3.5 NRF2 (*Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2*): Estrutura, expressão gênica e função.

As células estão constantemente sendo expostas a diferentes substâncias tóxicas que podem levá-las a danos irreversíveis, tais como xenobióticos, drogas e raios U.V. (Raios ultravioletas), além de produtos endógenos, como espécies reativas de oxigênio (ROS), hidroperóxidos e quinonas (RAHMAN, 2007). Se as células não forem checadas constantemente, esses estresses levam posteriormente a alterações fisiológicas. Para se protegerem de tais problemas, as células desenvolveram mecanismos adaptativos que evitam que substâncias que levam ao estresse continue sendo tóxicas, o que inclui diversos genes de fase II de defesa, como por exemplo, NQO1, NQO2, Glutathione transferase (GST), Glutathione redutase (GR), Glutathione peroxidase (GPx), HO-1 e SOD1, sendo este último também regulado em macrófagos pela infecção por *L. amazonensis* (VIVARINI *et al.*, 2011).

Na via de sinalização de NRF2, ambas as expressões constitutivas e induzidas de um arsenal de genes incluem a atividade de um elemento regulatório no promotor denominado ARE (*Antioxidant Responsive Element*) (WASSERMAN & FAHL, 1997). A ativação da transcrição desses genes através da região ARE é controlada por uma família de fatores chamada *Cap'n'Collar* (CNC) que inclui quatro membros: NRF1, NRF2, NRF3 e p45-NF-E2 (CHAN *et al.*, 1995; MOTOHASHI *et al.*,

2002). Os fatores transcricionais NRF1 e NRF2 são ubiquamente expressos, enquanto NRF3 está restrito a células placentárias e hepáticas, e NF-E2 a eritrócitos (SANKARANARAYANAN & JAISWAL, 2004). Estudos em camundongos *knockout* revelam que NRF1 e NRF2 apresentam distintos fenótipos e diferentes papéis. Enquanto NRF1 é essencial na embriogênese, camundongos NRF2 *knockout* são viáveis e não exibem muitos defeitos fenotípicos, exceto por serem altamente sensíveis a problemas oxidativos (CHAN *et al*, 1996; KWAK *et al*, 2001).

NRF2 é reportado como o principal mediador celular na adaptação a estresse oxidativo (desequilíbrio entre a produção de ROS e sua remoção através de sistemas enzimáticos ou não enzimáticos) (KASPAR *et al*, 2009). A estrutura gênica do NRF2 humano consiste em quatro exóons e 1770 nucleotídeos, pouco diferente do gene murino, com cinco exóons e 1794 nucleotídeos. Apesar dessas pequenas diferenças, encontramos na região proximal do promotor do gene NRF dois sítios regulatórios denominados AREL-1 e AREL-2 (*Antioxidant Responsive Element Like*), cuja localização no promotor murino é -492 e -754 respectivamente (KWAK *et al*, 2002). O tratamento com D3T (3H-1,2-dithiole-3-thione) uma molécula anticarcinogênica, induziu a ligação de NRF2 preferencialmente no sítio AREL-2, permitindo uma autoregulação positiva, culminando consecutivamente em uma persistente indução de genes da fase II de resposta antioxidativa (KWAK *et al*, 2002). Em outro estudo visando o entendimento da regulação gênica de NRF2, Yu e colaboradores (2010) demonstraram que existem distintos sítios alvos de metilação localizados em ilhas CpG flanqueando o exón 1, principalmente na região proximal do promotor em modelos murinos de câncer de próstata. Além desses sítios, há também modificações de histonas através da atividade de histonas deacetilases (HDACs) que auxiliam na repressão gênica de NRF2, evidenciando, em conjunto, que existe uma regulação epigenética desse fator transcricional.

A estrutura protéica do NRF2 contém domínios distintos e com funções específicas: Neh1 a Neh6 (**Figura 10**). O domínio Neh1 contém regiões de localização nuclear, de exportação nuclear, e de heterodimerização e ligação ao DNA. A região Neh2 está associada a ligação com seu inibidor Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein1*) e a sua regulação pós-traducional, assim como a região Neh3, que também é regulada por modificações como a fosforilação da tirosina 568. Já as regiões Neh4 e Neh5 apresentam atividade de transativação quando associadas ao coativador CBP/p300, e o domínio Neh6 é alvo de diversas

modificações pós-traducionais independente de Keap1 (**Figura 10**) (ZHANG *et al*, 2013).

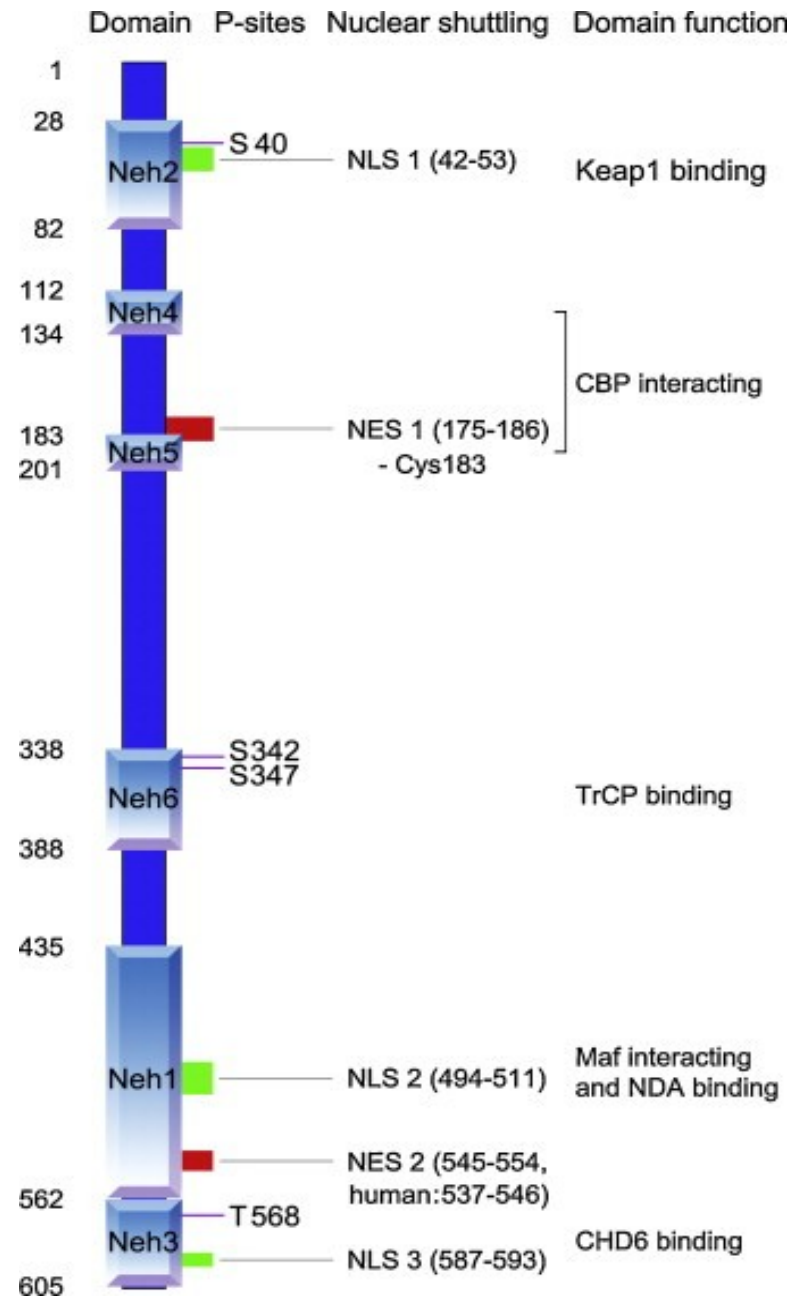


Figura 9: Domínios funcionais de NRF2 e sua interação com outras proteínas (Retirado de ZHANG *et al.*, 2013 – *Progress in Neurobiology*).

3.5.1 Via de sinalização de NRF2 e suas interações

A regulação de NRF2 é principalmente feita pelo seu inibidor denominado Keap1 (DHAKSHINAMOORTHY & JAISWAL, 2001). O complexo protéico NRF2/Keap1 é um potente sensor oxidativo que, em condições normais, Keap1 juntamente com a Ubiquitina *E-ligase Cullin-3* levam o NRF2 constantemente para degradação no proteossoma 26S. Na resposta a diferentes tipos de estresses, NRF2 é dissociado de seu inibidor através de distintas modificações pós-traducionais em Keap1 e em NRF2, levando-o ao núcleo e coordenando a expressão de diversos genes (**Figura 11**). No núcleo, NRF2 se dimeriza com outros fatores transcripcionais, como Maf ou Jun, aonde irão se associar fisicamente a região regulatória ARE em distintos promotores (SYKLOTIS & BOHMANN, 2010).

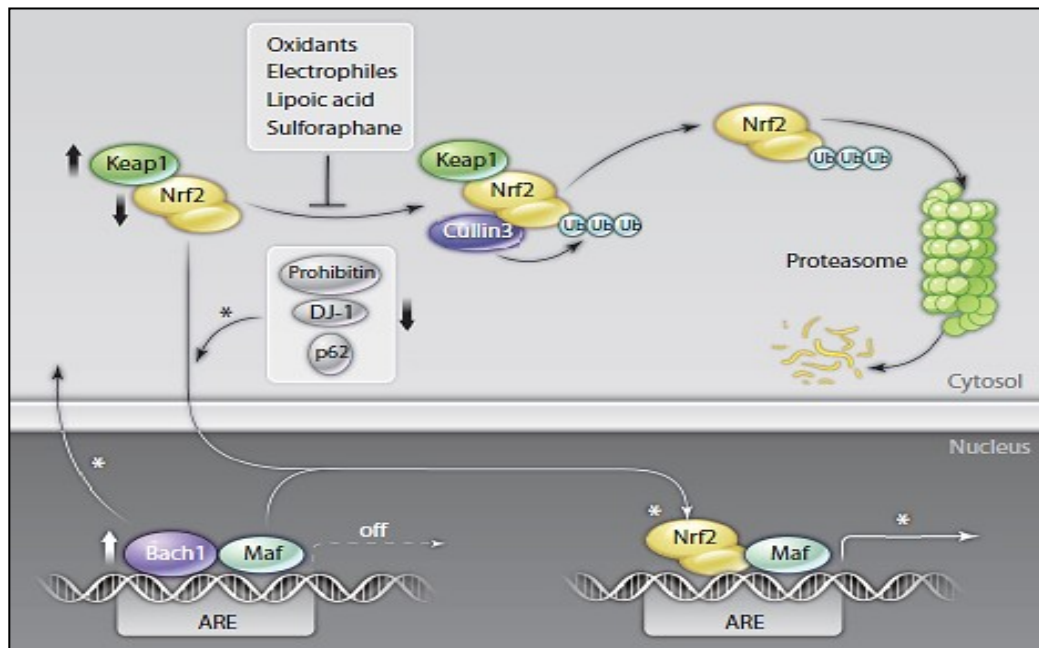


Figura 10: Via de ativação e regulação negativa de NRF2 sob distintos estímulos (Retirado de SYKLOTIS & BOHMANN, 2010 – *Science*).

Recentemente, foi sugerida a estreita relação entre a via de NRF2 e alguns microRNAs, tanto regulando NRF2 quanto seu inibidor Keap1. Tendo como alvo Keap1, o miR-200a é inibido em células de origem de câncer de mama, permitindo a constante degradação de NRF2 e progressão do tumor (EADES *et al*, 2011). Já como alvo o NRF2, diversos trabalhos demonstraram que o miR-144, miR-28, miR-27a, miR-142 e o miR-153 conseguem inibir a tradução de NRF2 por parear com

acetiltransferase, induzem a ativação de NRF2 e de seus genes alvos. Ao mesmo tempo, esses mesmos autores demonstram que os resíduos Lys588 e Lys591 são alvos de deacetilação por proteínas denominadas SIRT1 (*NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*). Mercado e colaboradores (2011) demonstraram que a HDAC2 (*Histona deacetilase 2*) favorece a atividade de NRF2, haja visto que após sua inibição com shRNA-HDAC2, o tratamento com H₂O₂, forte indutor de NRF2, não teve significativo efeito em genes regulados por esse fator transcricional, demonstrando que modificações pós-traducionais como a deacetilação via HDAC2 permitem uma maior estabilidade protéica desse fator transcricional. Em contrapartida, o tratamento com TSA (Tricostatina A), inibidor geral de histonas deacetilases, em células neuronais demonstrou ser importante para inibir a expressão de Keap1, aumentar a dissociação entre Keap1 e NRF2, além de induzir a translocação nuclear de NRF2 e a transcrição de genes alvos desse fator transcricional, como Heme-oxigenase-1 (HO-1) e NAD(P)H:quinona oxiredutase-1 (WANG *et al*, 2012).

Diversos outros trabalhos demonstraram o possível antagonismo entre a via de NRF2 e NFκB. A interação entre p65 e Keap1 reprime a via de NRF2-ARE, segundo Yu e colaboradores (2011), reprimindo diversos genes regulados por NRF2. Além de NFκB, Keap1 também tem como alvo a quinase IKKβ, adicionando monômeros de ubiquitina, levando-a a degradação e impedindo a ativação de NFκB (KIN *et al*, 2010; TIAN *et al*, 2012).

A maneira com que NRF2 interage com outras proteínas está diretamente relacionada com distintas modificações pós-traducionais. NRF2 é fosforilado em múltiplos sítios ao longo de sua cadeia polipeptídica, principalmente por PKC_{zeta}, PERK, GSK3 e diversas MAPKs. A fosforilação por PKC_{zeta} no resíduo de serina-40 de NRF2 permite sua dissociação de Keap1 e sua posterior translocação para o núcleo, ativando diversos genes (BLOON & JAISWAL, 2003; NITURE; JAIN; JAISWAL, 2009). Diversos membros da família das MAPK, como JUNK1/2, ERK2 e p38MEKK3/4, conseguem também fosforilar em distintos resíduos de serina e ativar NRF2, contribuindo para a resposta antioxidante (SUN *et al*, 2009).

Poucos, mas significativos trabalhos demonstram vias alternativas de repressão de NRF2, ou seja, independente de Keap1 e de microRNAs. Recentemente verificado, uma via alternativa de inibição de NRF2 seria dependente da ativação de GSK3, que interage através do domínio Neh6, facilitando a ação de

ubiquitinas-ligases e levando esse fator a degradação (**Figura 13**) (RADA *et al*, 2012; CHOWDHRY, *et al*, 2013). A função de GSK3 já tinha sido demonstrada indiretamente na repressão da atividade de NRF2, onde fosforilava a proteína Fyn no resíduo Thr12, levando sua translocação nuclear e recrutando NRF2 do núcleo para o citoplasma através da fosforilação na Tirosina-568 de NRF2, levando-o posteriormente a degradação no proteassoma 26S (JAIN & JAISWAL, 2007). O trabalho de Chen e colaboradores (2012) estudaram a ação de um composto denominado 4-Ketopinoresinol (4-KPR) em células de carcinoma, um ativador de proteínas antioxidantes cujo elemento regulatório ARE estava contido nos promotores de seus genes. Eles verificaram que o tratamento com 4-KPR resultou na fosforilação de Akt e subsequente translocação nuclear de NRF2, suprimindo o estresse oxidativo intracelular e por conseqüência danos no DNA.

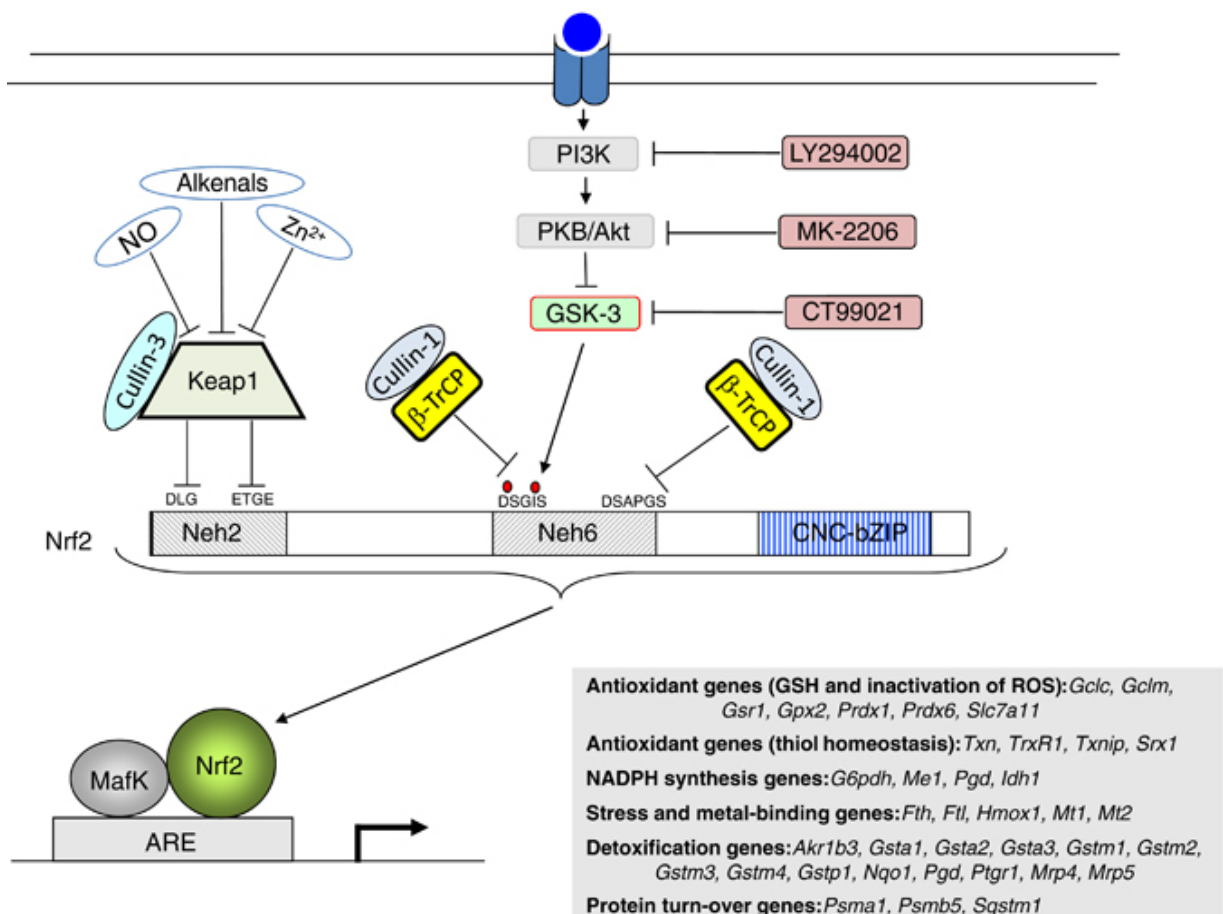


Figura 12: NRF2 é controlado por duas vias distintas e em dois domínios diferentes. Modelo de regulação negativa de NRF2 pela via de Keap1 no domínio Neh2 e por GSK3 no domínio Neh6 (Retirado de CHEN *et al*, 2012).

Não há muitos relatos frente a interação entre componentes das vias de Interferon com a sinalização de NRF2. Croze e colaboradores (2013), através de ensaios de PCR-array, demonstraram que o tratamento com IFN- β em pacientes com Esclerose Múltipla ativava positivamente genes envolvidos com o metabolismo de mitocôndria, com a regulação imune e com processos anti-oxidativos, incluindo o NRF2. Em outro trabalho, células linfoblásticas foram expostas a Arsênico inorgânico, um contaminante ambiental, e verificaram que componentes das vias de IFN-I e NRF2 estavam ativados e sendo expressos (CÓRDOVA *et al.*, 2014). A produção de IFN- γ é atenuada a nível transcricional frente a ativação de NRF2 por seus ativadores tBHQ (*tert-butylhydroquinone*) e BHA (*butylated hydroxyanisole*), enquanto induzem a produção de citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 (ROCKWELL & KLAASSEN, 2008; ROCKWELL *et al.*, 2012). Esse controle negativo nos transcritos de IFN- γ já foi muito bem caracterizado quando PKR está ativada (BEN-ASOULI *et al.*, 2002; KAEMPFER, 2006; SHARMA *et al.*, 2011), possivelmente havendo alguma convergência entre as vias de PKR e NRF2 na produção de IFN- γ .

4. Justificativa

O nosso grupo, em recente publicação, utilizou silenciamento transiente para o fator transcricional NRF2, regulador positivo de genes antioxidativos, demonstrando que a infecção por *L. amazonensis* é dependente dessa proteína na via de sinalização da proteína quinase R (PKR), envolvida classicamente na resposta a infecções virais (Vivarini *et al.*, 2017).

Neste Contexto, o mecanismo de RNAi utilizando shRNA (short hairpin RNA) através de vetor lentiviral surgiu como um método mais estável e eficiente na reprodutibilidade experimental para inibir a expressão gênica do fator transcricional NRF2, nos permitindo utilizar esta ferramenta para diferentes estudos em nosso grupo.

5. Material e Métodos

5.1 Preparo de bactérias competentes

Para produção, uma alíquota da bactéria não competente de *Escherichia coli* cepa DH5 α foi semeada em meio LB-ágar (*Luria-Bertani*) sem antibiótico e incubado em estufa a 37 °C por 16 horas. Uma colônia foi selecionada e inoculada em 5 mL de meio LB-líquido sem antibiótico e incubado sob agitação constante nas mesmas condições. 1 mL das bactérias crescidas no dia anterior foi inoculada em 100 mL de meio LB-líquido em Erlenmeyer estéril de 1000 mL a 37 °C sob agitação durante 1 hora e 30 minutos a 3 horas até atingir a Densidade Óptica – DO (600nm) de 0,3, apurada em leitura por espectrofotômetro (*Celm E-210*). Ao atingir a DO necessária a cultura foi deixada em gelo por 10 minutos e centrifugada a 3700 RPM – 10 minutos – 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado e incubado por 20 minutos no gelo e centrifugado nas mesmas condições. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado gentilmente ressuspendido em 5 mL de CaCl₂ 0,1 M + 15 % de glicerol e aliqotado em criotubos com 100 μ L das bactérias e armazenadas a -80 °C.

5.2 Vetores plasmidiais

5.2.1 Obtenção dos plasmídeos

Para a obtenção em larga escala, realizamos a transformação da linhagem *E. coli* DH5 α e extração dos seguintes plasmídeos:

- pLKO.1 puro-shMission-NRF2 – *Sigma-Aldrich* (esqueleto lentiviral de 3^a geração que contém a sequência shRNA de interesse. Usa puromicina para seleção) (**Figura 14**).
- pMD2G (plasmídeo de expressão do envelope viral VSV-G – vírus da estomatite vesicular) (**Figura 15A**)
- pSPAX2 (plasmídeo de empacotamento lentiviral de 2^a geração) (**Figura 15B**).

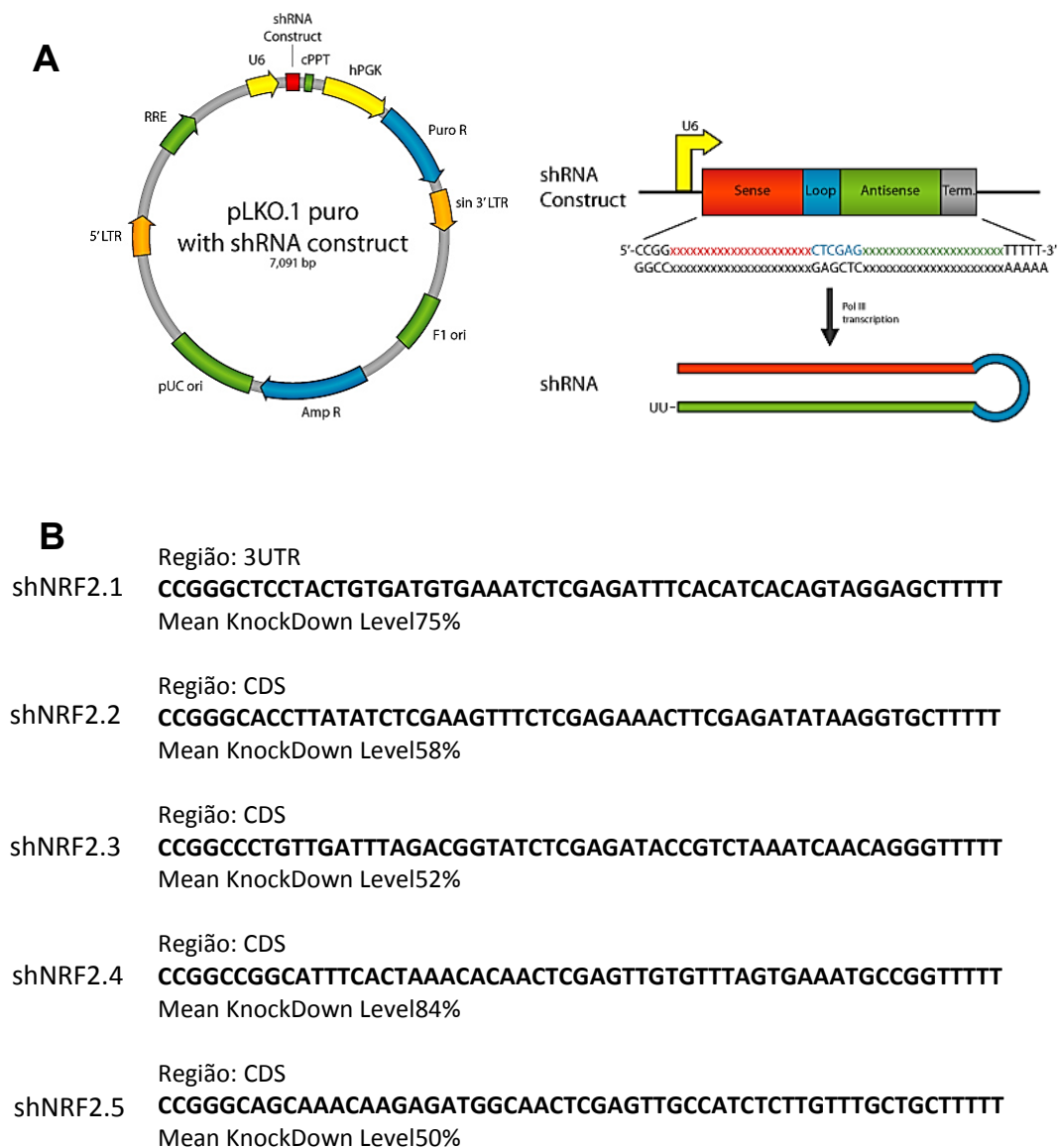


Figura 13: Plasmídeo shRNA mission e construções para silenciar NRF2 (Sigma-Aldrich). (A) Figura do plasmídeo utilizado e o mecanismo de *hairpin* originado a partir das sequências de shRNA. (B) Construções comerciais utilizadas para testar o silenciamento de NRF2 humano. Todos os plasmídeos foram validados pela Sigma-Aldrich com seus respectivos níveis de knockdown.

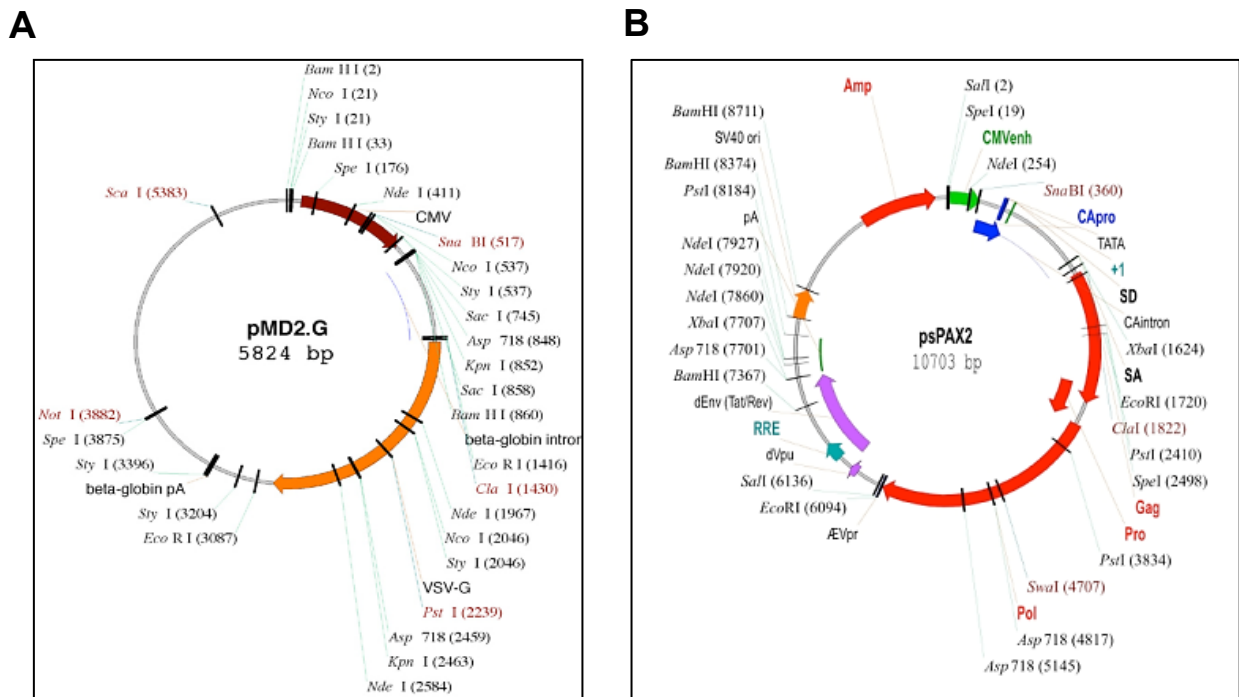


Figura 14: Mapa dos plasmídeos utilizados para produção dos vetores lentivirais. (A) pMD2G - plasmídeo de expressão do envelope viral VSV-G – vírus da estomatite vesicular, responsável pela formação das proteínas do envelope. (B) psPAX2 - plasmídeo de empacotamento lentiviral de 2ª geração contém informações para produção das proteínas Gag e Pol, responsáveis pela montagem do capsídeo e produção de enzimas virais.

5.2.2 Transformação da linhagem *E. coli* DH5 α

Para a transformação, utilizamos alíquotas de 100 μ L de bactérias competentes. Previamente antes da transformação, as bactérias foram descongeladas e mantidas em gelo. Para cada alíquota foi adicionado 1 μ L do material a ser transformado (plasmídeos construídos com as seqüências de correspondências dos genes alvos de NRF2 na concentração de 20 ng/ μ L) e deixado em gelo por 10 minutos. A transformação se deu por choque térmico, submetendo a bactéria a 42 $^{\circ}$ C por 1 minuto seguido de 2 minutos no gelo, visando desestabilizar as membranas de parede celular. Imediatamente após o choque térmico, adicionamos 1 mL de meio LB-líquido e incubamos a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora. Em seguida, plaqueamos o material em LB-ágar contendo 100 μ g/mL de ampicilina (USB) para a seleção de colônias positivas em estufa 37 $^{\circ}$ C por 24 horas.

5.2.3 Extração de DNA plasmidial em baixa escala – miniprep

Após a transformação, colônias positivas isoladas foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio LB-líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina e

incubadas sob agitação constante a 37 °C por 16 horas. Após esse período 1 mL da cultura foi separado para confecção de estoques e os 4 mL restantes foram centrifugados a 16.000 g por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado submetido à extração plasmidial com a utilização do *Monarch® Plasmid Miniprep kit (New England BioLabs® inc)* seguindo instruções do fabricante. O precipitado foi ressuspensionado com 200 µL de tampão de ressuspensão B1(S-adenosilmetionina) e lisado com 200 µL do tampão de lise B2 (dodecil sulfato de sódio e hidróxido de sódio) e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. A essa mistura foi adicionado 400 µL de tampão de neutralização B3 (cloridrato de guanidina, cloreto de potássio e hidróxido de potássio) e incubado por 2 minutos a temperatura ambiente, após esse período foi centrifugado a 16.000 g para separação dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para a coluna de purificação e centrifugado a 16.000 g por 1 minuto. O eluído foi descartado e 200 µL do tampão 1 de lavagem foram adicionados à coluna e incubados por 5 minutos seguido de nova centrifugação. Novamente o eluído foi descartado e adicionado 400 µL do tampão 2 de lavagem e um novo ciclo de lavagem foi realizado. Após as lavagens a coluna de centrifugação foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e ao centro da coluna foi adicionado 30 µL do tampão de eluição de DNA e incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente. Uma nova centrifugação foi realizada. O material extraído foi quantificado em aparelho *Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®)* e armazenado a -20 °C. A integridade do plasmídeo foi realizada através de gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X (item Soluções), corado com brometo de etídeo em um volume final de 0,05 µl/mL. Paralelamente às amostras foi adicionado um padrão de peso molecular (*Lambda DNA/HindIII Marker – Thermo Scientific*) para medição aproximada do tamanho DNA. A corrida eletroforética ocorreu em TAE a 90 volts, e o DNA foi visualizado utilizando um transluminador de luz ultravioleta.

5.2.4 Extração de DNA plasmidial em larga escala – Maxiprep

Foi inoculado 1 mL do estoque da cultura bacteriana em Erlenmeyer de 1000 mL estéril com 300 mL de meio LB-líquido (item Soluções) contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas sob agitação constante a 37 °C por 16 horas. A extração em larga escala das culturas bacterianas foi feita utilizando-se o *PureYield™ Plasmid Maxiprep System Kit (Promega)* seguindo instruções do fabricante. Após o período de incubação, 300 mL da cultura bacteriana foi centrifugado a 5.000 g por 10

minutos e descartado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 12 mL de solução de ressuspensão (*Resuspension Solution*) e lisado com 12 mL de suspensão de lise (*Cell Lysis Solution*) e misturado invertendo gentilmente o tubo de 3 a 5 vezes e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos e depois foram adicionados 12 mL de solução de neutralização (*Neutralization Solution*) e misturados invertendo gentilmente o tubo de 10 a 15 vezes e em seguida foi centrifugado a 14.000 g por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para uma coluna de purificação sendo aplicado sobre a mesma um sistema a vácuo, após a passagem do sobrenadante pela coluna o eluído foi descartado e logo em seguida foram acrescentados 5 mL da solução de lavagem e remoção de endotoxinas (*Endotoxin Removal Wash*) e aplicado vácuo novamente e o eluído descartado e lavado mais uma vez com 20 mL de solução de lavagem (*Column Wash*). Após as lavagens, a coluna de centrifugação foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e ao centro da coluna foi adicionado 1 mL de água (*Nuclease-Free Water*) e centrifugado a 2.000 g por 5 minutos. O material extraído foi quantificado em aparelho Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific®*) e armazenado a -20 °C.

5.3 Linhagens celulares e condições de cultivo

A linhagem HEK 293FT (*Life Technologies*) derivada de células renais embrionárias humanas foi utilizada para o empacotamento e produção das partículas lentivirais. A linhagem foi cultivada em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (*DMEM*) (*Gibco™*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Gibco™*), 1% de solução antibiótica/antimicótica (*Gibco™*) contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B, e para a seleção das linhagens celulares foi adicionado geneticina (*G418 – Gibco™*) na concentração de 500 µg/mL. As células eram aderidas com um inóculo de 10⁶ células por garrafas de cultura de 75cm² para repiques e manutenção e crescidas em estufa com tensão de 5% de CO₂ a 37°C. Os repiques das culturas foram realizados a cada dois dias, sendo as células lavadas duas vezes com tampão PBS e removidas das placas com Tripsina 0,2% acrescida de 0,5mM de EDTA (*Sigma Aldrich*). A tripsina era inativada com a adição do mesmo volume do meio completo. A suspensão de células foi centrifugada a 600 g por 5 min e o sedimento foi então ressuspenso em DMEM nas mesmas condições citadas e as células plaqueadas.

A linhagem HeLa (ATCC® CCL-2™) derivada de células de adenocarcinoma cervical humano foi utilizada para transdução das construções shRNA. A linhagem foi cultivada em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco™), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Gibco™) contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. Para inóculo, manutenção e repiques as células foram submetidas às mesmas condições das células HEK 293 FT.

5.4 Transfecção – Produção dos Lentivírus (Protocolo de TEIXEIRA *et al.*, 2015)

Células HEK 293FT foram transfectadas com 5.3 µg do plasmídeo de formação do envelope viral (pMD2.G), 13.25 µg do plasmídeo de empacotamento viral (pSPAX2) e 18 µg de plasmídeo formando o core (shpLKO). As construções para o silenciamento de NRF2 (shpLKO NRF2 1, 2, 3 e 5) foram obtidas da SIGMA-ALDRICH (**Figura 14**). A célula HEK 293FT foi semeada no dia anterior a transfecção em placas de 14x10 cm a uma concentração de 1×10^7 células por placa em 10 mL de meio DMEM GIBCO, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B e 500 µg/mL de geneticina. No dia seguinte, o meio das células foi removido e a monocamada celular foi lavada duas vezes com 5 mL de PBS aquecido e adicionado 10 mL de meio DMEM GIBCO com 10% SFB GIBCO sem antibióticos. Os plasmídeos foram incubados em 3 mL de Optimem (Gibco™) (Mix 1) e 108 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen™) foram incubados por 5 minutos em 3 mL de Optimem (Mix 2). As duas reações foram misturadas e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi adicionada às células e acrescentado mais 10 mL de meio DMEM GIBCO (sem antibiótico) suplementado com 10% de SFB GIBCO e incubadas por 6 horas em estufa de CO₂ a 37 °C perfazendo um total de 26 mL de meio de cultura e Optimem. Após esse período removemos os 26 mL e foi adicionado 25 mL de DMEM GIBCO sem antibiótico e suplementado com 10% de SFB. No terceiro e quarto dia, o sobrenadante contendo os lentivírus foi recolhido sempre repondo a mesma quantidade de meio de cultura e centrifugado a 2000 RPM, por 10 minutos a 4 °C para remover restos celulares. Esse sobrenadante foi então centrifugado a 20.000 RPM por 2 horas em ultracentrífuga para separação das partículas virais. Os

vírus foram ressuspensos em 100 µL de tampão HBSS e aliquotados e armazenados a -80 °C.

5.5 Transdução das partículas virais (Protocolo de TEIXEIRA *et al.*, 2015)

Vinte e quatro horas antes da transdução, as células HeLa foram plaqueadas a uma concentração de 5×10^5 células por poço em placa de 24 poços com 250 µL de meio DMEM GIBCO, suplementado com 10% SFB, 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. No dia seguinte o meio foi trocado e a monocamada celular lavada 2x com tampão PBS e colocado novamente 250 µL de meio DMEM GIBCO sem antibióticos, suplementado com 10% de SFB e adicionado 10 µL de vírus com 4µg/mL de polybreno (*Santa Cruz Biotechnology*) e incubadas por 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Para controle da seleção utilizamos células WT sem adicionar os vírus.

5.6 Transfecção – Produção dos Lentivírus (Protocolo modificado de TEIXEIRA *et al.*, 2015)

Células HEK 293FT foram transfectadas com 5.3 µg do plasmídeo de formação do envelope viral (pMD2.G), 13.25 µg do plasmídeo de empacotamento viral (pSPAX2) e 18 µg de plasmídeo formando o core (shpLKO). As construções para o silenciamento de NRF2 (shpLKO NRF2 1, 2, 3 e 5) foram obtidas da *SIGMA-ALDRICH* (**Figura 14**). A célula HEK 293FT foi semeada no dia anterior a transfecção em garrafa de 75 cm² a uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células por garrafa em 8 mL de meio DMEM GIBCO, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B e 500 µg/mL de geneticina. No dia seguinte, o meio das células foi removido e a monocamada celular foi lavada duas vezes com 5 mL de PBS aquecido e adicionado 4 mL de meio DMEM GIBCO com 10% SFB GIBCO sem antibióticos. Os plasmídeos foram incubados em 3 mL de Optimem (*Gibco*TM) (Mix 1) e 108 µL de Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*TM) foram incubados por 5 minutos em 3 mL de Optimem (Mix 2). As duas reações foram misturadas e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi adicionada às células e incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ a 37 °C perfazendo um total de 10 mL de meio de cultura e Optimem. Após

esse período removemos os 10 mL e foi adicionado 4 mL de DMEM GIBCO sem antibiótico e suplementado com 10% de SFB. No terceiro e quarto dia, o sobrenadante contendo os lentivírus foi recolhido sempre repondo a mesma quantidade de meio de cultura e centrifugado a 2000 RPM, por 10 minutos a 4 °C para remover restos celulares. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -80 °C.

5.7 Transdução das partículas virais (Protocolo modificado de TEIXEIRA *et al.*, 2015)

Vinte e quatro horas antes da transdução, As células HeLa foram plaqueadas a uma concentração de 4×10^5 células por poço em placa de 6 poços com 2 mL de meio DMEM GIBCO, suplementado com 10% SFB, 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B. No dia seguinte o meio foi trocado e a monocamada celular lavada 2x com tampão PBS e colocado novamente 2 ml de meio DMEM GIBCO sem antibióticos, suplementado com 10% de SFB e adicionado 2 mL de vírus com 4µg/mL de polybreno (*Santa Cruz Biotechnology*) e incubadas por 48 h em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Para controle da seleção utilizamos células WT sem adicionar os vírus.

5.8 Seleção das células com Puromicina

As células foram selecionadas com Puromicina em uma concentração de 2 µg/mL durante 7 dias. No 3º dia após o início da seleção, passamos a colocar 1% de antibiótico/antimicótico para prevenir contaminação e a cada 3 dias era trocado o meio com antibióticos. Após a seleção, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de *Neubauer* e repicadas para garrafas de 25 cm² e ao atingir confluência de 80% a 90% foram transferidas para garrafa de 75 cm² e após nova contagem foram congeladas e estocadas a -80 °C na concentração de 2×10^6 células/mL em criotubos em solução contendo 80% de DMEM, 10% de SFB e 10% de DMSO.

5.9 Western blot

5.9.1 Extração de proteínas totais

As linhagens de células HeLa transduzidas foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^6 células/poço em placa de 6 poços 24 h antes da extração. Em seguida o meio de cultura foi desprezado e as células lavadas duas vezes com 2 mL de PBS. As células foram então raspadas da placa em 100 μ L de tampão de lise gelado (item Soluções) acrescido com o coquetel de inibidores de protease II (*Calbiochem*) em uma diluição de 1:100 e com o coquetel de inibidores de fosfatase (*Sigma - Aldrich*) em uma diluição 1:100 e incubadas no gelo por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas em microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 g. O sobrenadante foi recolhido em um tubo cônico de 1,5 mL e armazenado a -80°C .

5.9.2 Quantificação de proteínas

A dosagem das proteínas obtidas foi realizada utilizando o método descrito por Lowry, *et al.*, (1951). Cada amostra foi analisada em duplicata em microplaca de 96 poços. Foram pipetados 2 μ L de amostra e 200 μ L de mistura alcalina (item Soluções) por poço e incubados por 15 min a temperatura ambiente protegidos da luz. Em seguida, foram pipetados 20 μ L do reagente de *Folin Cicauteau* (item Soluções) e incubados a 30 min protegidos da luz. Após esta última incubação, a mudança de cor da solução foi quantificada através de leitor de ELISA, em um comprimento de onda de 595 nm. Para o cálculo de concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina bovina, variando as concentrações de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, e os valores de absorvância obtidos das amostras foram comparados para adquirir a obtenção da curva padrão e concentração de proteínas correspondentes.

5.9.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A eletroforese foi realizada segundo o método descrito em Sambrook e colaboradores (1989). Amostras de proteína desnaturada foram separadas em um gel SDS-PAGE utilizando um sistema "Mini-Protean II" (Bio-Rad). Placas de vidro que servem de molde para o gel foram limpas com etanol 70% (v/v) para eliminação de resíduos de detergente ou partículas sólidas. Para o gel de corrida foi preparada uma solução de 10 % de acrilamida-bisacrilamida (29:1) e no gel de empacotamento de 3% da mesma solução (item Soluções). A solução foi adicionada às placas de

vidro até ocuparem 3/4 do volume total e uma fina camada de butanol foi adicionada no topo da mistura para se obter uma superfície plana. Após a polimerização do gel de separação, o butanol foi removido e o gel de empacotamento foi adicionado em cima do gel de corrida e o pente separador de amostras foi colocado.

Para a preparação da amostra para eletroforese, foram misturados 30 µg a 50 µg de extrato de proteínas totais em tampão de amostra em uma concentração final de 1X (item Soluções). A amostra foi incubada a 100 °C por 5 minutos para, em seguida, ser aplicada no gel. A corrida eletroforética foi realizada por aproximadamente duas horas a 100 volts em tampão de corrida Tris-glicina contendo SDS (item Soluções).

5.9.4 Transferência das proteínas para membrana de PVDF

Após a eletroforese, o molde de vidro foi desmontado, o gel de empacotamento cortado e o gel de corrida foi transferido para um recipiente contendo tampão de transferência (item Soluções). Em outro recipiente uma membrana de PVDF (0,2 µm *Bio-Rad*) de tamanho exato ao do gel foi ativada mergulhando a mesma em solução de metanol absoluto por 5 min. Em seguida foi montado um “sanduiche” contendo papel de filtro embebido em tampão de transferência – membrana de PVDF – gel de acrilamida – papel de filtro com tampão. Para transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF foi utilizado o sistema de transferência “Mini-trans-blot” (*Bio-Rad*). A transferência foi realizada por 18 horas a 25 V a 4° C.

5.9.5 Bloqueio da membrana de PVDF e reação com anticorpo

A membrana de PVDF contendo as proteínas foi incubada em solução BLOTTO para bloqueio da membrana (item Soluções) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi incubada por 16 horas a 4° C com solução BLOTTO contendo anticorpo primário anti-NRF2 diluído 1:500 (*Cell Signaling Technology*®). A membrana foi então lavada três vezes com TBS-T 0,1 % (item Soluções) por dez minutos para eliminação dos anticorpos não ligados e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP (*Horseradish peroxidase*) (*Santa Cruz Biothechnology*) diluído 1:2000 em solução BLOTTO por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada novamente três vezes com TBS-T 0,1 % por dez minutos. A membrana foi lavada

mais uma vez e revelada pelo kit de detecção de quimioluminescência ECL (*Thermo Scientific*®) e exposta a filmes de raios-X (*X-Omat, Kodak*).

5.9.6 Desligamento do anticorpo da membrana

Para desligar os anticorpos das proteínas contidas na membrana de PVDF, visando posterior ligação com outros anticorpos, a membrana (mantida a -20 °C) foi incubada com 0,2N de NaOH, a temperatura ambiente por 2 min sob agitação e posteriormente lavadas duas vezes com TBS-T 0,1 % por cinco minutos e bloqueada novamente como descrito acima.

5.10 qRT-PCR em Tempo Real

5.10.1 Extração de RNA total

Após a transdução das células HeLa, 2×10^6 células/poço foram plaqueadas em placa de 6 poços 24 h antes da extração. No dia seguinte o meio de cultura foi desprezado e as células lavadas duas vezes com 2 mL de PBS. Para extração do RNA foi utilizado o kit *Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research)* seguindo instruções do fabricante. Foram adicionados 950 µL de Trizol gelado por poço e as amostras foram homogeneizadas para melhor eficiência da lise. O homogeneizado foi deixado à temperatura ambiente por 5 min e depois foram raspadas as células e, em seguida foi adicionado 950 µL de etanol (95%-100%) e homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 g por 1 minuto em tubo Eppendorf e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Logo após as amostras foram transferidas para coluna de purificação e centrifugadas a 13.000 g por 1 minuto, e o eluído foi descartado, adicionando-se em seguida 400 µL de *RNA Wash Buffer* e centrifugado a 13.000 g por 30 segundos e novamente descartado o eluído. Depois foram adicionados 80 µL de DNase I *Reaction Mix* diretamente na coluna de purificação e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos e depois centrifugado a 13.000 g por 30 segundos e depois foi adicionado 400 µL de *Direct-zol™ RNA PreWash* e centrifugado por 1 minuto a 13.000 g, este procedimento foi realizado 2 vezes. Logo após o eluído foi descartado e adicionado 700 µL de *RNA Wash Buffer* e novamente centrifugado por 1 minuto a 13.000 g. A coluna foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e pipetado 50 µL de *DNase/RNase-Free Water* diretamente na coluna de purificação e centrifugado por 1 minuto a 13.000 g. Em seguida o eluído

foi recolhido e a concentração do RNA extraído foi quantificada em aparelho Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*®). Sua pureza era estimada pela razão das leituras das D.O. a 260/280 nm. O RNA foi armazenado a -80° C até o uso.

5.10.2 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando 1 µg de RNA total reversamente transcrito na primeira fita de cDNA utilizando o kit *Improm-II Reverse Transcriptase (Promega)* e oligo (dT) 12-18 primer, seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente foi realizado o Mix-1 com as amostras, oligo (dT) e H₂O (*DNase/RNase free Water*) em tubos Eppendorf de 0,6 mL e colocados no termociclador PTC-100 Thermal Cycler (*MJ Research*) e programado com as seguintes etapas:

1^a – 5 minutos a 70° C

2^a – 5 minutos a 4° C

3^a – 5 minutos a 25° C

4^a – 60 minutos a 42° C

5^a – 15 minutos a 70° C

6^a – resfriamento a 4° C

Após a 3^a etapa o termociclador foi pausado e foi adicionado o Mix-2, que foi preparado com os seguintes reagentes: *Improm-II Reaction Buffer (1X)*, Inibidor RNasin (1u/µL), dNTP mix (0,5 mM), MgCl₂ (3 mM), Transcriptase Reversa (1 µL/reação) e H₂O (*DNase/RNase free Water*) e acionado novamente até a etapa final. O cDNA foi armazenado a -20° C até o seu uso.

5.10.3 PCR quantitativo em Tempo Real

O cDNA obtido anteriormente foi utilizado em ensaios de PCR quantitativo em Tempo Real para a determinação dos níveis de mRNA. As reações foram realizadas com 40 ciclos durante 2 horas no equipamento *StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. As reações foram realizadas em triplicata de cada ponto, utilizando na reação o mix *GoTaq® qPCR Master Mix (2x) (Promega)*, com a concentração variada dos iniciadores, 7,5 µL de SYBR green PCR master mix, 2 µL de cDNA, 4,75 µL de água milliQ e 0,15 µL de ROX, em um volume final de 15 µL. Como controle endógeno foi realizado uma reação com GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). As análises foram realizadas no Software StepOne version

2.0 (Applied Biosystems) A quantificação relativa da expressão dos genes estudados foi feita utilizando-se o método de comparação de Ct ou $\Delta\Delta Ct$. Esse método se baseia na redução dos valores de Cts do grupo controle em relação ao grupo de interesse. Os valores de ambos os grupos foram normalizados por um gene controle ou normalizador. O Ct (cycle threshold - ciclo limiar) é definido como o número de ciclos requerido para que a fluorescência da reação atinja níveis superiores à fluorescência basal da reação (background) e apresente uma amplificação exponencial (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O ensaio foi realizado nas seguintes condições de ciclagem e temperaturas:

- 10 minutos a 95 graus
- 15 segundos a 95 graus e 1 minuto a 60 graus (40x)
- 1 hora de aumento constante de 0,1 graus (Temperatura de Melting)
- 4 graus de resfriamento constante

Na **Tabela 3** estão os nomes e as sequências dos iniciadores utilizados.

Tabela 3: Sequências de iniciadores utilizados para PCR em tempo real.

| Nome | Especificidade | Sequência 5' → 3' | Concentração |
|--------------------|----------------|---|--------------|
| GAPDH F GAPDH R | Humano/murino | 5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3' 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3' | 300 μ M |
| NRF2 F NRF2 R | Humano | 5' CTCCCAGGTTGCCACATTCCC 3' 5' GGGCTCTCGATGTGACCGGG 3' | 200 μ M |

5.11 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados através do teste estatístico ANOVA, corrigido pelo método de Bonferroni comparando todos os pares para amostras independentes utilizando o *Software* Prisma 5. Dados foram expressos através da média de triplicatas e as diferenças significativas foram indicadas para $p < 0.05$.

Soluções

Tampão PBS

8 g de NaCl

0,2 g de KCl

1,44 g de Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

Tampão TBS

10mM Tris-HCl pH 7,5

150mM NaCl

Tampão TAE

4 mM de tris-acetato

1 mM de EDTA

Lowry

Mistura Alcalina

1% Solução Alcalina

1% Tartarato

1% CuSO₄

Reagente de Folin

Folin 1:1 com H₂O destilada

Meio LB (*Luria-Bertani*)

1% bacto-triptona

0,5% extrato de levedura

86 mM NaCl

Meio LB sólido

LB acrescido de agar para uma concentração final de 1,5%

Gel de Agarose 1,0%

(para 100mL - 1g de agarose dissolvidos em TAE)

Tampão de Amostra de DNA

0,2 mM de EDTA

6% de ficol

Tampão de Lise de Proteínas Totais

50mM Tris HCl pH 7.4

150mM NaCl

50mM NaF

10mM β -Glycerophosphate

0,1 mM EDTA

10% Glycerol

1% Triton X-100

Soluções utilizadas para Western blot:**Tampão de Amostra de Proteína 3X**

1mL de glicerol

0,5mL de β - mercaptoetanol

3 mL de SDS 10%;

1,25mL de Tris-HCl 1 M pH 6,7

2 mg de azul de bromofenol

Tampão de Corrida Tris-Glicina

25 mM de Tris-HCl

250 mM de glicina

0,1% de SDS

Tampão de Transferência

25 mM de Tris-HCl

192 mM de glicina

20% v/v de metanol

Solução BLOTTO

5% de leite desnatado Mollico

0,1% de Tween 20

10 mM de Tris-HCl pH 7,5

150 mM de NaCl

Gel de Corrida 10%

5 mL de acrilamida - bisacrilamida 30% (29:1)

570µL de Tris-HCl 2M pH 8,8

90µL SDS 10%

90µL de persulfato de amônio 10%

9µL de TEMED

7,3mL de água destilada

Gel de Empacotamento 3%

900µL de acrilamida - bisacrilamida 30% (29:1)

2925 µL de Tris 2M pH 8,8

150µL SDS 10%

150µL de persulfato de amônio 10%

6µL de TEMED

6,8mL de água destilada

6. Resultados e Discussão

6.1 Protocolos de transfecção e transdução

Foram utilizados dois protocolos na tentativa de transfecção e transdução o primeiro protocolo foi baseado nos trabalhos de (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Durante os ensaios com esse protocolo sempre que fazíamos a transdução ocorria contaminação tanto por bactéria como para fungo. Nossa hipótese é de que a produção lentiviral durante a transfecção estaria sendo contaminada durante a manipulação no processo de ultracentrifugação, decidimos então fazer algumas modificações, tanto na transfecção como na transdução, o que nos permitiu produzir um protocolo modificado baseado nesse trabalho. As modificações nas etapas de transfecção foram as seguintes: mudança na concentração das células HEK 293 FT de 1×10^7 por placa com 10 mL de DMEM com SFB 10% sem antibiótico para $2,5 \times 10^6$ por garrafa de 75 cm² com 4 mL de DMEM com SFB 10% sem antibiótico, aumentamos o período de incubação de 6 horas para 24 horas e cortamos a etapa de ultracentrifugação, estas modificações nos permitiu aumentar a concentração lentiviral devido a diminuição do volume do meio de cultura e minimizar os risco de contaminação. As modificações realizadas nas etapas transdução foram as seguintes: mudança na concentração das células HeLa de 5×10^5 células por poço em placas de 24 poços com 250 μ L de DMEM com SFB 10% sem antibiótico para 4×10^5 células por poço em placas de 6 poços com 2 mL de DMEM com SFB 10% sem antibiótico, volume de vírus de 10 μ L para 2 mL adicionando apenas uma única vez na cultura e incubando as células por 48 horas. Após essas modificações tivemos sucesso durante todas as etapas de transfecção e transdução.

6.2 Análise da Integridade dos plasmídeos usados na transfecção das células HEK 293FT para produção dos vetores lentivirais.

Desde a primeira descrição em 1998 (FIRE *et al.*, 1998) a interferência por RNA demonstrou ser uma importante ferramenta para biologia molecular e terapia gênica. Um dos maiores problemas no silenciamento utilizando RNAi é a ausência de um método de entrega seguro, eficiente e estável. Neste projeto utilizamos um sistema de shRNA baseado em um vetor lentiviral, na qual uma sequência de DNA codificante para shRNA para o gene NRF2 foi incorporado às partículas virais através da transfecção em células HEK 293FT produzindo partículas virais com a

sequência alvo desejada e depois transduzidas em células HeLa para obtenção do silenciamento desejado. As células HEK 293FT são facilmente transfectadas e a presença do gene SV40 *large T antigen* que permite que plasmídeos transfectados sejam facilmente replicados (DUBRIDGE *et al.*, 1987).

O primeiro passo deste trabalho consistiu na verificação das integridades dos plasmídeos das construções de shNRF2 (1, 2, 3, 4 e 5), shRNA Scramble (Controle não-específico) e também dos plasmídeos de empacotamento e do envelope viral (pMD2G e pSPAX2 respectivamente) e análise da eficiência de transformação em bactérias DH5 α de cada shRNA, seguida da extração dos plasmídeos com *Monarch® Plasmid Miniprep kit (New England BioLabs®inc)*. A integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. Na (**Figura 16**) podemos observar a eletroforese em gel de agarose com as cinco construções shNRF2, shRNA Scramble, os plasmídeos de empacotamento e envelope viral, e acrescentado mais uma construção shNRF2 proveniente do estoque do laboratório que denominamos de shNRF2.4A.

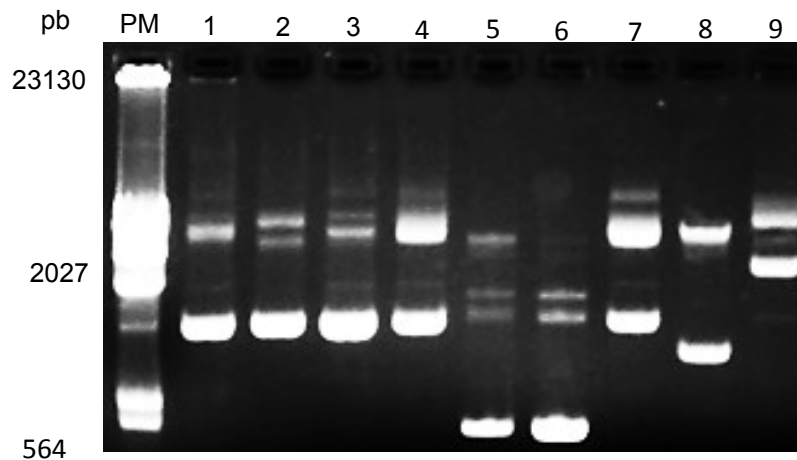


Figura 15: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo das construções shNRF2 e dos plasmídeos de empacotamento e envelope viral. PM: Peso molecular λ DNA Hind III 125 pb a 23,130 pb; 1:SCR; 2: shNRF2.1; 3: shNRF2.2; 4: shNRF2.3; 5: shNRF2.4; 6: shNRF2.4A; 7: shNRF2.5; 8: pMD2G; 9: pSPAX2.

Segundo o processo de purificação utilizado, seria esperado do pDNA (DNA plasmidial) purificado estivesse na sua conformação super-enrolada, e o restante, devido ao relaxamento para forma circular ou a quebras em cadeia simples ou dupla das moléculas do pDNA, inerentes ao processo de purificação, durante a lise celular, estaria na forma linear. É possível notar que a banda correspondente a isoforma super-enrolada aparece intensamente corada para os nove plasmídeos, logo se

pode inferir que o processo de purificação dos pDNAs foi eficiente, resultando em predominância da isoforma super-enrolada, porém as construções shNRF2.4 e shNRF2.4A correm muito a frente, apesar de ser da mesma família das outras construções e tendo o mesmo tamanho, deveriam correr similarmente. Por isso, as mesmas não foram utilizadas nas etapas seguintes para o silenciamento. Em termos de expressão gênica, o pDNA super-enrolado é o mais eficiente, devido ao menor tamanho em resultado da compactação da molécula e é, portanto, a forma preferida para a entrega de genes a células alvo (PRAZERES & FERREIRA, 2004), uma vez que assegura o acesso mais eficiente ao núcleo da célula resultando numa melhor eficiência de expressão do gene em células eucarióticas (CUPILLARD *et al.*, 2005).

6.3 Avaliação da expressão de NRF2 por *western blotting* em Células HeLa

Durante os ensaios de *western blotting* na etapa de revelação não conseguimos observar as bandas correspondentes a NRF2. Repetimos o experimento por mais duas vezes e não tivemos sucesso na revelação. A nossa hipótese provável é de que o anticorpo primário (anti-NRF2) estaria degradado, uma vez que o controle endógeno foi positivo para presença de proteínas e o controle positivo para proteína específica NRF2 não houve a marcação de banda. (Dados não mostrados).

6.4 Efeito do silenciamento com shRNAs sobre o Gene NRF2 em Células HeLa

Células HeLa foram transduzidas com vetores lentivirais contendo as construções shNRF2 (1, 2, 3 e 5) e selecionadas com puomicina na concentração de 2µg/mL durante 7 dias. A avaliação do silenciamento gênico pós-transcricional produzido pelos shRNAs sobre o gene NRF2 utilizados na transdução de células HeLa, foi analisado através da técnica de PCR quantitativo em tempo real, nós utilizamos esta metodologia por apresentar uma alta sensibilidade utilizando baixas quantidades de RNA. Todas as quatro construções shNRF2 foram analisadas admitindo-se como controle positivo células HeLa WT (selvagens) e vetor de controle negativo lentiviral que contém shRNA não codificado (scramble). Durante os ensaios houve o inesperado resultado do scramble apresentar uma superexpressão em relação ao controle positivo (WT), devido a este fato, todas as amostras foram comparadas relativamente somente ao controle positivo (WT) e normalizadas pelo controle endógeno GAPDH. Com isso, avaliamos o grau de silenciamento produzido

pelas sequências. A **Figura 17** ilustra o aumento da expressão do scramble em relação ao controle positivo (WT). A hipótese é de que durante a transdução lentiviral e/ou reação ao DNA dupla fita contendo a sequência alvo, condições de expressão ectópica de proteínas alvos também poderiam causar o efeito de estresse levando a ativação do fator transcricional NRF2.

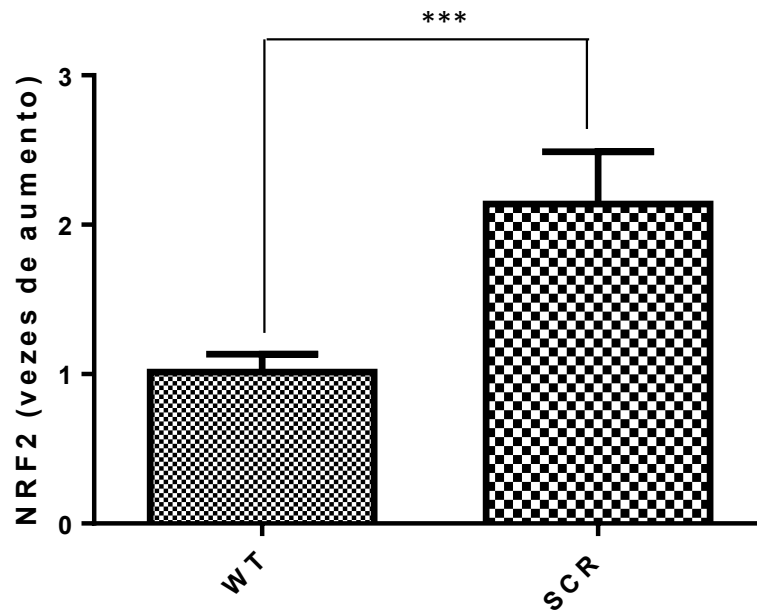


Figura 16: Aumento da expressão de shScramble em relação ao controle positivo (WT) na linhagem de células HeLa mediante tratamentos com shRNAs. As barras representam quantas vezes de aumento teve de expressão do RNAm do gene NRF2. Os resultados de PCR em tempo real foram normalizados para gene controle endógeno GAPDH e comparado com grupo wt e scramble. Células HeLa foram transduzidas com vetores lentivirais e selecionadas com puromicina na concentração de 2µg/mL por 7 dias. Após a seleção o RNA foi extraído, a primeira fita de cDNA sintetizada e procedido um PCR quantitativo em Tempo Real para NRF2, utilizando SYBRgreen e o método da curva padrão comparativa ($\Delta\Delta CT$). Os valores representados indicam às vezes de aumento da intensidade de fluorescência de cada ponto em relação à quantidade de fluorescência detectada nas células não transduzidas (controle). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de *One-Way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test*, com $p < 0,0001$ ($n=3$).

Na **Figura 18** podemos observar a expressão das sequências shNRF2.1, shNRF2.2, shNRF2.3 e shNRF2.5 respectivamente, sendo os dados não significativos quando comparados com WT para a sequência shNRF2.2, porém as sequências shNRF2.1, ShNRF2.3 e shNRF2.5 os dados apresentam diferenças significativas. De acordo com esses dados, houve redução dos níveis de expressão de NRF2 em relação a WT.

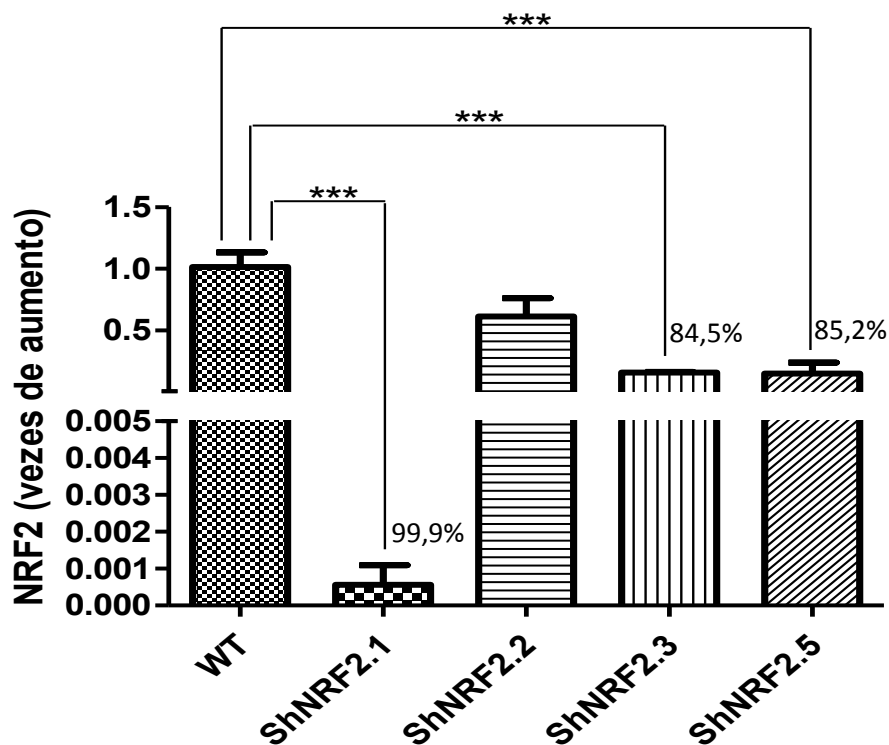


Figura 17: Efeito do Silenciamento das construções de shNRF2 (1, 2, 3 e 5) na linhagem de células HeLa mediante tratamentos com shRNAs. As barras representam quantas vezes de aumento teve de expressão do RNAm do gene NRF2. Os resultados de PCR em tempo real foram normalizados para gene controle endógeno GAPDH e comparado com grupo wt. Células HeLa foram transduzidas com vetores lentivirais e selecionadas com puromicina na concentração de 2 μ g/mL por 7 dias. Após a seleção o RNA foi extraído, a primeira fita de cDNA sintetizada e procedido um PCR quantitativo em Tempo Real para NRF2, utilizando SYBRgreen e o método da curva padrão comparativa ($\Delta\Delta$ CT). Os valores representados indicam às vezes de aumento da intensidade de fluorescência de cada ponto em relação à quantidade de fluorescência detectada nas células não transduzidas (controle). Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de *One-Way ANOVA Bonferroni's Multiple Comparison Test*, com $p < 0,0001$ ($n=3$).

Os resultados indicam que as construções shNRF2.1, shNRF2.3 e shNRF2.5, quando comparado com as células WT, diminui os níveis de expressão do gene NRF2 com consequente silenciamento do mesmo. Como shNRF2.1 teve uma expressão mínima, então pode-se afirmar que foi a construção com melhor efeito de silenciamento. Os resultados de silenciamento in vitro foram satisfatórios, pois parecem estar de acordo com outros dados presentes na literatura. Todavia, pretendemos realizar ainda alguns aperfeiçoamentos metodológicos, visando aumentar a eficácia da ação das sequências trabalhadas, como por exemplo, a busca de outras metodologias de transfecção com menores taxas de citotoxicidade e padronizações de outros controles endógenos. As células HeLa com melhor nível de

silenciamento serão utilizadas pelos membros do nosso grupo para pesquisas posteriores.

7. Conclusão

Os resultados do presente estudo mostram que as construções shNRF2.1, shNRF2.3 e shNRF2.5 apresentaram melhor eficiência de inibição respectivamente (99,9%, 84,5% e 85,2%) de silenciamento gênico nas linhagens celulares HeLa, mediante o uso da interferência de RNA.

Dessa forma, o presente trabalho apresenta contribuição prática, visto que possibilita a utilização de células HeLa silenciadas para o gene NRF2, na realização de estudos envolvendo este fator transcricional, e contribuição teórica, através do protocolo produzido que auxiliará pesquisadores que pretendem desenvolver projetos similares.

8. Perspectivas

- Realizar a seleção de clones específicos do silenciamento do gene NRF2 em células HeLa silenciadas do gene NRF2.
- Induzir a expressão do gene NRF2 e avaliar a indução e o efeito do silenciamento por qRT-PCR em Tempo Real.
- Realizar ensaios de Western Blotting para avaliar a expressão protéica de NRF2 e o efeito do silenciamento.
- Iniciar os estudos utilizando vetores lentivirais com construções shRNA, na tentativa de silenciamento de células THP-1 (linhagem celular de monócitos humanos).

9. Referências Bibliográficas

AAGAARD, Lars; ROSSI, John J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 2-3, p. 75-86, 2007.

ADAMS, Alice; LINDAHL, Tomas; FRESCO, Jacques R. Conformational differences between the biologically active and inactive forms of a transfer ribonucleic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 57, n. 6, p. 1684-1691, 1967.

AMARZGUIOUI, Mohammed; ROSSI, John J.; KIM, Dongho. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. **FEBS letters**, v. 579, n. 26, p. 5974-5981, 2005.

AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350, 2004.

ANDERSON, W. French; LIAO, S. Nature, ". **Human gene therapy**, v. 392, p. 25-30, 1998.

ASHRAF, Shovon I. et al. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in Drosophila. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 191-205, 2006.

BAULCOMBE, David C. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. **Current opinion in plant biology**, v. 2, n. 2, p. 109-113, 1999.

BAULCOMBE, David. RNA silencing in plants. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 356, 2004.

BEN-ASOULI, Yitzhak et al. Human interferon- γ mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 221-232, 2002.

BERNSTEIN, Emily et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363, 2001.

BLOOM, David A.; JAISWAL, Anil K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from I κ Nrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD (P) H: quinone oxidoreductase-1 gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 44675-44682, 2003.

BODEN, Daniel et al. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 17, p. 5033-5038, 2003.

BREAKER, Ronald R. Riboswitches and the RNA world. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, p. a003566, 2012.

BRECKPOT, K.; AERTS, J. L.; THIELEMANS, K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. **Gene therapy**, v. 14, n. 11, p. 847, 2007.

BRENNECKE, Julius et al.bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. **Cell**, v. 113, n. 1, p. 25-36, 2003.

BRENNECKE, Julius et al. Principles of microRNA–target recognition. **PLoS biology**, v. 3, n. 3, p. e85, 2005.

BUKRINSKY, Michael I. et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. **Nature**, v. 365, n. 6447, p. 666, 1993.

BURNS, Jane C. et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 8033-8037, 1993.

CARMELL, Michelle A. et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. **Developmental cell**, v. 12, n. 4, p. 503-514, 2007.

CARTHEW, Richard W.; SONTHEIMER, Erik J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009.

CHAN, Jefferson Y. et al. Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. **Human genetics**, v. 95, n. 3, p. 265-269, 1995.

CHAN, Kaimin et al. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13943-13948, 1996.

CHEN, Huang-Hui et al. 4-Ketopinoresinol, a novel naturally occurring ARE activator, induces the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced cell injury via activation of PI3K/AKT signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 6, p. 1054-1066, 2012.

CHARNEAU, PIERRE; ALIZON, M.; CLAVEL, F. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. **Journal of virology**, v. 66, n. 5, p. 2814-2820, 1992.

CHINNASAMY, Dhanalakshmi et al. Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. **Blood**, v. 96, n. 4, p. 1309-1316, 2000.

CHOWDHRY, Sudhir et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3765, 2013.

CHU, Chia-Ying; RANA, Tariq M. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 412-419, 2007.

COCKRELL, Adam S.; KAFRI, Tal. Gene delivery by lentivirus vectors. **Molecular biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 184-204, 2007.

COGONI, Carlo; MACINO, Giuseppe. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 6, p. 638-643, 2000.

COIL, David A.; MILLER, A. Dusty. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. **Journal of virology**, v. 78, n. 20, p. 10920-10926, 2004.

COLLINS, Kathleen L. et al. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 397, 1998.

CÓRDOVA, Emilio J. et al. The NRF2-KEAP1 pathway is an early responsive gene network in arsenic exposed lymphoblastoid cells. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88069, 2014.

CROZE, E. et al. Interferon-beta-1b-induced short-and long-term signatures of treatment activity in multiple sclerosis. **The pharmacogenomics journal**, v. 13, n. 5, p. 443, 2013.

CRUZ, José Almeida; WESTHOF, Eric. The dynamic landscapes of RNA architecture. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 604-609, 2009.

CUPILLARD, Lionel et al. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. **Vaccine**, v. 23, n. 16, p. 1910-1916, 2005.

DA ROSA, Nathalia Gonsales et al. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 8, p. 1435-1443, 2012.

DALY, Gordon; CHERNAJOVSKY, Yuti. Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. **Molecular Therapy**, v. 2, n. 5, p. 423-434, 2000.

DAYA, Shyam; BERNS, Kenneth I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 4, p. 583-593, 2008.

DE FOUGEROLLES, Antonin et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nature reviews Drug discovery**, v. 6, n. 6, p. 443, 2007.

DELENDIA, Christophe. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. **The journal of gene medicine**, v. 6, n. S1, 2004.

DEMAISON, Christophe et al. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. **Human gene therapy**, v. 13, n. 7, p. 803-813, 2002.

DHAKSHINAMOORTHY, Saravanakumar; JAISWAL, Anil K. Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD (P) H: quinone oxidoreductase1 gene. **Oncogene**, v. 20, n. 29, p. 3906, 2001.

DJEBALI, Sarah et al. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101, 2012.

DUBRIDGE, Robert B. et al. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. **Molecular and cellular biology**, v. 7, n. 1, p. 379-387, 1987.

DULL, Tom et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of virology**, v. 72, n. 11, p. 8463-8471, 1998.

DUNOYER, Patrice et al. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. **The Plant Journal**, v. 29, n. 5, p. 555-567, 2002.

EADES, Gabriel et al. miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40725-40733, 2011.

ESCORS, David; BRECKPOT, Karine. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 58, n. 2, p. 107-119, 2010.

ESCORS, David et al. **Lentiviral vectors and gene therapy**. Springer Science & Business Media, 2012.

ELBASHIR, Sayda M.; LENDECKEL, Winfried; TUSCHL, Thomas. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes & development**, v. 15, n. 2, p. 188-200, 2001.

FIRE, Andrew et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **nature**, v. 391, n. 6669, p. 806, 1998.

FRANKEL, Alan D.; YOUNG, John AT. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. 1998.

FÖRSTEMANN, Klaus et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. **PLoS biology**, v. 3, n. 7, p. e236, 2005.

FOUCHIER, R. A. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8263-8269, 1996.

FRIBOURG, Sébastien et al. Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. **Molecular cell**, v. 8, n. 3, p. 645-656, 2001.

GARTLAND, William J.; SUEOKA, Noboru. Two interconvertible forms of tryptophanyl sRNA in *E. coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 55, n. 4, p. 948-956, 1966.

GINN, Samantha L. et al. Promoter interference mediated by the U3 region in early-generation HIV-1-derived lentivirus vectors can influence detection of transgene expression in a cell-type and species-specific manner. **Human gene therapy**, v. 14, n. 12, p. 1127-1137, 2003.

GREGORY, Richard I. et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 631-640, 2005.

GRAESER, Anne-Christin et al. Nrf2-dependent gene expression is affected by the proatherogenic apoE4 genotype—studies in targeted gene replacement mice. **Journal of molecular medicine**, v. 89, n. 10, p. 1027-1035, 2011.

GREGORY, Richard I.; CHENDRIMADA, Thimmaiah P.; SHIEKHATTAR, Ramin. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. In: **MicroRNA Protocols**. Humana Press, 2006. p. 33-47.

GRIMAUD, Charlotte et al. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 957-971, 2006.

HAMMOND, Scott M. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **nature**, v. 404, n. 6775, p. 293, 2000.

HARRIS, Reuben S. et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 803-809, 2003.

HE, Kan et al. A comparative genome analysis of gene expression reveals different regulatory mechanisms between mouse and human embryo pre-implantation development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 41, 2010.

HU, Wei-Shau; PATHAK, Vinay K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 493-512, 2000.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/index.asp>. Acesso em: 10/03/2018

JAIN, Abhinav K.; JAISWAL, Anil K. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 16502-16510, 2007.

JONES, Ian M.; MORIKAWA, Yuko. The molecular basis of HIV capsid assembly. **Reviews in medical virology**, v. 8, n. 2, p. 87-95, 1998.

JÜHLING, Frank et al. tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl_1, p. D159-D162, 2008.

KAEMPFER, Raymond. Interferon-mRNA attenuates its own translation by activating PKR: A molecular basis for the therapeutic effect of interferon in multiple sclerosis. **Cell research**, v. 16, n. 2, p. 148, 2006.

KASPAR, James W.; NITURE, Suryakant K.; JAISWAL, Anil K. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1304-1309, 2009.

KATZ, Richard A.; SKALKA, Anna Marie. The retroviral enzymes. **Annual review of biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 133-173, 1994.

KAWASAKI, Hiroaki; TAIRA, Kazunari; WADHWA, Renu. World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. **Differentiation**, v. 72, n. 2-3, p. 58-64, 2004.

KETTING, René F. et al. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. **Cell**, v. 99, n. 2, p. 133-141, 1999.

KIM, V. Narry et al. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 811-816, 1998.

KIM, V. Narry. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 5, p. 376, 2005.

KIM, v N. Nam, J. w. **Genomics of microRNA. Trends Genet**, v. 22, p. 165-173, 2006.

KIM, Daniel H.; ROSSI, John J. Strategies for silencing human disease using RNA interference. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 3, p. 173, 2007.

KIM, Jeong-Eun et al. Suppression of NF- κ B signaling by KEAP1 regulation of IKK β activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. **Cellular signalling**, v. 22, n. 11, p. 1645-1654, 2010.

KIM, Eun-Deok; SUNG, Sibum. Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks. **Trends in plant science**, v. 17, n. 1, p. 16-21, 2012.

KLATTENHOFF, Carla; THEURKAUF, William. Biogenesis and germline functions of piRNAs. **Development**, v. 135, n. 1, p. 3-9, 2008.

KOOTSTRA, Neeltje A.; MATSUMURA, Ryusuke; VERMA, Inder M. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 7, n. 5, p. 623-631, 2003.

KWAK, Mi-Kyoung et al. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480, p. 305-315, 2001.

KWAK, Mi-Kyoung et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 9, p. 2883-2892, 2002.

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, Rosalind C.; AMBROS, Victor. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862-864, 2001.

LEE, Yoontae et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415, 2003.

LEE, Nan Sook; ROSSI, John J. Control of HIV-1 replication by RNA interference. **Virus research**, v. 102, n. 1, p. 53-58, 2004.

LEWIS, Paul F.; EMERMAN, Michael. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. **Journal of virology**, v. 68, n. 1, p. 510-516, 1994.

LI, Rui; ZHU, Hongliang; LUO, Yunbo. Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 702, 2016.

LIAO, Yi; TANG, Liling. Inducible RNAi system and its application in novel therapeutics. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 630-638, 2016.

LIPPMAN, Zachary; MARTIENSSEN, Rob. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 364, 2004.

LIU, Changmei; ZHAO, Xinyu. MicroRNAs in adult and embryonic neurogenesis. **Neuromolecular medicine**, v. 11, n. 3, p. 141-152, 2009.

LIU, Qinghua et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1921-1925, 2003.

LIU, Jidong et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1437-1441, 2004.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUCCHETTA, Elena M.; CARTHEW, Richard W.; ISMAGILOV, Rustem F. The endo-siRNA pathway is essential for robust development of the Drosophila embryo. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7576, 2009.

LY, Hung et al. Gene therapy in the treatment of heart failure. **Physiology**, v. 22, n. 2, p. 81-96, 2007.

MACRAE, Ian J. et al. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 512-517, 2008.

MAETZIG, Tobias et al. Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 677-713, 2011.

MAIER, Patrick; VON KALLE, Christof; LAUFS, Stephanie. Retroviral vectors for gene therapy. **Future microbiology**, v. 5, n. 10, p. 1507-1523, 2010.

MANN, Richard; MULLIGAN, Richard C.; BALTIMORE, David. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 153-159, 1983.

MAUGER, David M.; SIEGFRIED, Nathan A.; WEEKS, Kevin M. The genetic code as expressed through relationships between mRNA structure and protein function. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1180-1188, 2013.

MCGREW, Michael J. et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. **EMBO reports**, v. 5, n. 7, p. 728-733, 2004.

MEISTER, Gunter; TUSCHL, Thomas. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343, 2004.

MENCK, Carlos Frederico Martins; VENTURA, Armando Morais. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**, n. 75, p. 50-61, 2007.

MERCADO, Nicolas et al. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 406, n. 2, p. 292-298, 2011.

MILLER, A. D. Development and applications of retroviral vectors. 1997.

MIYOSHI, Hiroyuki et al. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of virology**, v. 72, n. 10, p. 8150-8157, 1998.

MOTOHASHI, Hozumi et al. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. **Gene**, v. 294, n. 1, p. 1-12, 2002.

NALDINI, Luigi et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263-267, 1996a.

NALDINI, Luigi et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 21, p. 11382-11388, 1996b.

NAPOLI, Carolyn; LEMIEUX, Christine; JORGENSEN, Richard. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The plant cell**, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NARASIMHAN, Madhusudhanan et al. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51111, 2012.

NARDI, Nance Beyer; TEIXEIRA, Leonardo Augusto Karam; SILVA, Eduardo Filipe Ávila da. Terapia gênica. **Ciênc. Saúde coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 109-116, 2002.

NEIL, Stuart JD; ZANG, Trinity; BIENIASZ, Paul D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 425, 2008.

NICOLI, Stefania et al. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis. **Nature**, v. 464, n. 7292, p. 1196, 2012.

NITURE, Suryakant K.; JAIN, Abhinav K.; JAISWAL, Anil K. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. **J Cell Sci**, v. 122, n. 24, p. 4452-4464, 2009.

NOLAND, Cameron L.; DOUDNA Jennifer A. "Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways." **Rna**, 2013.

PADDISON, Patrick J. et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. **Genes & development**, v. 16, n. 8, p. 948-958, 2002.

PAL-BHADRA, Manika; BHADRA, Utpal; BIRCHLER, James A. RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. **Molecular cell**, v. 9, n. 2, p. 315-327, 2002.

PAL-BHADRA, Manika et al. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 669-672, 2004.

PAPP, Diána et al. The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. **FEBS letters**, v. 586, n. 13, p. 1795-1802, 2012.

PASTUSZKA, M. K.; MACKAY, J. A. Biomolecular engineering of intracellular switches in eukaryotes. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 20, n. 3, p. 163-169, 2010.

PETERSEN, Christian P. et al. The biology of short RNAs. In: **The RNA world**. Cold Spring Harbor Press, 2006.

PICANÇO-CASTRO, Virginia et al. Lentiviral-mediated gene transfer—a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 18, n. 5, p. 525-539, 2008.

PICANÇO-CASTRO, Virgínia et al. Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral-mediated insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. **Stem cells and development**, v. 20, n. 1, p. 169-180, 2010.

PILLAI, Ramesh S. et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1573-1576, 2005.

PLASTERK, Ronald HA. Micro RNAs in animal development. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 877-881, 2006.

PLUTA, Krzysztof; KACPRZAK, Magdalena. Use of HIV as a gene transfer vector. **Acta biochimica polonica**, v. 56, n. 4, p. 531-595, 2009.

POESCHLA, Eric M.; WONG-STAAAL, Flossie; LOONEY, David J. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. **Nature medicine**, v. 4, n. 3, p. 354, 1998.

PONTING, Chris P.; BELGARD, T. Grant. Transcribed dark matter: meaning or myth?. **Human molecular genetics**, v. 19, n. R2, p. R162, 2010.

PRAZERES, D. M. F.; FERREIRA, G. N. M. Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 43, n. 5, p. 609-624, 2004.

PREALL, Jonathan B.; SONTHEIMER, Erik J. RNAi: RISC gets loaded. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 543-545, 2005.

QUINN, Jeffrey J.; CHANG, Howard Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 1, p. 47, 2016.

RADA, Patricia et al. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP axis. **Molecular and cellular biology**, v. 32, n. 17, p. 3486-3499, 2012.

RAHMAN, Khalid. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAMAKRISHNAN, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 557-572, 2002.

RATTRAY, Alison J.; CHAMPOUX, James J. Plus-strand priming by Moloney murine leukemia virus: the sequence features important for cleavage by RNase H. **Journal of molecular biology**, v. 208, n. 3, p. 445-456, 1989.

ROCKWELL, Cheryl Elizabeth; KLAASSEN, Curtis D. Inhibition of IFN production by the nrf2 activators, tBHQ and BHA, in activated murine T cells. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 1_MeetingAbstracts, p. 1139.4, 2008.

ROCKWELL, Cheryl E. et al. Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4⁺ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1630-1637, 2012.

RODNINA, Marina V.; WINTERMEYER, Wolfgang. The ribosome as a molecular machine: the mechanism of tRNA–mRNA movement in translocation. 2011.

SAINI, Harpreet Kaur; GRIFFITHS-JONES, Sam; ENRIGHT, Anton James. Genomic analysis of human microRNA transcripts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17719-17724, 2007.

SAKUMA, Toshie et al. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. **Journal of virology**, v. 83, n. 5, p. 2382-2385, 2009.

SAKUMA, Toshie; BARRY, Michael A.; IKEDA, Yasuhiro. Lentiviral vectors: basic to translational. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 3, p. 603-618, 2012.

SANGOKOYA, Carolyn; TELEN, Marilyn J.; CHI, Jen-Tsan. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4338-4348, 2010.

SANKARANARAYANAN, Kannan; JAISWAL, Anil K. Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD (P) H: quinone oxidoreductase1 gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 50810-50817, 2004.

SASHITAL, Dipali G.; DOUDNA, Jennifer A. Structural insights into RNA interference. **Current opinion in structural biology**, v. 20, n. 1, p. 90-97, 2010.

SCHMIDT, F. R. et al. Cycloheximide induction of aflatoxin synthesis in a nontoxicogenic strain of *Aspergillus flavus*. **Nature Biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 794, 1983.

SCHMIDT, Frank Rainer. RNA interference detected 20 years ago?. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 267, 2004.

SCHWARZ, Dianne S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, 2003.

SERGANOV, Alexander; NUDLER, Evgeny. A decade of riboswitches. **Cell**, v. 152, n. 1-2, p. 17-24, 2013.

SHABALINA, Svetlana A.; OGURTSOV, Aleksey Y.; SPIRIDONOV, Nikolay A. A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 8, p. 2428-2437, 2006.

SHARMA, Bhumika et al. Protein kinase R as mediator of the effects of interferon (IFN) γ and tumor necrosis factor (TNF) α on normal and dysplastic hematopoiesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 31, p. 27506-27514, 2011.

SIRVEN, A. et al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4103–4110, 2000.

SMIRNOVA, Lena et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 1469-1477, 2005.

SPITALE, Robert C. et al. RNA structural analysis by evolving SHAPE chemistry. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 6, p. 867-881, 2014.

STEVENSON, M. Molecular biology of lentivirus-mediated gene transfer. In: **Lentiviral Vectors**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-30, 2002.

SUN, Zheng; HUANG, Zheping; ZHANG, Donna D. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. **PLoS one**, v. 4, n. 8, p. e6588, 2009.

SYKIOTIS, Gerasimos P.; BOHMANN, Dirk. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. **Sci. Signal.**, v. 3, n. 112, p. re3-re3, 2010.

TABARA, Hiroaki et al. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. **Cell**, v. 109, n. 7, p. 861-871, 2002.

TAFT, Ryan J. et al. Evolution, biogenesis and function of promoter-associated RNAs. **Cell Cycle**, v. 8, n. 15, p. 2332-2338, 2009.

TAKAHASHI, Yuki; NISHIKAWA, Makiya; TAKAKURA, Yoshinobu. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 9, p. 760-766, 2009.

TAY, Yvonne et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1124, 2008.

TEIXEIRA, Karina L. D. **Indução das vias de Resposta a Estresse de Retículo Endoplasmático por *Leishmania amazonensis*: estudo do papel dos fatores transcricionais XBP1 e ATF4.** 2015. 156 p. Tese (Doutorado em Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

TIAN, Hui et al. Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKK β and Bcl-2/Bcl-xL. **Cancer letters**, v. 325, n. 1, p. 26-34, 2012.

TILEMANN, Lisa et al. Gene therapy for heart failure. **Circulation research**, v. 110, n. 5, p. 777-793, 2012.

TÜREI, Dénes et al. NRF2-ome: an integrated web resource to discover protein interaction and regulatory networks of NRF2. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

VALENCIA-SANCHEZ, Marco Antonio et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes & development**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2006.

VENEMA, Jaap; TOLLERVEY, David. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual review of genetics**, v. 33, n. 1, p. 261-311, 1999.

VIVARINI, Áislan de Carvalho et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 12, p. 4162-4173, 2011.

VIVARINI, Áislan de Carvalho et al. Systems approach reveals nuclear Factor erythroid 2-related Factor 2/Protein Kinase r crosstalk in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1127, 2017.

VOLPERS, Christoph; KOCHANNEK, Stefan. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. **The journal of gene medicine**, v. 6, n. S1, 2004.

WANG, Haifeng et al. Different effects of histone deacetylase inhibitors nicotinamide and trichostatin A (TSA) in C17. 2 neural stem cells. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 11, p. 1307-1315, 2012.

WASSERMAN, Wyeth W.; FAHL, William E. Functional antioxidant responsive elements. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 10, p. 5361-5366, 1997.

WATANABE, Shinichi; TEMIN, Howard M. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 19, p. 5986-5990, 1982.

WOOLFORD JR, J. L. The ribosome and its synthesis. **The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics**, p. 587-626, 1991.

WORGALL, Stefan. A realistic chance for gene therapy in the near future. **Pediatric Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 118-124, 2005.

XIE, Zhixin et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. **PLoS biology**, v. 2, n. 5, p. e104, 2004.

XU, Peizhang et al. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. **Current Biology**, v. 13, n. 9, p. 790-795, 2003.

YANG, Muhua et al. MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism. **Breast cancer research and treatment**, v. 129, n. 3, p. 983-991, 2011.

YU, Sheau-Fung et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 10, p. 3194-3198, 1986.

YU, X. et al. Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. **Molecular Therapy**, v. 7, n. 6, p. 827-838, 2003.

YU, Siwang et al. Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8579, 2010.

YU, Miao et al. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. **Cellular signalling**, v. 23, n. 5, p. 883-892, 2011.

ZENG, Yan; YI, Rui; CULLEN, Bryan R. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 17, p. 9779-9784, 2003.

ZHANG, Meijuan et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. **Progress in neurobiology**, v. 100, p. 30-47, 2013.

ZUFFEREY, Romain et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nature biotechnology**, v. 15, n. 9, p. 871, 1997.

ZUFFEREY, Romain et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. **Journal of virology**, v. 72, n. 12, p. 9873-9880, 1998.

ZUFFEREY, Romain et al. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 2886-2892, 1999.

ZHU, Yonghong et al. Multigene lentiviral vectors based on differential splicing and translational control. **Molecular Therapy**, v. 4, n. 4, p. 375-382, 2001.