
SILENCIAMENTO E EDIÇÃO GÊNICA

O silenciamento e a edição gênica são duas ferramentas promissoras da Biologia Molecular que têm se tornado cada vez mais importantes no estudo da Genômica Funcional.

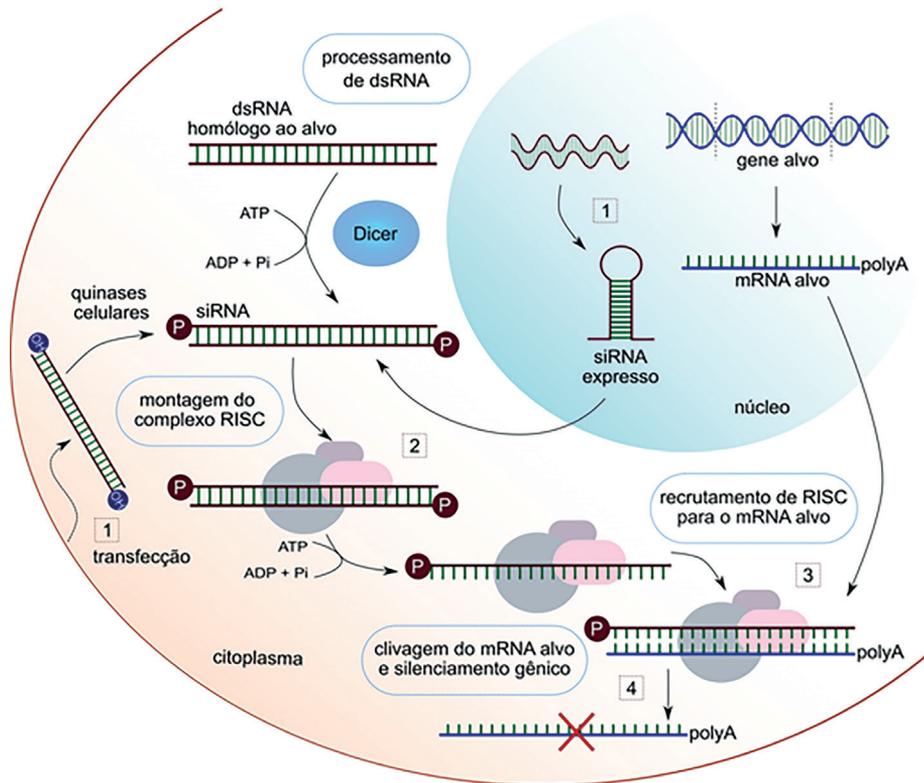
O silenciamento de genes atua ao nível do RNA mensageiro (mRNA), podendo ser transitório ou estável, dependendo do tipo de molécula que está sendo utilizada. O silenciamento transitório é geralmente mediado por *small interfering RNAs* (siRNAs), os quais ligam-se ao mRNA alvo, e com a ajuda do complexo enzimático RISC, ocasionam sua degradação e, consequentemente, inibem a expressão de determinado gene, visto que o processo de tradução não ocorrerá (Figura 1). Por outro lado, o silenciamento estável geralmente utiliza, como ferramenta, *short hairpin RNAs* (shRNAs), os quais são geralmente codificados por vetores de DNA e introduzidos nas células por meio de transfecção plasmideal ou transdução viral. Os vetores de DNA carregam a informação do transcrito, bem como marcas de seleção (ex: cassetes de resistência a antibióticos e/ou marcadores fluorescentes), utilizadas

para permitir a eliminação, com sucesso, de células que não foram transfectadas ou transduzidas e a manutenção das células que apresentam a inibição estável do gene-alvo.

Por outro lado, a edição de genes é um tipo de Engenharia Genética em que trechos de DNA podem ser inseridos, modificados, excluídos ou substituídos no genoma de um organismo. Ao contrário dos métodos tradicionais, que inserem material genético aleatoriamente no genoma de um hospedeiro, as tecnologias atuais de edição de genes alteram regiões específicas do genoma. Nucleases de Dedo de Zinco (ZFNs), Nucleases com Efetores do Tipo Ativador Transcricional (TALENs) e Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPR) são as três tecnologias mais atuais e comuns na edição de genes. Essas tecnologias têm sido amplamente utilizadas na Engenharia Genética e funcionam induzindo quebras no DNA, as quais podem estimular mecanismos de reparo propensos a erros, como a via de junção de extremidades não homóloga (NHEJ), ou mecanismos altamente eficientes, como a via de reparo direcionado por homologia (HDR). Essas ferramentas apresentam um enorme potencial de aplicação nas mais diversas áreas do conhecimento, podendo, por exemplo, ser utilizadas no estabelecimento de linhagens e animais transgênicos, na descoberta de novas drogas e até mesmo na terapia gênica.

Abordaremos aqui, de forma detalhada, o sistema de edição gênica denominado CRISPR/Cas9, uma técnica já bem estabelecida em nosso grupo de pesquisa. Esperamos que o compartilhamento desses conhecimentos possa servir como base para diversos pesquisadores no desenvolvimento de novos projetos de pesquisa nas mais diversas áreas do conhecimento.

Figura 1: Mecanismo de ação do RNA de interferência.



- 1- RNA de dupla fita é inserido na célula através de transfecção ou por expressão de algum vetor;
- 2- Dentro da célula, por processos enzimáticos, a dupla fita de RNA se torna fita simples;
- 3- O pequeno RNA de interferência (*small interfering RNA*, ou simplesmente siRNA) destrói o RNA mensageiro (mRNA), com a ajuda de um complexo enzimático conhecido como RNA *interfering silencing complex* (RISC);
- 4- O RNA mensageiro é degradado e o gene-alvo deixa de ser expresso pela célula.

