

Silenciamento de Genes Com RNA Interferência: Um Novo Instrumento Para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal

Angela Silva Barbosa
Chin Jia Lin

RESUMO

A inativação de genes por *knock-out* ou por bloqueio da tradução de seus transcritos (silenciamento) constitui uma estratégia extremamente poderosa tanto para atribuir função aos genes como para mapear a inter-relação dos diferentes componentes das vias regulatórias intracelulares. Um dos meios para se obter o silenciamento pós-transcricional consiste na ativação de um mecanismo mediado por RNAs fita-dupla (dsRNA) conhecido como RNA interferência (RNAi). O RNAi se mostrou um instrumento extremamente versátil em pesquisa biomédica, podendo ser utilizado em experimentos de silenciamento pontual de genes ou ser adaptado para estudos em larga escala de genômica funcional, podendo, inclusive, ser utilizado como meio de terapia gênica. Neste trabalho, os autores discutem as vias intracelulares envolvidas no RNAi, bem como as principais estratégias e limitações técnicas para se obter o silenciamento em células de mamíferos. Fazem, também, uma revisão das principais aplicações do RNAi na terapêutica de doenças humanas e na investigação de fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos do córtex adrenal. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:612-619)**

Descritores: Silenciamento gênico; RNA interferência; Genômica funcional; Terapia gênica

ABSTRACT

Gene Silencing With RNA Interference: A Novel Tool for the Study of Physiology and Pathophysiology of Adrenal Cortex.

Loss-of-function approaches such as gene knock-out or gene silencing are extremely powerful strategies for assigning function to a gene and for mapping the interconnections of intracellular regulatory pathways. Post-transcriptional gene silencing can be obtained via activation of a double-stranded RNA (dsRNA) mediated mechanism termed RNA interference (RNAi). RNAi has revealed an extremely versatile tool in Biomedical research that can be used in both single silencing gene experiments and in large-scale Functional Genomics studies and has been used as a tool for gene therapy. In the present paper the authors discuss the intracellular mechanisms underlying the RNAi phenomenon, as well the different strategies and their limitations for RNAi gene silencing in mammalian cells. The use of RNAi in the treatment of human diseases and in the investigation of both physiology and pathophysiology of adrenal cortex has also been reviewed. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/5:612-619)**

Keywords: Gene silencing; RNA interference; Functional genomics; Gene therapy

Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42, Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP.

Recebido em 23/08/04
Aceito em 09/09/04

CLASSICAMENTE, AS ANÁLISES GENÉTICAS procedem do fenótipo para o genótipo, ou seja, o fenótipo alterado (de ocorrência natural ou obti-

do por experimentos de mutagênese aleatória) de um determinado indivíduo fornece dicas sobre a função do gene responsável e, por clonagem posicional ou por análise de genes candidatos, pode-se isolar o gene causador da doença. Esta abordagem tem sido utilizada com sucesso na identificação de genes responsáveis por várias doenças, utilizando-se marcadores de localização cromossômica que co-segregam com o traço analisado, ou estudando-se, quando conhecidas, a(s) via(s) bioquímica(s) que produz(em) o fenótipo em questão. Com o advento do seqüenciamento de genomas em larga escala, milhares de genes foram identificados, mas pouco sabemos sobre suas funções. Por exemplo, estima-se que o genoma humano apresenta de 30.000 a 40.000 genes que codificam proteínas, mas a função de pelo menos metade desses genes permanece desconhecida.

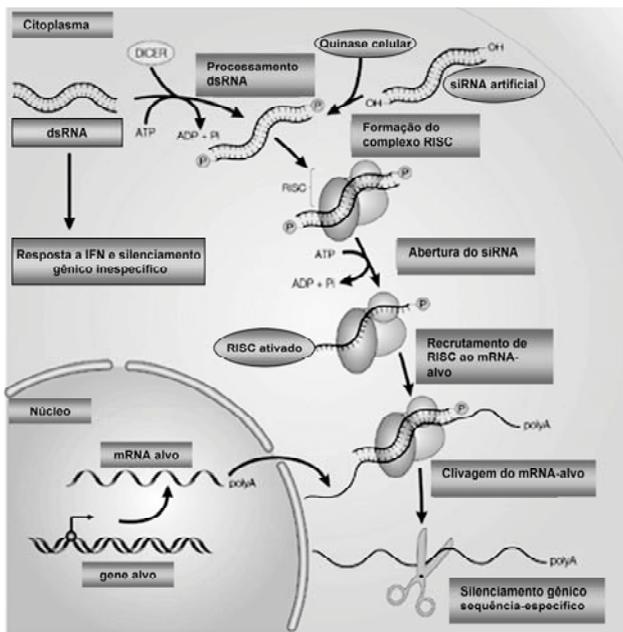
Dentre as estratégias para se conhecer a função de um determinado gene estão os experimentos de perda-de-função. Esta abordagem consiste em impedir que o gene estudado gere a proteína por ele codificada com o propósito de analisar as conseqüências ou o fenótipo decorrente desta inibição em organismo inteiro ou em células cultivadas. A partir destas informações, pode-se deduzir a função do gene inativado, bem como as vias de sinalização a que pertence o produto deste gene. Visto que as abordagens de perda de função procedem do genótipo ao fenótipo, esta estratégia poderosa é chamada de “genética reversa” em oposição à abordagem clássica (direta). A técnica mais amplamente usada atualmente para estudos de genética reversa é a de *knock-out* de genes específicos. Com modificações apropriadas, o *knock-out* pode ser utilizado para identificar funções tecido-específicas de um determinado gene. Embora eficaz e poderoso, trata-se de um método laborioso, demanda custos elevados e requer infra-estrutura especializada no que diz respeito à produção e à manutenção dos organismos, não podendo ser realizado em qualquer laboratório. Alternativamente ao *knock-out* de genes em experimentos de genética reversa, podem ser adotadas estratégias que impeçam a tradução do RNA mensageiro (mRNA). Tomar como alvo mRNAs parece ser teoricamente mais vantajoso em relação à inativação de genes. Em primeiro lugar, os mRNAs são mais acessíveis à inativação do que os genes. Além disso, os mRNAs podem ser alvejados tanto em cultura de células como em organismos inteiros ou embriões, independentemente do estágio de desenvolvimento em que estes se encontram. Em função desta última propriedade, os métodos de silenciamento gênico baseados em mRNA poderão ser utilizados no tratamento

de doenças causadas pela expressão de genes deletérios (conforme discussão adiante). Um dos métodos baseados em mRNA para silenciamento de genes é a utilização de agentes *antisense*. Esta estratégia consiste em introduzir um oligonucleotídeo complementar ao mRNA-alvo dentro de uma determinada célula, por exemplo. O híbrido DNA-RNA formado pode bloquear a ligação do mRNA ao ribossomo ou ativar a degradação do mRNA-alvo por RNase H (1). Apesar da simplicidade conceitual, as tecnologias *antisense* são, de certa forma, limitadas tanto pela ocorrência de inibição inespecífica de outros genes quanto pela dificuldade em se introduzir o agente *antisense* produzido. Há cerca de cinco anos, uma nova ferramenta foi descoberta e vem sendo cada vez mais utilizada para se estudar a função de genes: são os *short interfering RNAs* (*siRNAs*). Essas pequenas moléculas de RNA são intermediárias de um processo conhecido como *RNA interference* ou interferência mediada por RNA. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, em 1998, quando se observou que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) eram capazes de abolir a expressão de um determinado gene com seqüência similar àquele dsRNA (2). Hoje sabemos que, potencialmente, qualquer gene pode ser silenciado em células de mamíferos cultivadas, insetos, plantas e fungos.

Mecanismo de Silenciamento por dsRNA

Embora não compreendido, o mecanismo de silenciamento por RNA foi primeiramente observado em plantas: pesquisadores trabalhando com plantas transgênicas tentavam produzir petúnias com uma pigmentação violeta mais intensa, inserindo como um transgene uma cópia extra do gene que produz a enzima responsável pelo pigmento floral. Contrariamente ao esperado, em vez de roxas, as flores nasciam brancas. Ou seja, a cópia extra do gene para pigmentação não apenas não resultava em intensificação da cor como suprimia, inclusive, a ação do gene endógeno, fenômeno conhecido como “co-supressão”. Mais tarde, os pesquisadores entenderam o mecanismo subjacente: o transgene provavelmente gerou, na planta, intermediários de RNA dupla-fita que reconheceram o mRNA homólogo (endógeno), gerando sua degradação (3).

O RNA dupla-fita é importante no processo de silenciamento porque ele é clivado dentro da célula em fragmentos de 21-25 nucleotídeos por uma nuclease conhecida como *Dicer* (4). Essa enzima é homóloga à RNase III de *E. coli* e apresenta um domínio de ligação a dsRNAs e domínios helicase (5). Os pequenos



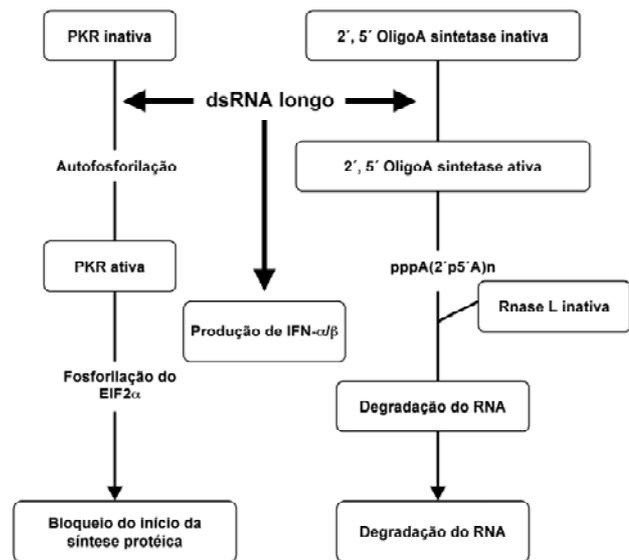
Adaptado de Stevenson, Nat Rev Immunol 3, 851-858, 2003

Figura 1. RNAs dupla-fita longos são processados pela enzima *Dicer* tornando-se siRNAs. A fita *antisense* dos siRNAs é incorporada no complexo *RISC* guiando-o ao mRNA alvo. Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o.

fragmentos de dsRNA, conhecidos como *small interfering RNAs (siRNAs)*, correspondem às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado *RISC (RNA Interference Specificity Complex)*. Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita *antisense* do duplex guia o complexo até o mRNA alvo (6). Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o (4,7) (figura 1).

Como vemos, o silenciamento nesse processo é causado por um mecanismo pós-transcricional: o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido, pois é antes degradado. Evidências de que se trata de um mecanismo pós-transcricional vêm de experimentos em *C. elegans*, em que se introduziram dsRNA de seqüências promotoras e de seqüências intrônicas, e não se observou, nesses casos, silenciamento gênico (2,8). Mas tudo indica que, ao menos em plantas, a introdução de dsRNAs equivalentes a regiões promotoras podem, eventualmente, gerar silenciamento no nível da transcrição por ocorrer metilação da região alvo (9,10).

Em células de mamíferos, não se pode utilizar esse sistema de silenciamento com dsRNA longos, pois moléculas de RNA dupla-fita com mais de 30 pares de



Adaptado de McManus e Sharp, Nat Rev Genet, 3: 737-47, 2002

Figura 2. Ativação de vias celulares por RNAs dupla-fita longos em células de mamíferos.

base ativam vias relacionadas com a produção de interferons e a proteína quinase dependente de dsRNA (*PKR*), levando à apoptose [revisado em (11-15)]. A *PKR*, um potente detector de proteínas virais, é ativada ao se ligar a longas moléculas de dsRNA (similares àquelas produzidas por vírus). Uma vez ativada, ela inibe a tradução de proteínas, fosforilando a subunidade α do fator de início da tradução (*EIF2 α*). Com isso, há uma supressão geral da síntese protéica na célula, levando à apoptose. A *PKR* também ativa as enzimas oligo A sintetase e *Rnase L*, componentes centrais das vias anti-virais, que acabam gerando a degradação inespecífica de RNAs. RNAs dupla-fita com menos de 30 pares de base não são capazes de ativar as vias *PKR* e a via relacionada com a produção de interferons e, portanto, podem ser utilizados nas células de mamíferos para silenciar genes de forma específica (figura 2).

Funções Biológicas do RNAi

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 (16-18). Durante a replicação, vírus de RNA de plantas geram RNAs dupla-fita como intermediários. Essas moléculas são clivadas pela *Dicer* de forma que, quando a infecção se estabelece de fato, o complexo *RISC* ataca os RNA mensageiros virais e a replicação cai. Em contrapartida, os vírus às vezes pro-

duzem proteínas que neutralizam o silenciamento do RNA, o que explica a existência de algumas cepas altamente virulentas (3).

O papel do RNAi na proteção do genoma é ilustrado por mutantes de *C. elegans* que não apresentam esse mecanismo de silenciamento e que, em consequência, têm uma alta frequência de mutações espontâneas em decorrência da maior mobilidade de transposons endógenos (17,18).

As vias de silenciamento em plantas, fungos e animais compartilham um conjunto de proteínas relacionadas, sugerindo que os aspectos comuns das vias sejam antigos. Os procariotos não apresentam esse mecanismo, considerado, portanto, uma aquisição ou inovação eucariótica (19).

O RNAi e a Genômica Funcional

O RNAi vem sendo usado como uma ferramenta poderosa para a análise sistemática de função gênica. O princípio é bastante simples: basta introduzir em uma célula um fragmento correspondente a um determinado gene na forma de RNA dupla-fita, ou na forma de DNA, que irá gerar dentro da célula um dsRNA. O dsRNA deverá ativar o processo *Dicer/RISC* e, conseqüentemente, a célula irá manifestar a perda de função do referido gene. O genoma funcional completo do *C. elegans* tem sido desvendado com o uso de RNAi (20,21). Os pesquisadores criaram uma coleção de *E. coli* que produz dsRNAs correspondentes a cada um dos genes. Os vermes são, então, alimentados com essas bactérias (um só tipo a cada vez) e a função de cada gene é inferida pelo comportamento ou pelas propriedades que o organismo deverá exibir.

Um programa similar está sendo desenvolvido em plantas (16,22). As plantas são infectadas por vírus que carregam insertos correspondentes a cada um dos genes do genoma da planta e a função do gene é inferida pelos sintomas que a planta passa a apresentar.

Com relação ao genoma humano, há grupos trabalhando com a inativação por RNAi de genes específicos, envolvidos no processo de tumorigênese e outras vias.

Considerações Sobre a Utilização de RNAi em Células de Mamíferos

O objetivo de se usar RNAi é silenciar de forma específica um determinado gene. Portanto, deve-se selecionar cuidadosamente uma região do mRNA alvo e evitar que a região escolhida tenha similaridade com regiões pertencentes a outros RNAs não relacionados. Aconselha-se fazer uma busca nos bancos de dados nos quais estão depositadas as seqüências do genoma para

verificar se a seqüência escolhida é específica. Ao escolher um pequeno fragmento de RNA, recomenda-se evitar as primeiras 75 bases após o códon de início da transcrição, seqüências com mais de 50% de G + C, bem como as regiões 5' e 3' não traduzidas, pois assume-se que proteínas regulatórias se liguem a essas regiões (23). Estudos recentes mostram que critérios bioquímicos, termodinâmicos e estruturais devem ser considerados quando se “desenham” siRNAs. Sugere-se que a extremidade 5' da fita *antisense* seja rica em AU, o que confere uma baixa estabilidade a essa extremidade, aumentando a probabilidade de que essa fita seja incorporada ao complexo *RISC*. Por outro lado, aconselha-se que a extremidade 5' da fita *sense* tenha um G ou C, de forma que apresente maior estabilidade interna (23). A utilização de diferentes dsRNA pequenos para um mesmo mRNA pode gerar resultados mais ou menos eficazes, dependendo da estrutura secundária da molécula alvo. Um siRNA é considerado eficiente quando provoca uma redução de pelo menos 90% no nível protéico.

Há várias formas de se gerar siRNAs para os estudos de silenciamento gênico. As moléculas podem ser obtidas *in vitro* por síntese química, transcrição *in vitro* ou ainda por digestão de dsRNA longos com a enzima *Dicer*. Nesse caso, uma série de pequenos fragmentos é gerada, aumentando consistentemente a probabilidade de silenciamento. Entretanto, não se sabe qual molécula provocou o silenciamento. siRNAs podem também ser expressas *in vivo* com a utilização de vetores de expressão. Oligonucleotídeos que deverão codificar a seqüência de RNA desejada (estrutura de *hairpin*) são anelados *in vitro* e em seguida clonados em vetores especializados (24). Dentro da célula, ocorrerá a transcrição e a conseqüente produção do siRNA na forma de *hairpin*. Inúmeras são as vantagens desse método: grandes quantidades de vetor podem ser geradas por propagação em bactérias; as células podem ser submetidas a uma pressão de seleção com a utilização de antibióticos caso o vetor utilizado confira resistência a tais antibióticos, observando-se, conseqüentemente, o efeito do silenciamento sem a interferência das células não transfectadas; não se manipula o RNA diretamente.

Com relação às classes de genes silenciados com a utilização de RNAi, a literatura relata desde aqueles que codificam proteínas estruturais como também genes que codificam enzimas catalíticas (15). Um passo limitante do processo de silenciamento por RNAi é a transfectabilidade das células. As células HeLa fornecem os melhores resultados: 100% das células são passíveis de transfecção com agentes

lipofílicos (substâncias que transportam ácidos nucléicos através das membranas). Outros tipos de células também já deram bons resultados, mas as culturas primárias são notórias por apresentarem baixa eficiência de transfecção. É importante mencionar que a eficiência de transfecção depende não apenas do tipo de célula, mas também do número de passagens e da confluência (15). Tanto transcritos abundantes quanto transcritos produzidos em pequena quantidade podem ser silenciados. É mesmo possível silenciar dois genes simultaneamente (laminina e proteína nuclear do aparato mitótico) (25), mas deve-se, nesse caso, controlar bem as concentrações de siRNAs usadas. O silenciamento de um determinado RNAm já pode ser observado após 18 horas do período de transfecção, mas o fenômeno é transiente: perdura por 3 a 5 ciclos de replicação das células e após 7 a 10 ciclos o gene volta a se expressar (15).

Aplicações do Silenciamento Gênico Mediado por RNAi no Tratamento de Doenças Humanas

Os métodos de silenciamento gênico baseados em RNA podem ser utilizados em terapia gênica por serem aplicáveis em organismos intactos. Para este fim, os vetores que produzem shRNAs são os mais apropriados. As condições que potencialmente se beneficiam desta modalidade de terapia gênica são aquelas nas quais a expressão de genes deletérios desempenha papel importante no desenvolvimento da doença (por exemplo, neoplasias malignas, doenças neurodegenerativas e infecções virais crônicas). Há, na literatura, uma profusão de relatos de desenvolvimento desta modalidade de tratamento. O RNAi foi utilizado com sucesso em modelos experimentais, no silenciamento de genes críticos para a viabilidade (26,27), proliferação (28,29) ou disseminação (30) de células tumorais. Obteve-se, com esta tecnologia, *down-regulation* de genes que conferem resistência das células cancerosas a estímulos pró-apoptóticos (31,32) e a tratamentos antitumorais (33-38), aumentando, assim, a eficiência da quimio e radioterapia. Os vírus da imunodeficiência humana (HIV), da hepatite C (HCV), e da hepatite B (HBV) são alguns patógenos contra os quais estão se desenvolvendo tratamentos baseados em RNAi. A replicação do HIV em linfócitos T humanos foi inibida com o silenciamento de genes do próprio HIV (39,40) ou do hospedeiro (41). O silenciamento da expressão de receptores de quimiocinas CC e CXC confere aos linfócitos T resistência à infecção por HIV (39,42,43). Utilizando RNAi, diversos grupos relataram sucesso na inibição da replicação

e obtiveram clareamento do HCV propagado em linhagem de hepatócitos (44-48). O RNAi também permitiu a inibição da replicação do HBV tanto em cultura de hepatócitos como em camundongos (49). Finalmente, utilizando RNAi é possível atenuar o acúmulo de produtos de genes defeituosos que causam doenças neurodegenerativas como a ataxia espinocerebelar tipo 1 (50), a esclerose amiotrófica lateral (51) e a doença de Alzheimer (52). Visto que a disponibilidade intracelular dos RNAs interferentes é o fator mais importante para determinar a eficácia de um tratamento com esta tecnologia, os esforços atuais estão concentrados no desenvolvimento de sistemas e vetores capazes de transferir grandes quantidades de dsRNA ao tecido ou órgão em que se deseja obter o silenciamento gênico.

Aplicações do RNAi na Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal

O silenciamento de genes obtido com a tecnologia de RNAi abre novas possibilidades para investigação da fisiologia e da fisiopatologia do córtex adrenal. Praticamente todos os aspectos da biologia e da fisiopatologia do córtex da supra-renal parecem se beneficiar desta nova técnica. A regulação do eixo hipotálamo-hipófise-supra-renal foi estudada com o auxílio do RNAi. Esta técnica permitiu silenciar a expressão do CRF no núcleo paraventricular e avaliar a contribuição de outros fatores neuroendócrinos na regulação da resposta secretória do ACTH ao estresse (53). O RNAi tem sido utilizado para inativar seletivamente genes envolvidos em morte celular programada (54-60), permitindo identificar os componentes promotores e inibidores de um processo intimamente relacionado à organogênese, desenvolvimento e envelhecimento do córtex adrenal, bem como avaliar a resposta das células adrenocorticais a variações do estímulo hormonal (61-64). Atualmente, um dos aspectos da fisiologia da esteroidogênese que mais atraem atenção dos pesquisadores é a regulação transcricional das enzimas esteroidogênicas. O uso do RNAi possibilita a avaliação da contribuição de cada um dos fatores de transcrição através da sua remoção seletiva. Com o RNAi, foi demonstrado o papel do NGFI-B na mediação da transcrição, induzida por cAMP, do *CYP17* no córtex adrenal bovino (65). Esta mesma abordagem de "dissecção molecular" foi também instrumental para se estudar o papel do receptor periférico de benzodiazepina na importação do StAR pela mitocôndria (66) e a função de uma nova proteína – SBP (*StAR-binding protein*) (67). Finalmente, a combinação de RNAi

com técnicas de genômica funcional levou à identificação de proteínas novas análogas à proteína StAR, que compõem o sistema de transporte intracelular de colesterol (21). Visto que DAX-1 reprime, por interação proteína-proteína, transcrições ativadas pelo *Steroidogenic Factor 1* (SF-1) e é abundantemente expresso em células adrenais da linhagem NCI-H295A, nosso grupo está atualmente utilizando RNAi para silenciar a expressão de DAX-1 e estudar as conseqüências da remoção deste repressor na transcrição do *CYP17* na adrenal humana.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processos FAPESP 01/12571-5 (à A.S.B) e 00/11362-0 (a C.J.L.).

REFERÊNCIAS

1. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **2003**; 270(8):1628-44.
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**;391(6669):806-11.
3. Baulcombe D. RNA silencing. *Curr Biol* **2002**;12(3):R82-4.
4. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **2001**;15(2):188-200.
5. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**;409(6818):363-6.
6. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **2001**;107(3):309-21.
7. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **2002**;110(5):563-74.
8. Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**;95(26):15502-7.
9. Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **1994**;76(3):567-76.
10. Meite MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* **2000**;19(19):5194-201.
11. Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**;99(3):1443-8. Epub 2002 Jan 29.
12. Svoboda P, Stein P, Schultz RM. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**;287(5):1099-104.
13. Gil J, Esteban M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **2000**;5(2):107-14.
14. Kumar M, Carmichael GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**;62(4):1415-34.
15. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **2002**;3(10):737-47.
16. Baulcombe D. Viruses and gene silencing in plants. *Arch Virol Suppl* **1999**;15:189-201.
17. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **1999**;99(2):123-32.
18. Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **1999**;99(2):133-41.
19. Zamore PD. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* **2002**;296(5571):1265-9.
20. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* **2002**;418(6894):244-51.
21. Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* **2003**;421(6920):268-72.
22. Waterhouse PM, Helliwell CA. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* **2003**; 4(1):29-38.
23. Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet* **2004**;5(5):355-65.
24. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**;99(8):5515-20.
25. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **2002**;26(2):199-213.
26. Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Partridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* **2004**;10(11):3667-77.
27. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* **2003**;63(13):3799-804.

28. Li K, Lin SY, Brunicardi FC, Seu P. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** **2003**;63(13):3593-7.
29. Li LP, Liang NC, Luo CQ. Construction of survivin siRNA expression vector and its regulation on cell cycle and proliferation in MCF-7 cells. **Ai Zhong** **2004**;23(7):742-8.
30. Salvi A, Arici B, de Petro G, Barlati S. Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells. **Mol Cancer Ther** **2004**;3(6):671-8.
31. Futami T, Miyagishi M, Seki M, Taira K. Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. **Nucleic Acids Res Suppl** **2002**;2:251-2.
32. Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. siRNA targeting of the viral E6 onco-gene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. **Oncogene** **2003**;22(38):5938-45.
33. Zangemeister-Wittke U. Antisense to apoptosis inhibitors facilitates chemotherapy and TRAIL-induced death signaling. **Ann NY Acad Sci** **2003**;1002:90-4.
34. Rahman MM, Miyamoto H, Lardy H, Chang C. Inactivation of androgen receptor coregulator ARA55 inhibits androgen receptor activity and agonist effect of antiandrogens in prostate cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** **2003**;100(9):5124-9. Epub 2003 Apr 16.
35. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG, DeWeese TL. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. **Cancer Res** **2003**;63(7):1550-4.
36. Chen J, Wall NR, Kocher K, Duclos N, Fabbro D, Neuberger D, et al. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFbetaR to inhibition with imatinib or rapamycin. **J Clin Invest** **2004**;113(12):1784-91.
37. Yague E, Higgins CF, Raguz S. Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. **Gene Ther** **2004**;11(14):1170-4.
38. July LV, Beraldi E, So A, Fazli L, Evans K, English JC, et al. Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both *in vitro* and *in vivo*. **Mol Cancer Ther** **2004**;3(3):223-32.
39. Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, et al. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. **J Virol** **2003**;77(13):7174-81.
40. Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. **J Virol** **2004**;78(5):2601-5.
41. Liu S, Asparuhova M, Brondani V, Ziekau I, Klimkait T, Schumperli D. Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. **Nucleic Acids Res** **2004**;32(12):3752-9. Print 2004.
42. Buttica C, Ciuffi A, Munoz M, Thomas J, Bridge A, Pebernard S, et al. Protection from HIV-1 infection of primary CD4 T cells by CCR5 silencing is effective for the full spectrum of CCR5 expression. **Antivir Ther** **2003**;8(5):373-7.
43. Anderson J, Banerjee A, Planelles V, Akkina R. Potent suppression of HIV type 1 infection by a short hairpin anti-CXCR4 siRNA. **AIDS Res Hum Retroviruses** **2003**;19(8): 699-706.
44. Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, et al. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. **EMBO Rep** **2003**;4(6):602-8.
45. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci USA** **2003**;100(4):2014-8. Epub 2003 Feb 3.
46. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. **Proc Natl Acad Sci USA** **2003**;100(5):2783-8. Epub 2003 Feb 19.
47. Kronke J, Kittler R, Buchholz F, Windisch MP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Frese M. Alternative approaches for efficient inhibition of hepatitis C virus RNA replication by small interfering RNAs. **J Virol** **2004**;78(7):3436-46.
48. Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. **Proc Natl Acad Sci USA** **2003**;100(1): 235-40. Epub 2002 Dec 23.
49. Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. **Mol Ther** **2003**;8(5):769-76.
50. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. **Nat Med** **2004**;10(8):816-20. Epub 2004 Jul 4.
51. Ding H, Schwarz DS, Keene A, Affar el B, Fenton L, Xia X, et al. Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. **Aging Cell** **2003**;2(4):209-17.
52. Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. **Nucleic Acids Res** **2004**;32(2):661-8. Print 2004.
53. Bhargava A, Dallman MF, Pearce D, Choi S. Long double-stranded RNA-mediated RNA interference as a tool to achieve site-specific silencing of hypothalamic neuropeptides. **Brain Res Brain Res Protoc** **2004**;13(2):115-25.
54. Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. **J Biol Chem** **2004**;279(27): 28367-74. Epub 2004 Apr 21.
55. Yuan CQ, Li YN, Zhang XF. Down-regulation of apoptosis-inducing factor protein by RNA interference inhibits UVA-induced cell death. **Biochem Biophys Res Commun** **2004**;317(4):1108-13.
56. Yu EZ, Li YY, Liu XH, Kagan E, McCarron RM. Antiapoptotic action of hypoxia-inducible factor-1 alpha in human endothelial cells. **Lab Invest** **2004**;84(5):553-61.
57. Guo Y, Cheong N, Zhang Z, De Rose R, Deng Y, Farber

-
- SA, et al. Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. **J Biol Chem** **2004**;279(23):24813-25. Epub 2004 Mar 25.
58. Castro-Obregon S, Rao RV, del Rio G, Chen SF, Poksay KS, Rabizadeh S, et al. Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. **J Biol Chem** **2004**;279(17):17543-53. Epub 2004 Feb 9.
59. Curtin JF, Cotter TG. JNK regulates HIPK3 expression and promotes resistance to Fas-mediated apoptosis in DU 145 prostate carcinoma cells. **J Biol Chem** **2004**;279(17): 17090-100. Epub 2004 Feb 6.
60. Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. **J Biol Chem** **2004**;279(3):2077-84. Epub 2003 Oct 27.
61. Feige JJ, Keramidas M, Chambaz EM. Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. **Horm Metab Res** **1998**;30(6-7):421-5.
62. Wolkersdorfer GW, Bornstein SR. Tissue remodelling in the adrenal gland. **Biochem Pharmacol** **1998**;56(2):163-71.
63. Hornsby PJ. Aging of the human adrenal cortex. **Ageing Res Rev** **2002**;1(2):229-42.
64. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by ACTH in the adrenal cortex. **Endocrinology** **2004**;3:3.
65. Rusten M, Lewis A, Bakke M. NGFI-B is important for induction of SF-1 dependent transcription in response to cAMP. **Xth Conference on the Adrenal Cortex, 2004**. New Orleans, Louisiana.
66. Huet T, Yao Z, Bose H, Wall C, Han H, Hales D, et al. Functional Interaction of PBR and StAR in cholesterol transport and steroidogenesis. **Xth Conference on the Adrenal Cortex, 2004**. New Orleans, Louisiana.
67. Sugawara T. Role of StAR binding protein in steroidogenic cells. **Xth Conference on the adrenal cortex, 2004**. New Orleans, Louisiana.

Endereço para correspondência:

Angela S. Barbosa
Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM-42
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155
Prédio dos Ambulatórios (PAMB) 2° Andar, Bloco 6
05403-900 São Paulo, SP