



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SILAS PINTO DA SILVA

**ESTUDO DA FUNÇÃO DE DICER E MIRNAS NA RESPOSTA
A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS, NO METABOLISMO E NO
ENVELHECIMENTO DE NEMATOIDES *C. ELEGANS***

CAMPINAS

2023

SILAS PINTO DA SILVA

**ESTUDO DA FUNÇÃO DE DICER E MIRNAS NA RESPOSTA
A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS, NO METABOLISMO E NO
ENVELHECIMENTO DE NEMATOIDES *C. ELEGANS***

Tese apresentada à ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do Título
de Doutor em Genética e Biologia Molecular,
Área em Genética Animal e Evolução.

Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO SILAS PINTO DA
SILVA, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO
ALVES DA SILVA MORI

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38e Silva, Silas Pinto da, 1985-
Estudo da função de dicer e miRNAs na resposta a proteínas mal enoveladas, no metabolismo e no envelhecimento em nematoides *C. elegans* / Silas Pinto da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marcelo Alves da Silva Mori.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Envelhecimento. I. Mori, Marcelo Alves, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Study of role of ricer and miRNAs in the response to misfolded proteins, metabolism and aging in *C. elegans* nematodes **Palavras-chave em inglês:** Aging

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular **Banca examinadora:**

Marcelo Alves da Silva Mori [Orientador]

Henrique Marques Barbosa de Souza

Juliane Cruz Campos

Francisco Rafael Martins Laurindo

Murilo Vieira Geraldo

Data de defesa: 11-04-2023

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0894-8915>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3855491599849881>

Campinas, 11/04/2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a). Marcelo Alves da Silva Mori

Prof.(a). Dr.(a) Henrique Marques Barbosa de Souza

Prof.(a) Dr(a). Murilo Vieira Geraldo

Dr(a). Juliane Cruz Campos

Prof.(a) Dr(a). Francisco Rafael Martins Laurindo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa (inserir o nome do programa de pós) da Unidade (inserir o nome da faculdade/instituto).

DEDICATÓRIA

Vindo de uma família simples e que não teve quase nenhuma educação formal, o fato de defender uma tese de doutorado tem um simbolismo que reflete muito do cenário brasileiro de dificuldades na educação. Chegar até este ponto e enxergar no mérito a causa das minhas conquistas seria o caminho mais simples e, provavelmente, o mais aceitável socialmente. Mas é difícil dar crédito ao mérito quando o espaço disponível nas universidades é tão pequeno. É chocante imaginar que se todos os jovens da comunidade onde eu morava decidissem se dedicar a entrar em uma universidade pública na mesma época que eu, e todos magicamente se tornassem tão capacitados que pegassem as vagas de todas as universidades grandes de São Paulo, não haveria vagas suficientes para todos. Na verdade, alguns devem ter tentado, mas não acredito que muitos tenham conseguido. Muitos, talvez, como eu, nem soubessem o que era e como entrar em uma universidade pública até os 17 anos. Muitos podem não ter tido a sorte que eu tive de ter familiares que me receberam por anos em suas casas para que eu pudesse diminuir os gastos. Muitos podem não ter tido a sorte que eu tive de conseguir entrar no curso desejado em pouco tempo e tiveram que desistir pela necessidade de trabalhar e sustentar a família. Enfim, as dificuldades são tantas que o mérito se torna apenas uma das variáveis em um sistema em que oportunidades e dinheiro facilitam enormemente a progressão na vida profissional e acadêmica.

Eu gostaria, então, de dedicar esta tese a todas as pessoas que foram, para mim, estas outras variáveis e me deram a chance concluir esta etapa significativa da minha vida. Primeiramente dedico ao meu núcleo familiar, sem o qual eu não estaria aqui, à minha tia Naildes, que me recebeu durante tantos anos em sua casa, à minha companheira e à Lola (cachorrinha que alegra nossa casa). Dedico também a pessoas que eu nem mesmo conheço, mas que lutaram para que houvesse recursos públicos sendo devolvidos para a sociedade na forma de investimento em formação educacional. Dedico ao meu orientador, pelo suporte todos estes anos e a diversos colegas que, de uma forma ou de outra, foram contribuindo para que este trabalho chegasse no estágio em que se encontra.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também à Universidade Estadual de Campinas e ao Max Planck Institute of Aging por me proporcionarem estrutura para realização do projeto, assim como às agências financiadoras Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo: 2017/04377-2).

RESUMO

Atualmente é imprescindível a busca por intervenções que venham a diminuir os problemas da velhice e os gastos públicos com doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento. Hoje já se sabe que inúmeras vias metabólicas e moleculares estão relacionadas ao controle do tempo de vida e da saúde. Dentre elas, a restrição calórica, os mecanismos de regulação da via da insulina, do estresse oxidativo e proteotóxico são pontos chave neste contexto. Para a manutenção de todos estes processos há sistemas de regulação fina nos mais diversos níveis, transcricional, pós-transcricional e traducional. Os miRNAs são um desses mecanismos de regulação que atuam em diversos contextos e têm papel fundamental para o controle da expressão gênica tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. Neste trabalho mostramos a importância de Dicer, uma das enzimas responsáveis pelo processamento de miRNAs, para o controle do tempo de vida em nematoides *C. elegans*. Os dados mostram que o silenciamento de Dicer leva à diminuição do tempo de vida de vermes selvagens, causa estresse oxidativo e inibe os efeitos benéficos de mutações ou intervenções que dependem da função mitocondrial para estender o tempo de vida. Adicionalmente, a Resposta a Proteínas Mal Enoveladas do Retículo Endoplasmático é afetada pela diminuição do processamento de miRNAs. A ausência de um destes miRNAs, o miR-230-3p, leva ao aumento da expressão de *pdi-2*, fenômeno que é parcialmente responsável pela diminuição do tempo de vida em vermes no contexto de silenciamento de Dicer.

ABSTRACT

It is currently mandatory the search for interventions that can reduce aging-related problems and public spending on chronic diseases related to aging. It is already known that numerous metabolic and molecular pathways are related to the control of lifespan and health. Among them, caloric restriction, insulin pathway regulation mechanisms and oxidative and proteotoxic stress are key points in this context. For the maintenance of all these processes there are fine regulatory systems taking place at multiple levels, such as transcriptional, post-transcriptional and translational. miRNAs are one of those regulatory mechanisms that act in different contexts and play a fundamental role in controlling gene expression in both physiological and pathological situations. In this work we show the importance of Dicer, one of the enzymes responsible for miRNA processing, for the control of lifespan in *C. elegans* nematodes. The data show that Dicer silencing leads to decreased lifespan of wildtype worms, causes oxidative stress, and inhibits the beneficial effects of mutations or interventions that rely on mitochondrial function to extend lifespan. Additionally, the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response is affected by the absence of miRNA processing. The absence of one of these miRNAs, miR-230-3p, leads to increased expression of *pdi2*, a phenomenon that is partially responsible for the decrease in lifespan in worms in the context of Dicer silencing.

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica.....	3
Folha de Aprovação.....	4
Dedicatória.....	5
Agradecimentos.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Sumário.....	9
1.Introdução	11
1.1.Envelhecimento e sociedade	11
1.2. <i>Free Radical Theory of Aging</i>	11
1.3.Intervenções que afetam o processo de envelhecimento.....	12
1.4. A regulação do tempo de vida	13
1.5.Resposta ao estresse ativada por proteínas mal enoveladas	15
1.6.Proteínas Dissulfeto Isomerasas	17
1.7.Regulação da Via de UPR ^{er}	18
1.8.MiRNAs e suas funções na regulação do tempo de vida e da via UPR ^{er}	19
1.9.A complexidade do processo de envelhecimento	21
1.10.Dados Prévios	22
2.Objetivo	25
3.Materiais e Métodos	26
3.1.Sincronia de vermes	26
3.2.RNA de interferência	26
3.3.Determinação do tempo de vida	27
3.4.Expressão de GFP	27
3.5.Mobilidade	28
3.6.Bombeamento da faringe	28
3.7.Análise de sequenciamento de RNAs pequenos	28
3.8.Análise transcriptômica	29
3.9.Expressão gênica através de PCR quantitativo	29
3.10.Clonagem de oligonucleotídeos ao vetor pmir-Report	30
3.11.Verificação de regulação da 3'UTR de <i>pdi-2</i> pelo miR-230-3p	30
3.12.Análise estatística	31

4.Resultados	32
6.Discussão	50
7.Conclusão	55
8.Referências.....	57
Anexo1.....	65
Anexo2.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento e sociedade

Segundo o último relatório da Organização Mundial da Saúde - ONU - a expectativa de vida global ao nascer aumentou de 66,8 anos, no ano 2000, para 73,3 em 2019. De acordo com este relatório, grande parte desta conquista se deve a aplicação de medidas sociais contra doenças em países em desenvolvimento¹. Curiosamente, esta tendência mundial que foi recebida como um sinal de sucesso, acende também um alerta para problemas que devem aparecer com cada vez mais força nas próximas décadas. Isso porque, com o aumento do tempo de vida da população, a tendência é que doenças relacionadas ao envelhecimento venham a ter uma prevalência cada vez maior, diminuindo a qualidade de vida na velhice. Esta não é uma preocupação que aparece apenas neste relatório da ONU, pois relatórios anteriores já destacavam medidas que deveriam ser tomadas e habilidades que deveriam ser prioritárias, não só para minorar o efeito destas doenças, mas para retardar o envelhecimento em si². Dentre estas prioridades está a pesquisa biomédica focada na busca por intervenções capazes de tratar e prevenir tais doenças, garantindo mais conforto e saúde na velhice².

1.2. *Free Radical Theory of Aging*

Diferente do que talvez possa parecer, esta não é uma tarefa fácil. O envelhecimento é um fenômeno de difícil caracterização e que pode ser influenciado por uma gama de processos moleculares, metabólicos e até mesmo sociais, que o tornam único e complexo. Não diferente de muitos conceitos na ciência, o que chamamos hoje “envelhecimento” é um acumulado de conhecimento que vem sendo aperfeiçoado há mais de 100 anos e que já passou por várias reformulações.

Ainda no final do século XIX começaram a surgir as primeiras ideias das causas do envelhecimento e de como ele seria regulado. Uma frase de autoria desconhecida que começou a circular nesta época mostra bem como eram estas ideias: “*The candle that burns twice as bright burns half as long*”. A ideia de uma vela que queima mais rapidamente quanto mais forte é a sua chama estabelecia a relação entre a taxa metabólica de um determinado organismo e o tempo de vida dele. O fisiologista alemão

Max Rubner formulou o que hoje podemos dizer ser o embrião deste conceito, mas estas ideias começaram a ganhar força alguns anos depois com a famosa publicação de Raymond Pearl, "*The Rate of Living*"³. Em resumo, a ideia era que a taxa metabólica determinaria o tempo de vida de cada organismo. Não havia naquela época provas contundentes para tal afirmação, sendo esta hipótese baseada na observação e comparação do tempo de vida entre diferentes organismos. No entanto, anos mais tarde, os avanços em relação a medição e aos efeitos da radiação e das espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla do inglês para *reactive oxygen species*) nos tecidos biológicos deram maior sustentação para a ideia que estava se desenvolvendo. Em 1956, o médico Denham Harman reuniu uma compilação de dados numa famosa publicação intitulada "*Aging: A Theory Based on Free Radicals and Radiation Chemistry*", onde ele especula que tanto doenças quanto o envelhecimento em si são causados pelos efeitos dos radicais livres aos componentes celulares⁴. A partir deste ponto as mitocôndrias começam a tomar uma posição de destaque, pois já era conhecido o papel central destas organelas no metabolismo energético e na produção de espécies reativas de oxigênio⁵. Esta grande quantidade de informação vinda de múltiplas áreas do conhecimento, como física, química, bioquímica e biologia, acabou por se firmar como a mais famosa teoria para explicar o envelhecimento, a chamada "*free radical theory of aging*". Como veremos adiante, apesar desta teoria ser capaz de explicar com certa precisão alguns fenômenos relacionados ao envelhecimento, dados mais recentes demonstram a grande complexidade e a multifatorialidade deste processo.

1.3. Intervenções que afetam o processo de envelhecimento

Algumas das implicações importantes das ideias mencionadas anteriormente são, primeiro, que o envelhecimento seria causado por eventos claros e específicos e, segundo, que este processo seria pré-determinado pela taxa metabólica. Não coincidentemente, por muitas décadas o envelhecimento foi considerado um fenômeno entrópico irreversível. No entanto, a partir do final da década de 1980, novos dados foram extenuando as bases que se desenvolveram fortemente desde Raymond Pearl⁶. Dois estudos foram particularmente importantes para iniciar esta escalada na mudança de paradigma. Foi descoberto que mutações em genes que controlam a função do receptor de insulina/IGF-1 em nematoides *C. elegans* são capazes de aumentar

significativamente o tempo de vida deste organismo em quase duas vezes o tempo normal^{7,8}. Estes dados não excluía, obviamente, as ideias anteriores, mas mostravam claramente que o tempo de vida de um organismo poderia ser alterado por intervenções genéticas e que organismos de uma mesma espécie poderiam ter tempos de vida consideravelmente diferentes. Curiosamente este não seria o único tipo de intervenção capaz de alterar o tempo de vida, pois pesquisas subsequentes mostraram que **alterações nutricionais, alteração da função mitocondrial** e de vias que controlam a **resistência ao estresse** também promovem efeito semelhante^{9,10,11}. Como veremos a seguir, as décadas seguintes foram fundamentais para mostrar a complexidade do processo de envelhecimento e dos sistemas biológicos que controlam o tempo de vida.

1.4. A regulação do tempo de vida

Um dos grandes problemas em se estudar o envelhecimento está na dificuldade de encontrar marcadores que descrevam objetivamente alterações neste processo. Um dos *readouts* comumente utilizados em alguns modelos biológicos é a avaliação do tempo de vida como maneira de inferir se uma determinada intervenção afeta positivamente ou negativamente a taxa de envelhecimento de um organismo. Como mencionado anteriormente, alterações na via de insulina/IGF-1, por exemplo, podem alterar o tempo de vida de vermes⁷. Curiosamente, foi demonstrado que este efeito é conservado em moscas, mamíferos e há ainda correlação entre polimorfismos que levam a perda parcial da função deste receptor e a longevidade em grupos de humanos supercentenários¹²⁻¹⁵.

Intervenções dietéticas também foram mostradas terem papel semelhante na regulação do tempo de vida em diversas espécies^{9,10}. Em nematoides, por exemplo, há diferentes protocolos de restrição alimentar capazes de estender o tempo de vida¹⁶ e, de maneira semelhante ao que ocorre na regulação da sinalização de insulina, alterações na ingestão alimentar também podem promover aumento do tempo de vida em diversas espécies, desde leveduras até primatas não humanos¹⁰.

No entanto, apesar de regular o tempo de vida, estes dois tipos de intervenções (restrição dietética e alterações na via da insulina) agem por vias distintas. Enquanto mutações no receptor de insulina ativam um fator de transcrição chamado DAF-16, a mutação no gene *eat-2* (modelo genético de restrição calórica) depende de

skn-1 (gene ortólogo de Nrf-2, em humanos)¹⁶. Curiosamente, tanto *daf-16* quanto *skn1*, são fatores de transcrição responsáveis por controlar a expressão de genes que garantem resistência ao estresse^{16,17}. Some-se a isto o fato de que nem todas as intervenções do mesmo tipo agem da mesma maneira. O aumento do tempo de vida promovido pela restrição calórica causada pela diluição de bactéria, que serve de alimento para nematoides em meio semissólido, depende da ativação da Proteína Quinase Ativada por AMP (AMPK), mas não necessita de *skn-1*¹⁶⁻¹⁸. De modo contrário, o aumento do tempo de vida mediado pela mutação em *eat-2* independe de AMPK¹⁷.

Curiosamente, o que parecia adormecido, devido à esta nova leva de informações sobre a regulação do tempo de vida, começou a ganhar força novamente. Até o final dos anos 1980 e até mesmo na década de 1990, a mitocôndria era vista muito mais como vilã do que como heroína no processo de envelhecimento. Porém, paulatinamente, este quadro foi se alterando. Ao longo dos anos, diversas alterações mitocondriais foram demonstradas afetarem o tempo de vida em diferentes espécies¹⁹ e, particularmente, estudos em nematoides *C. elegans* trouxeram uma quantidade significativa de informações que compõem o que sabemos até hoje sobre o assunto. Foi demonstrado, por exemplo, que aproximadamente 15% dos genes que controlam a longevidade neste modelo experimental, têm funções mitocondriais²⁰. Na mesma época apareceram os primeiros indícios de que mutações em componentes dos complexos mitocondriais promovem aumento do tempo de vida²¹⁻²³. Vermes mutantes para os genes *nuo-6* e *isp-1*, por exemplo, importantes componentes carreadores de elétrons nos complexos mitocondriais I e III, respectivamente, têm diminuição da taxa respiratória e aumento no tempo de vida de aproximadamente 50%²⁴. Da mesma forma, o tratamento com Metformina, um antidiabético clássico, também aumenta o tempo de vida de nematoides através da inibição do Complexo I da Cadeia Respiratória Mitocondrial, com efeitos semelhantes também em mamíferos^{25,26}. O tratamento com 2-deoxi-D-glicose, que inibe a glicólise e causa, ao contrário, aumento da taxa respiratória, também aumenta o tempo de vida²⁷. Porém, diferentemente do que havia sido pensado por muitas décadas, nestes e em muitos outros casos semelhantes, a correlação entre aumento do tempo de vida e a produção de espécies reativas de oxigênio é positiva. Ou seja, há aumento na produção de ROS e não diminuição.

Foi ficando cada vez mais claro que, ao menos parcialmente, os mecanismos que controlam estes efeitos no tempo de vida de maneira dependente da função mitocondrial estão associados ao controle fino do balanço redox. Observações em várias espécies deixam claro que um aumento moderado dos níveis de ROS pode ser benéfico¹⁹. Por exemplo, como citado anteriormente, vermes mutantes para componentes da cadeia respiratória *isp-1* e *nuo-6* apresentam aumento do nível de ânion superóxido e são longevos²⁸. Este aumento no tempo de vida é bloqueado quando os vermes são tratados com os antioxidantes N-acetil-cisteína (NAC) ou vitamina C^{24,29}. De maneira semelhante, o aumento do tempo de vida promovido pelo tratamento com 2-deoxi-D-glicose, que promove inibição da glicólise, é também bloqueado por estes antioxidantes²⁷. Outro fato interessante é que o tratamento com o pró-oxidante Paraquat tem efeitos semelhantes, no que diz respeito ao aumento do tempo de vida em nematoides³⁰. Porém, estes efeitos são observados apenas em concentrações baixas de Paraquat, sendo que um aumento de 0,2mM para 0,5mM do composto, faz com que o efeito na extensão do tempo de vida desapareça³¹. Outro aumento para 1mM leva ao efeito oposto, diminuindo o tempo de vida³¹. Estes dados nos sugerem ao menos dois pontos importantes: primeiro, que não se pode concluir peremptoriamente que espécies reativas de oxigênio têm apenas efeitos negativos nos organismos no que se refere ao tempo de vida; segundo, que aparentemente o que diferencia o efeito deletério ou benéfico de ROS é a quantidade em que elas se apresentam no contexto celular. Corroborando estes dados em nematoides, há também dados semelhantes em humanos mostrando que efeitos benéficos promovidos pelo exercício podem ser bloqueados pelo uso de antioxidantes³², assim como em outros estudos foi-se incapaz de demonstrar associação positiva entre o uso de antioxidantes e efeitos benéficos à saúde e até mesmo que o uso crônico de antioxidantes pode ter efeito contrário, causando certos tipos de doenças^{33,34}.

1.5. Resposta ao estresse ativada por proteínas mal enoveladas

Com o passar do tempo e com o acúmulo de dados a respeito destes mecanismos, ficou mais clara a ideia de que o ponto central é como o organismo consegue se proteger de diferentes estresses³⁵. Um componente destes mecanismos de regulação está relacionado com a capacidade do organismo em responder ao

estresse celular via ativação das *unfolded protein responses (UPRs)*. A proteostase, como é chamado o processo de homeostase proteica, é essencial para a manutenção da vida, reprodução e crescimento, pois permite ao organismo responder de maneira adaptativa a muitos tipos de estresse³⁶. As UPRs são sistemas de proteção celular contra danos que culminam na perda de enovelamento proteico. Estes sistemas podem ser encontrados no citoplasma, nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático³⁷, e a resposta antiestresse coordenada por eles depende do envolvimento do núcleo das células. Ou seja, recebida a informação de alteração no enovelamento de proteínas, sinais são enviados ao núcleo, que começa a transcrever genes responsáveis por resolver os mais diferentes tipos de estresse³⁸.

Alterações em proteínas ribossomais mitocondriais (MPRs), por exemplo, causam problemas metabólicos que levam à ativação da via de UPR mitocondrial (UPR^{mit}, o que pode ser verificado pela ativação da chaperona mitocondrial HSP-6), à diminuição da respiração e ao aumento do tempo de vida em nematoides³⁸. No entanto, estes fenômenos são parcialmente revertidos quando a comunicação mitocôndria/núcleo é prejudicada pela deleção do gene *ubl-5*³⁸. Curiosamente, tanto as mutações em *isp-1* e *nuo-6* quanto o tratamento com paraquat, citados anteriormente, também ativam a UPR^{mit}³⁹. A deleção de *ubl-5* também bloqueia o aumento no tempo de vida observado no mutante *isp-1*³⁹, sugerindo que estas intervenções agem de maneira semelhante. Some-se a isto o fato de que estas mutações mitocondriais aumentam o tempo de vida de maneira dependente de demetilases de histonas, como JMJD-1.2 e JMJD-3.1, mostrando novamente a importância da transcrição gênica e da comunicação com o núcleo na resposta ao estresse causado por mutações mitocondriais⁴⁰. De maneira semelhante ao que acontece com estes mutantes mitocondriais, a superexpressão das demetilases JMJD-1.2 e JMJD-3.1, por si, já eleva a expressão da chaperona mitocondrial HSP-6 e proporciona aumento no tempo de vida. Estes efeitos também são bloqueados quando o gene *ubl-5* é deletado⁴⁰.

É interessante notar que muitos destes fenômenos que conectam a UPR^{mit} ao envelhecimento e ao controle do tempo de vida também podem ser estendidos para UPR do retículo endoplasmático (UPR^{re}). Esta UPR, similarmente à anterior, é ativada em situações de estresse, mas nesse caso, aquelas situações que abalam a proteostase do retículo endoplasmático⁴¹. Esta via pode ser ativada por três

mecanismos de sinalização diferentes, todos eles por um componente localizado na membrana do retículo, sendo eles inositol-requiring enzyme-1 (IRE-1), PKR-like ER kinase (PERK) ou activating transcription factor 6 (ATF6)³⁷. A cascata de sinalização varia para cada um destes componentes mas o mecanismo é o mesmo: após a ativação da via pela presença de proteínas mal enoveladas inicia-se a transcrição de genes antiestresse que podem defender a célula do agravo que afetou a homeostase do retículo endoplasmático⁴². No caso da sinalização via PERK, o fator de transcrição ATF4 é recrutado; a ativação via IRE-1 leva ao recrutamento de XBP-1; e o terceiro componente, ATF6, é o próprio fator de transcrição que, quando ativado, é clivado e se movimenta para o núcleo da célula, onde participa da transcrição gênica⁴³. Curiosamente, com o envelhecimento estas proteínas vão acumulando danos e diminuindo em expressão, o que leva a perda gradual do controle da proteostase do retículo endoplasmático⁴⁴. De maneira semelhante ao que acontece com a UPR^{mit}, a UPR^{re} é parte fundamental dos efeitos de intervenções que levam ao aumento no tempo de vida, como a mutação no receptor de insulina/IGF-1 e a restrição calórica^{45,46}. Alterações na própria via, como por exemplo a superexpressão de XBP-1 ou a hiperativação da via de PERK, também levam ao aumento do tempo de vida em vermes ou à neuro-proteção em camundongos⁴⁷⁻⁴⁹. Sendo assim, não é surpreendente que muitas doenças relacionadas ao envelhecimento tenham ligação com a agregação proteica e alterações no sistema de controle de qualidade da via de UPR^{er}⁵⁰. Dentre as mais variadas doenças com estas características estão Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's e muitas outras que afetam o sistema motor^{51,52}.

1.6. Proteínas Dissulfeto Isomerases

Independentemente do tipo de estresse que leva desregulação da homeostase proteica, a UPR^{er} age de maneira a evitar antecipadamente a agregação ou desfazer a agregação já existente. Este sistema de proteção celular é composto por múltiplos coadjuvantes, como *heat shock proteins* (HSPs, também chamadas BiPs), proteínas dissulfeto isomerases (PDIs), dentre outras, que ajudam no dobramento das proteínas mal enoveladas, diminuindo o estresse celular³⁷. Dentre estes variados coadjuvantes, é pertinente destacar o papel fundamental de PDIs no controle de qualidade proteico celular acoplado ao controle do balanço redox. Esta classe de proteínas foi descoberta

há mais de 50 anos, se apresenta em grande quantidade no retículo endoplasmático e hoje já abrange mais de 20 tipos descritos em humanos⁵³. A formação de ligações dissulfeto é parte central da biogênese de pelo menos um terço da proteínas humanas⁵⁴ e as PDIs são enzimas multifuncionais capazes de catalisar a formação e a quebra destas ligações, além de fazerem o rearranjo de ligações não nativas em uma infinidade de proteínas^{53,55}. Além destas funções clássicas, elas também participam da formação de colágeno e da regulação de NADPH oxidase^{56,57}.

Estas enzimas são muito peculiares por terem função tanto de oxirredutases quanto de chaperonas^{54,55,58}. Elas são compostas por 5 domínios em sequência, sendo eles **a**, **b**, **b'**, **a'** e **c**⁵⁸. Os quatro primeiros são domínios homólogos à tioredoxina, estando **a** e **a'** ativos e **b** e **b'** inativos⁵⁸. Os sítios ativos têm funções catalíticas independentes e apresentam os *motifs* CXXC, ou seja, duas cisteínas ligadas a outros dois aminoácidos internos variáveis^{58,59}. O domínio **c** é onde se liga a sequência KDEL, que mantém estas enzimas localizadas no retículo endoplasmático⁶⁰. Durante o processo de catálise os sítios ativos variam entre a forma tiol e a forma dissulfeto, oxidando ou reduzindo os grupos tiol de proteínas mal enoveladas, fazendo com elas retornem a forma nativa⁵⁸. Curiosamente, as PDIs têm também função isomerase, quando o processo de enovelamento é realizado sem a necessidade de alteração do estado redox inicial e final tanto de PDI quanto da proteína no processo de remodelamento^{58,59}. Em nematoides *C. elegans* há apenas 3 isoformas desta enzima, PDI-1, PDI-2 e PDI-3⁶⁰. A estrutura delas é quase idêntica à proteína humana, contendo os mesmos domínios e funções, com variação de poucos aminoácidos⁶⁰. Enquanto PDI1 e PDI-3 são dispensáveis para o desenvolvimento dos vermes, o mutante para PDI-2 é inviável, sendo necessário mantê-lo em heterozigose⁶⁰. Em nematoides, assim como em outros organismos, PDI é também uma subunidade da Prolil 4-Hydroxilase, tendo função central na formação de colágeno e sendo essencial para a formação da matriz extracelular e para a manutenção da estrutura corporal^{61,62}.

1.7. Regulação da Via de UPR^{ER}

Considerando a complexidade e a importância do controle da homeostase proteica, as células têm mecanismos finos de regulação de seus componentes para mantê-los em adequado funcionamento e, além disso, controlar o nível de ativação

necessária para cada tipo de estresse. IRE-1, por exemplo, é um receptor transmembrana que fica ligado às chaperonas GRP78, citadas anteriormente como BiPs. Sentida a presença de proteínas mal enoveladas, a chaperona se desliga, IRE-1 se dimeriza e em seguida é fosforilado, dando prosseguimento à cascata de sinalização⁶³. Tanto IRE-1 quanto ATF6 sofrem regulação por PDIs, seja por modificação das pontes dissulfeto, seja pela redução de cisteínas em resíduos específicas destas enzimas^{64,65}. PERK é regulada de maneira muito semelhante às enzimas anteriores, tanto no que diz respeito à ligação com BiPs quanto ao controle por PDIA6⁶⁶. IRE-1 pode ser ainda fosforilada de maneira independente pela proteína quinase A (PKA) ou ter sua atividade reduzida por modificações redox^{67,68}.

Curiosamente, apesar da grande quantidade descrita de mecanismos de regulação em muitos pontos da via de UPR^{er}, grande parte dos dados diz respeito à regulação pós-traducional. No entanto, ajustes também no nível transcricional ou traducional parecem ter grande impacto neste mecanismo de controle. Já se sabe, por exemplo, que alguns dos genes envolvidos na resposta ao estresse podem ser degradados através de *nonsense-mediated decay* (NMD), diminuindo a sinalização de UPR^{er}⁶⁹. Em condições basais a NMD reprime UPR^{er}, mas em situações de estresse, a fosforilação de eIF2 α , componente da cascata de sinalização de PERK, inibe a NMD, permitindo maior ativação de UPR^{er}⁷⁰. Além disso, a NMD também tem como alvo outros genes da via de UPR, como CHOP e ATF4⁷¹. Mais recentemente apareceram também envolvidos neste contexto um grupo de reguladores pós-transcricionais dos mais importantes nos organismos, os microRNAs (miRNAs).

1.8. MiRNAs e suas funções na regulação do tempo de vida e da via UPR^{ER}

MiRNAs são RNAs não-codificantes transcritos no núcleo por uma RNA polimerase do tipo II na forma de microRNAs primários (pri-miRNAs)⁷². Esses pri-miRNAs são processados em precursores de miRNAs (pre-miRNAs), que tem aproximadamente 60-70 nucleotídeos⁷³, apresentam forma de grampo e são transportados para o citoplasma pela Exportina-5 (XPO-1 em *C. elegans*)^{74,75}. No citoplasma essas moléculas são processadas por uma RNase tipo III, chamada Dicer

(também chamada de DCR-1 em *C. elegans*), tornando-se miRNAs com 20-22 nucleotídeos que têm, efetivamente, função de silenciamento gênico⁷⁶. Estas moléculas maduras reconhecem sequências complementares na região 3'-não traduzida de RNAs mensageiros (3'UTR) e induzem desestabilização ou inibição da tradução dos seus alvos⁷⁷. Portanto, cada miRNA pode promover o ajuste fino da expressão de dezenas ou até mesmo centenas de RNAs mensageiros, sendo, nesse caso, um dos principais mecanismos de regulação da expressão gênica nos organismos⁷³.

Apesar de Dicer também ser responsável pelo processamento de diversos RNAs pequenos^{78,79}, a via de processamento de miRNAs está evolutivamente associada a regulação do tempo de vida e ao metabolismo em diversas espécies, incluindo humanos^{73,80}. Alterações em miRNAs importantes no desenvolvimento larval do nematoide *C. elegans*, como *lin-4* ou membros da família de *let-7*, determinam o tempo de vida do verme^{81,82}. A redução da expressão de *lin-4* leva à diminuição do tempo de vida e a um acelerado processo de envelhecimento tecidual⁸². De modo contrário, a superexpressão de *lin-4* ou a redução da atividade do seu alvo principal, o fator de transcrição LIN-14, promovem aumento do tempo de vida dos vermes, mostrando o fator causal dos miRNAs nestes fenômenos⁸². *Lin-4* e *let-7* foram os primeiros miRNAs descritos^{83,84}, porém hoje se sabe que eles fazem parte de uma classe numerosa de RNAs não-codificantes presentes nos mais diversos metazoários e plantas, e que desempenham funções no desenvolvimento, na manutenção da identidade e integridade celulares, na fisiopatologia de inúmeras doenças e no envelhecimento^{85,78}. Em vermes e no tecido adiposo de camundongos a expressão global de miRNAs está diminuída com o envelhecimento⁸⁰. Também durante o envelhecimento há diminuição da expressão de Dicer, uma das principais enzimas responsáveis pelo processamento de miRNAs⁸⁰. Curiosamente, mutações que levam à perda da função de Dicer causam redução no tempo de vida e na resposta aos estresses oxidativo e térmico em *C. elegans*⁸⁰. Por outro lado, a superexpressão de Dicer no intestino destes vermes promove aumento da sobrevivência e resistência a estes tipos de estresse⁸⁰. Em camundongos, o nocauteamento de Dicer em adipócitos leva ao risco prematuro de morte e inibe parte dos efeitos benéficos da restrição calórica, como o aumento da sensibilidade à insulina⁸⁶.

Considerando seu mecanismo de ação, não é surpreendente que miRNAs estejam envolvidos na regulação da expressão gênica nas mais variadas vias metabólicas e interajam com alvos em muitos tipos de doenças. Há, por exemplo, mais de uma dezena de miRNAs envolvidos na regulação de genes relacionados à supressão ou desenvolvimento tumoral⁸⁷. *MiR-34* e *let-7*, por exemplo, tem como alvos BCL-2 e BCLXL, respectivamente^{88,89}, e o miR-146b-5p regula SMAD4 em câncer de tireoide⁹⁰. Adicionalmente, *let-7* atua ainda na regulação do receptor de insulina/IGF1⁹¹. O *miR122* é um dos grandes responsáveis pela regulação da expressão de genes que controlam a síntese de colesterol⁹². Estes são apenas alguns exemplos deste tipo de interação que aparece em diversos contextos, como metabolismo de ácidos graxos⁹³, controle do balanço redox⁹⁴, metabolismo⁹⁵, dentre muitos outros, incluindo o controle da proteostase pelas UPRs⁸⁷. Um grande *hub* na sinalização tanto da UPR^{mit} quanto da UPR^{er}, *Xbp-1*, é alvejada pelo *miR-30c*⁹⁶. Genes que codificam para as BiPs, fundamentais na resposta ao estresse mitocondrial e de retículo endoplasmático, também são alvo de múltiplos miRNAs, como o *miR-122*, *miR-181* e *miR-199b*⁹⁷⁻⁹⁹. Ainda participam da regulação da resposta ao estresse os miRNAs *miR-221* e *miR-204*, atuando em outros pontos da cascata. Porém, apesar da ampla atuação deste tipo de silenciamento na via, não há descrição de regulação, por miRNAs, de genes que codificam para as PDIs, fato curioso dada a grande importância destas proteínas.

1.9. A complexidade do processo de envelhecimento

De maneira geral, esse conjunto de dados indicam que, como Denham Harman já havia inferido na década de 1980, a mitocôndria tem sim papel fundamental no controle do tempo de vida e as espécies reativas de oxigênio são agentes centrais nesta regulação. Porém, o processo de envelhecimento em si, sua gênese, controle e seu impacto no tempo de vida dos organismos é muito mais complexo e tem participação de diferentes mecanismos. Estes mecanismos dependem da atuação em conjunto de diferentes agentes em níveis celular e tecidual, da comunicação de componentes celulares em compartimentos diferentes, da capacidade da célula em perceber e responder aos sinais de estresse e, ainda mais importante, de controlar o nível da resposta de maneira adaptativa, trazendo especificidade à cada tipo de demanda.

Neste trabalho, buscamos explorar este complexo sistema e entender como alterações na via de processamento de miRNAs afetam o tempo de vida de nematoides *C. elegans*, quais os principais componentes da resposta ao estresse afetados na ausência de Dicer e seus efeitos fisiológicos.

1.10. Dados Prévios

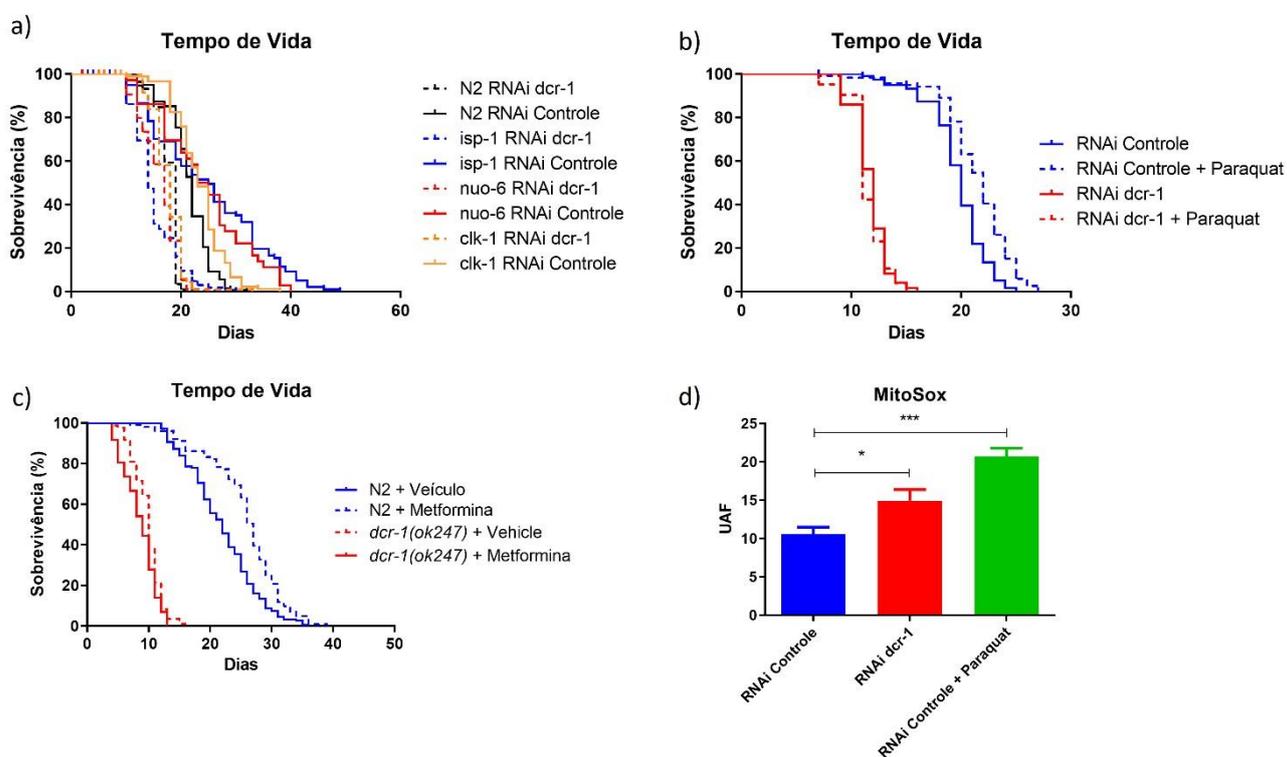


Figura 1 – O envolvimento de Dicer na longevidade induzida por estresse oxidativo. (a) Tempo de vida de vermes N2, *isp1(qm150)*, *nuo-6(qm200)* e *clk-1(e2519)* tratados com *dcr-1* RNAi e RNAi Controle. N2 RNAi *dcr-1* n=204, N2 RNAi controle n=242, *isp-1(qm150)* RNAi *dcr-1* n=167, *isp-1(qm150)* RNAi controle n=97, *nuo-6(qm200)* RNAi *dcr-1* n=96, *nuo-6(qm200)* RNAi controle n=36, *clk-1(e2519)* RNAi controle n=117 e *clk-1(e2519)* RNAi *dcr-1* n=91. (b) Tempo de vida de vermes N2 tratados com RNAi contra *dcr-1* e RNAi controle na presença ou ausência de paraquat 50ug/mL. RNAi controle n=119, RNAi controle + Paraquat n=119, RNAi *dcr-1* n=121, RNAi *dcr-1* + Paraquat n=104. (c) Tempo de vida de vermes N2 e mutantes *dcr-1(ok247)* em resposta a metformina 50mM ou veículo. N2 + Veículo, n = 149, N2 + Metformina n = 101, *dcr-1(ok247)* + Veículo n = 84 and *dcr-1(ok247)* n = 72. Os dados foram analisados com teste Log-rank. Análise e gráfico feitos em Graphpad Prisma 5. (d) Quantificação de íon superóxido por MitoSox (Thermo Fisher Scientific). Duplicata de experimentos. RNAi Controle n=100 e RNAi Dicer n=100 por experimento. 4mM de paraquat. Medida de fluorescência feita em Cytation5 Image Reader (BioTek Instruments). Os dados são Média ± EPM e as comparações foram feitas utilizando teste one-way ANOVA. Análise e gráfico feitos em Graphpad Prisma 5. * = P<0,05 e *** = P<0,01. **Fonte: Dissertação de Mestrado de Silas Pinto da Silva.**

No início do trabalho que gerou esta tese, tínhamos dados que nos indicavam superficialmente como Dicer, e talvez miRNAs ou outros RNAs não codificantes, afetam o tempo de vida em nematoides *C. elegans*. Em uma tentativa inicial de observar os

efeitos metabólicos da ausência de Dicer neste modelo experimental, observamos que a respiração dos vermes estava diminuída quando havia silenciamento de Dicer. Estes dados acabaram por não serem reproduzíveis posteriormente, mas nos abriram caminho para uma série de perguntas que tentamos responder com os experimentos mostrados na Figura 1 (estes dados podem ser checados em maiores detalhes na minha dissertação de mestrado). Como mencionado anteriormente, diversas intervenções que alteram a função mitocondrial e causam um aumento nos níveis de ROS levam a alterações respiratórias e ao aumento do tempo de vida. Sabíamos também, com dados do nosso grupo, que no contexto de silenciamento ou mutação de perda de função em Dicer, há efeito de diminuição na longevidade dos vermes¹⁰⁰.

Nossa primeira pergunta, a partir destes dados, foi se vermes mutantes longevos com alterações na função mitocondrial seriam capazes de reverter estes efeitos negativos causados pelo silenciamento de Dicer. Como pode ser visto na Figura 1a, há um efeito pronunciado na diminuição do tempo de vida causado pelo silenciamento de Dicer em vermes selvagens (comparar linhas preta cheia e preta pontilhada, $p < 0,001$). Curiosamente, as alterações mitocondriais não são capazes de elevar o tempo de vida na ausência de Dicer (comparar linhas coloridas cheias com suas respectivas linhas tracejadas), sugerindo que estas intervenções têm seus efeitos, de alguma forma, ligados à função de desta enzima. O mesmo quadro é observado quando utilizamos dois outros tratamentos que têm, em resumo, o mesmo efeito das alterações mitocondriais, sugerindo que este não é um fenômeno meramente ligado às mutações citadas anteriormente, mas uma interação que parece comum entre a função de Dicer e estes tipos semelhantes de intervenções que afetam a função mitocondrial e o tempo de vida (Figuras 1b e 1c). Como mencionado, o controle do balanço redox é extremamente importante para o efeito destas intervenções, e por este motivo hipotetizamos que o silenciamento de Dicer causaria alteração na produção de espécies reativas de oxigênio, o que poderia ser uma das causas dos efeitos prejudiciais observados anteriormente. Isto levaria ao efeito deletério visto nos vermes selvagens e impediria que as intervenções testadas revertissem este efeito, pois elas também aumentam ROS, o que causaria acúmulo destas espécies reativas em níveis tóxicos para o organismo. Corroborando nossa hipótese, observamos que o silenciamento de Dicer causa aumento na produção de ânion superóxido de maneira semelhante ao que

acontece com altas concentrações de Paraquat (Figura 1d). Estes dados nos levaram aos questionamentos, hipóteses e aos experimentos que serão apresentadas em seguida.

2. OBJETIVO

Avaliar a função de Dicer e de miRNAs para a regulação do tempo de vida e do controle ao estresse em nematoides *C. elegans*.

3. MATERIAS E MÉTODOS

Para os experimentos foram utilizados nematoides *C. elegans* obtidos do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC). As linhagens utilizadas nos experimentos foram mantidas em incubadoras a 15 °C ou 20°C, de acordo com a necessidade do verme, em placas de Petri com meio *Nematode Growth Media* semissólido (NGM) contendo uma camada de bactéria *E. coli* OP50-1 [exceto nos experimentos envolvendo RNAi em que a bactéria HT115(DE3) foi usada] suplementada com 100 µg/mL de estreptomicina, de acordo com Brenner S., 1974

(http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html).

3.1 Sincronia de vermes

O protocolo de sincronia de vermes por hipoclorito de sódio foi feito conforme descrito no Wormbook

(http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html).

Hermafroditas grávidas foram lavadas das placas de NGM com água estéril e transferidas para tubos Falcon de 15mL. Foram acrescentados 0,5mL de NaOH 5M e 1mL de solução 5% de hipoclorito de sódio, completando o volume com água estéril para 5mL. A homogeneização em vórtex por aproximadamente 10 min fez com que os vermes fossem dissolvidos e os ovos restantes foram lavados com 15mL de água estéril e pipetados em placas de NGM com comida. Como apenas os ovos resistem ao tratamento e todos eclodem depois de algumas horas do plaqueamento, a cultura é considerada sincronizada.

3.2 RNA de interferência (RNAi)

O clone utilizado para silenciamento de *dcr-1* foi o obtido de Volovik Y. e colaboradores¹⁰¹. Bactérias *E. coli* HT115(DE3) transformadas com vetor L4440 contendo inserto correspondente ao gene *dcr-1* ou o gene luciferase (Controle), com densidade ótica 1, foram plaqueadas sobre o meio NGM. O RNA dupla-fita expresso na bactéria pelo vetor L4440 é ingerido pela alimentação e transportado para todas as células do verme, onde o RNA dupla-fita é processado e silencia o RNAm

complementar¹⁰². Para o silenciamento de *dcr-1*, vermes de diferentes linhagens, de acordo com o experimento, foram mantidos em RNAi *dcr-1* ou Controle até a idade adulta e sincronizados conforme o Ítem 3.1. Os ovos obtidos foram novamente colocados em placas de RNAi *dcr-1* ou RNAi Controle. Estes vermes foram novamente sincronizados na idade adulta e os ovos obtidos foram colocados em placas com o RNAi correspondente. Utilizamos RNAi desde a geração parental dos vermes para obter o efeito de silenciamento gênico desde o período embrionário¹⁰¹, já que o embrião não tem contato com o meio externo, não se alimentando da bactéria que expressa a fita complementar que silencia o gene Dicer.

3.3 Determinação do tempo de vida

Para a medida do tempo de vida, cerca de 120 vermes sincronizados foram monitorados diariamente, a partir do dia 0 (zero) da vida adulta, com a utilização de um estereoscópio de luz ¹⁰³. Foram realizados três toques com haste de platina nas extremidades dos vermes, sendo estes considerados mortos quando não se obteve resposta motora aos toques. Os experimentos foram realizados a 20°C, temperatura fisiológica para o verme. Em todas as placas há 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B para evitar contaminações, além de 0,5 µg/mL de 5-fluor-2deoxiuridina - FUdR (Sigma), um inibidor de mitose, para prevenir o desenvolvimento da prole e a superpopulação das placas. Quando necessário foi utilizado o antioxidante NAC na concentração de 10mM ou VitaminaC 5mM.

3.4 Expressão de GFP

A análise da expressão de GFP para avaliação das principais vias de defesa antiestresse foi realizada no dia 3 da vida adulta dos vermes¹⁰⁴. Aproximadamente 20 vermes das linhagens especificadas em cada experimento foram mantidos em RNAi *dcr-1* ou RNAi Controle até o dia 3, quando foram transferidos para placas de 96 poços com as bordas escuras e fundo transparente. Em cada poço foi acrescentado um volume de 100µl de azida sódica 0,2% (Sigma) como agente paralizante e logo em seguida fotos foram tiradas utilizando o equipamento Cytation5 (BioTek) ou Leica M165 FC par a captação de GFP. As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do

software ImageJ, considerando a área total fluorescente normalizada pelo tamanho do verme.

3.5 Mobilidade

Nos dias 6 e 12 da idade adulta, vermes selvagens tratados com RNAi *dcr-1* ou RNAi Controle, sendo 12 por grupo, foram transferidos individualmente para placas de 96 poços contendo 100 µL de meio M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO₄, H₂O para 1 litro). Foram então medidos, por 10 segundos, todos os movimentos corporais de cada verme com a ajuda de um estereoscópio de luz¹⁰³. Cada movimento lateral dos vermes foi considerado como uma contagem. A medida foi repetida 3 vezes para cada condição e em seguida a média dos números foi transformada em contagens por minuto.

3.6 Bombeamento da faringe

Para a medida do bombeamento da faringe aproximadamente 30 vermes adultos sincronizados foram mantidos em meio NGM a 20°C e nos dias 3, 6, 9 e 12, com o auxílio de um estereoscópio de luz, foram contados o número de bombeamentos da faringe. Cada verme foi localizado individualmente na placa de NGM e a luz foi ajustada para que fosse possível enxergar o movimento da faringe, ou seja, os movimentos de deglutição de cada um deles. Durante 10 segundos foi contado o número de movimentos de deglutição realizado pelo nematoide. Essa contagem foi repetida 3 vezes para cada verme e em seguida a média do número foi transformada em contagens por minuto¹⁰³.

3.7 Análise de sequenciamento de RNAs pequenos

Para a análise da expressão de miRNAs através de sequenciamento, RNA total foi isolado de grupos de vermes no dia 1 da idade adulta. As linhagens utilizadas foram *isp-1(qm150)*, MAM13 (*dcr-1p::dcr-1*) e MAM14 (*ges-1p::dcr-1*). Após a lavagem das placas com meio M9, os vermes foram coletados e transferido para tubos de 1,5mL. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 500µL de reagente TRIzol(Life

Technologies). Foram adicionados 100µL de clorofórmio seguidos de homogeneização. Em seguida o tubo foi centrifugado à 14000g por 15 minutos e a fase aquosa superior foi coletada. Foram adicionados 40µL de acetado de sódio 3M e 150µL de isopropanol. Após homogeneização a solução foi deixada em *freezer* (-20°C) durante a noite e após este período centrifugada novamente à 14000g por 10min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado 2 vezes com etanol 75%, deixado secar à temperatura ambiente e diluído em água livre de RNase. A quantidade de RNA foi determinada através do equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent), e as amostras tiveram número de integridade de RNA (RIN, sigla do inglês) maior que 9. Para cada grupo, 10 µg de RNA total foram enriquecidas para RNA pequenos usando *PureLink miRNA Isolation Kit* (Invitrogen), quando em seguida foi realizada a preparação da biblioteca usando SOLiD Total RNA-Seq Kit, seguindo as especificações do fabricante (Life Technologies). Finalmente, as bibliotecas foram sequenciadas usando a plataforma SOLiD5500 em corrida *single read*. Para a análise, as leituras sequenciadas foram pre-processadas utilizando o *software* Fastx Tool Kit, os adaptadores foram retirados e foram mantidas apenas sequências com tamanho maior que 18pb. Essas sequências foram mapeadas no genoma de referência ce11 (UCSC) com a utilização do *software* Bowtie2. A contagem de miRNAs foi feita através do *software* Bedtools baseada no banco de dados miRBase 20. Os dados foram normalizados pelo total de sequências geradas por amostra.

3.8 Análise de Transcriptômica

Para a análise transcriptômica foram utilizados os datasets GSE95240 (vermes *isp-1*(qm150)) e GSE55333 (vermes selvagens tratado com RNAi *dcr-1*) disponíveis no NCBI. Os dados foram pré-processados utilizando a ferramenta Fastx Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/), as reads foram alinhadas e anotadas pelo alinhador Star Aligner¹⁰⁵ utilizando a versão WBcel235 do genoma de referência (http://www.ensembl.org/Caenorhabditis_elegans/).

3.9 Expressão gênica através de PCR quantitativo

Para a quantificação dos genes através de PCR-quantitativo, 500ng de RNA extraído como mencionado no item 3.7 foi utilizado para a síntese de cDNA com a utilização do Kit

High-Capacity cDNA Reverse Transcription, segundo especificações do fabricante. Em seguida, 0,25 μ L de cDNA foram utilizados numa reação de 10 μ L contendo 1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, Glen Burnie, MD) e 250nM de primers *forward* e *reverse* para *pdi-2* e *his-10* e a expressão relativa foi calculada por $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os seguintes primers foram utilizados: *pdi-2 reverse* 5'CTCTTGTGGCTTTCCGTTGC-3', e *forward* 5'-CAAATCCCTCGCCCCAGAAT-3'. As reações foram realizadas pelo aparelho CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) seguindo o seguinte protocolo: 50°C -2 min, 95°C -10 min, e 40 ciclos de 95°C -15s, 60°C -20s, e 72°C -30s.

3.10 Clonagem dos oligonucleotídeos ao vetor pMir-Report

Os oligonucleotídeos foram diluídos à concentração de 1 μ g/ μ L e anelados em tampão de anelamento (10 mM Tris, pH 7.5 - 8.0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA). A solução foi aquecida a 95°C por 2 min, deixada esfriar em temperatura ambiente e mantida nesta condição por 45 minutos. 1 μ g de vetor pMir-Report (Thermo Fisher Scientific) foi digerido com 1 μ (10 unidades) as enzimas de restrição SpeI e HindIII, na presença de tampão Cutsmart (New England Biolabs), para um volume final de 50 μ L. Os oligos anelados foram diluídos para 4ng/ μ L e ligados a 50ng de pMir-Report, na presença de DNA T4 Ligase (New England Biolabs) e tampão de ligase 1x em um volume final de 20 μ L. 2 μ L da ligação foram transformados em bactérias DH5 α competentes de acordo com o protocolo Addgene (<https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation>) e em seguida, foram plaqueados 100 μ L da transformação em placas de LB-água contendo 100mg/mL de Ampicilina.

3.11 Verificação da regulação da 3'UTR de *pdi-2* pelo miR-230-3p

Células HEK293 foram pipetadas em placas de 96 poços, em meio DMEM, na concentração de 2×10^4 e após 24 horas foram transfectadas com os vetores pMirPDI ou pMirPDI mut, além do vetor pRL-SV40 (que expressa Renilla luciferase) na presença ou ausência do mimético do miR-230-3p. Servindo como controle, foi utilizado o mimético do miR-85-3p, outro miRNA de *C. elegans* que não se liga a *pdi-2* ou a genes humanos. Após 24 horas da transfecção, o meio foi substituído para retirar os componentes dos

kits utilizados. Após outras 24 horas as células foram lavadas com PBS e em seguida foi feita a leitura para captação da luminescência de Firefly Luciferase e Renilla Luciferase com a utilização do kit Dual-Glo® Luciferase Assay (Promega).

3.12 Análise Estatística

A análise estatística para tempo de vida foi feita com teste Log-rank (Mantel-Cox). A análise estatística dos dados de RNAseq foi realizada através do software EdgeR. Nos demais experimentos, para comparação entre dois grupos foi usado o teste tStudent e para comparação de mais de dois grupos foi usado o teste ANOVA One-Way e para estes testes as diferenças foram consideradas significantes quando o $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Como mostrado anteriormente, Dicer parece ter papel significativo no controle do tempo de vida⁸⁰ e em fenômenos que envolvem a função mitocondrial. A partir destas informações buscamos entender efetivamente qual é esta função. Nos experimentos, utilizamos a técnica de RNAi para o silenciamento de Dicer. Esta técnica é usada em vermes através da alimentação, onde se fornecem bactérias que expressam RNAs pequenos que silenciam Dicer¹⁰⁶ e desta maneira conseguimos um silenciamento de aproximadamente 95% da expressão do gene que codifica para esta enzima (dados do laboratório). Considerando o importante papel de Dicer e dos de miRNAs durante o desenvolvimento dos vermes^{83,107}, a primeira pergunta que surgiu a partir dos dados gerados durante meu Mestrado foi se o efeito de Dicer seria igual na fase de desenvolvimento e na fase adulta do nematoide. Para isto, tratamos vermes selvagens com RNAi contra *dcr-1* durante toda a vida, incluindo a fase larval, ou começando o silenciamento de Dicer apenas no início da idade adulta. Nestes experimentos para avaliação do tempo de vida, vermes são mantidos em placas de cultura de nematoides e são monitorados no período que vai do dia 1 da idade adulta até a morte de cada um deles. O monitoramento é feito diariamente e os mortos são retirados das placas. Corroborando os dados anteriores, observamos, primeiramente, que o silenciamento de Dicer resulta efetivamente na diminuição do tempo de vida de aproximadamente 30% em vermes selvagens (também chamados N2 - Figura 2a, comparar linhas preta e vermelha, $p < 0,001$). Curiosamente este efeito não é observado quando o tratamento é realizado durante a fase adulta dos vermes (Figura 2a, comparar linhas preta e azul, diferença não significativa), o que sugere que os efeitos deletérios observados são provavelmente causados por modificações no período de desenvolvimento. Como é difícil obter silenciamento de Dicer estritamente na fase larval, pois não temos como inibir os efeitos do RNAi a partir do início da fase adulta, a partir deste ponto todos os protocolos de silenciamento de Dicer foram feitos com os vermes sendo expostos ao protocolo de silenciamento durante toda a vida.

Como efeitos na longevidade estão muitas vezes relacionados com alterações fisiológicas, avaliamos também dois dos parâmetros mais afetados durante a vida dos vermes e que são considerados como medidas indiretas de saúde, sendo estes a taxa de bombeamento da faringe e a movimentação. Eles refletem indiretamente o estado

da estrutura muscular do verme que vai perdendo funcionalidade durante o envelhecimento, num processo que se parece com o quadro de sarcopenia em humanos¹⁰⁸. Para avaliação da movimentação os vermes são mantidos em meio líquido isosmótico, onde são contados os movimentos laterais que eles realizam em meio aquoso. Como pode ser observado na Figura 2b, enquanto vermes tratados com RNAi *dcr-1* apenas durante a fase adulta não apresentam alteração motora em relação ao grupo controle em nenhum dos dias avaliados, vermes tratados com RNAi *dcr-1* durante toda a vida apresentam grande diminuição na movimentação já no dia 6 da vida adulta, quadro que aparentemente se mantém em vermes mais velhos, apesar de não termos diferença estatística no dia 12. A taxa de bombeamento da faringe é a quantidade de deglutições que o verme realiza em um determinado período e pode ser facilmente verificada em uma estereoscópio de luz de baixo aumento. Da mesma forma que a análise da movimentação, a taxa de bombeamento da faringe diminui consideravelmente nos vermes tratados com RNAi *dcr-1* a vida inteira (Figura 2c). Este efeito aparece a partir do dia 9 da idade adulta e não é observado em vermes tratados com RNAi *dcr-1* apenas durante a fase adulta. Isto sugere que a estrutura/função muscular de vermes se deteriora mais rapidamente com o tempo com silenciamento de Dicer e estas alterações se devem a problemas causados pela ausência de Dicer na fase de desenvolvimento dos vermes.

Em seguida buscamos caracterizar de maneira mais ampla os efeitos da diminuição da expressão de Dicer sobre a resposta ao estresse. Como havíamos observado indícios de estresse oxidativo em vermes com *dcr-1* silenciada, primeiramente avaliamos como estavam as principais vias de defesa antiestresse em nematoides. Para isto, medimos a expressão de GFP em vermes *reporter*, onde o gene que codifica para esta proteína fluorescente está fusionado aos promotores de genes responsáveis pela resposta ao estresse oxidativo (*gst-4* e *sod-3*) e estresse de desbalanço proteico mitocondrial (UPR^{mt}) e retículo endoplasmático (UPR^{er}) (*hsp-6* e *hsp-4*, respectivamente)^{38,109}.

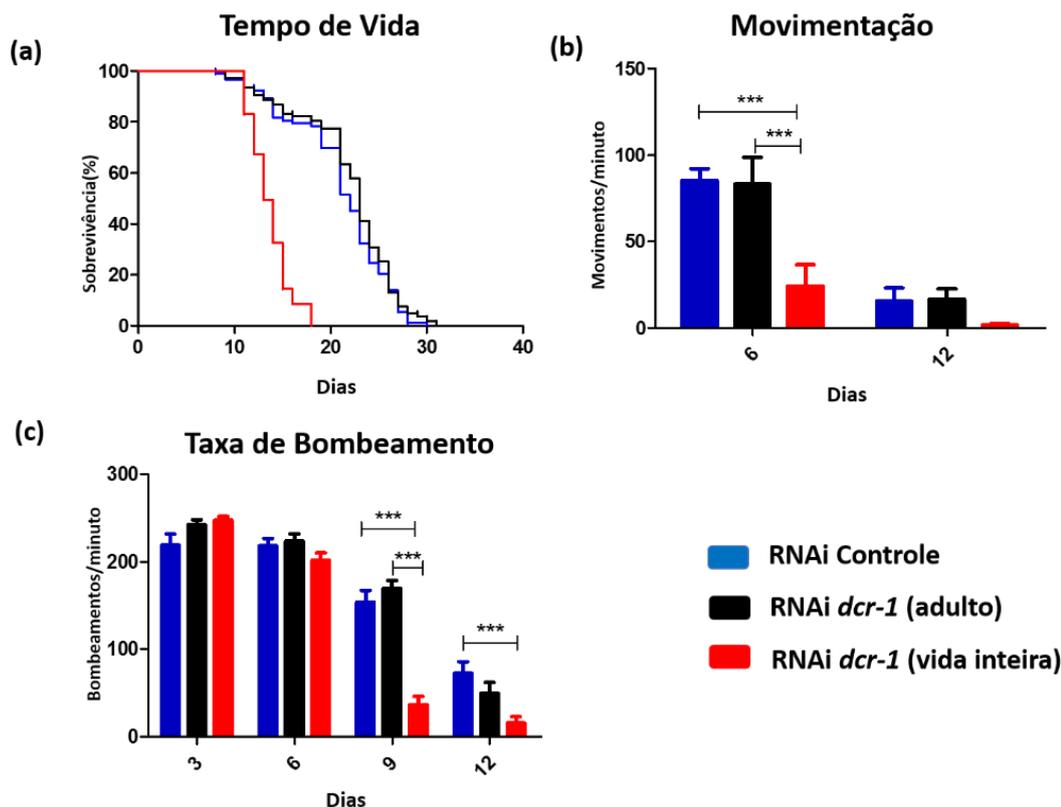


Figura 2 – Efeitos do silenciamento de Dicer. (a) Tempo de vida de vermes N2 tratados com RNAi *dcr-1* durante toda a vida do verme (n = 83) ou durante a fase adulta (n= 107) e RNAi Controle (n= 93). (b) Movimentação de vermes N2 tratados com RNAi *dcr1* durante toda a vida do verme ou durante a fase adulta e RNAi Controle. N = 12 por grupo. (c) Taxa de bombeamento da faringe de vermes N2 tratados com RNAi *dcr-1* durante toda a vida do verme ou durante a fase adulta e RNAi Controle. N = 12 por grupo. Em (a) os dados foram analisados com teste Log-rank e em (b) e (c) com teste One-Way ANOVA. Análise e gráfico feitos em Graphpad Prisma 5. Gráfico representativo de experimentos feitos em duplicata biológica. “****” indica P<0,001.

Como os vermes são transparentes, é possível avaliar a expressão de proteínas fluorescentes em nematoides ainda vivos. Sendo assim, nestes experimentos, como a expressão de GFP está sendo controlada por promotores de genes que agem em resposta a certos tipos de estresse, caso vejamos aumento da expressão desta proteína fluorescente após o silenciamento de Dicer poderemos inferir que os genes, também controlados por aqueles promotores, serão regulados transcricionalmente da mesma maneira. Como pode ser visto na Figura 3a, a expressão de GFP aumentada sugere que os níveis de superóxido dismutase mitocondrial (*sod-3*) estão elevados como resposta ao estresse desencadeado pelo silenciamento de Dicer. Este quadro parece não se limitar a *sod-3*, mas também fica evidente para glutathione S-transferase *gst-4* (Figura 3b), cuja proteína é responsável pela resposta a diferentes tipos de estresses

enfrentados pela célula, principalmente oxidativo^{110,111}. Por outro lado, marcadores de vias de resistência ao estresse ativadas geralmente como resposta a desbalanço proteico mitocondrial (*hsp-6*) e do retículo endoplasmático (*hsp-4*), ou apresenta expressão diminuída (Figura 3c) ou não está alterada (Figura 3d), respectivamente. A ativação de *sod-3* e *gst-4* corrobora nossos resultados anteriores que mostram que a diminuição da expressão de Dicer aumenta os níveis de ROS e bloqueia o aumento do tempo de vida em intervenções variadas que promovem longevidade de maneira dependente de espécies reativas de oxigênio. Isto porque, como já mostrado, o controle fino dos níveis de ROS é imprescindível nestas situações, e alterações pequenas no balanço redox podem mudar bruscamente a resposta a estes tratamentos. Tentamos também a medição dos níveis de ROS com a utilização da sonda Amplex Red Reagent (Thermo Fisher Scientific), mas como esta técnica mede os níveis de peróxido no meio de cultura, a quantidade deste composto liberada pelos vermes foi muito baixa, sendo difícil de captar sinal suficiente para quantificação.

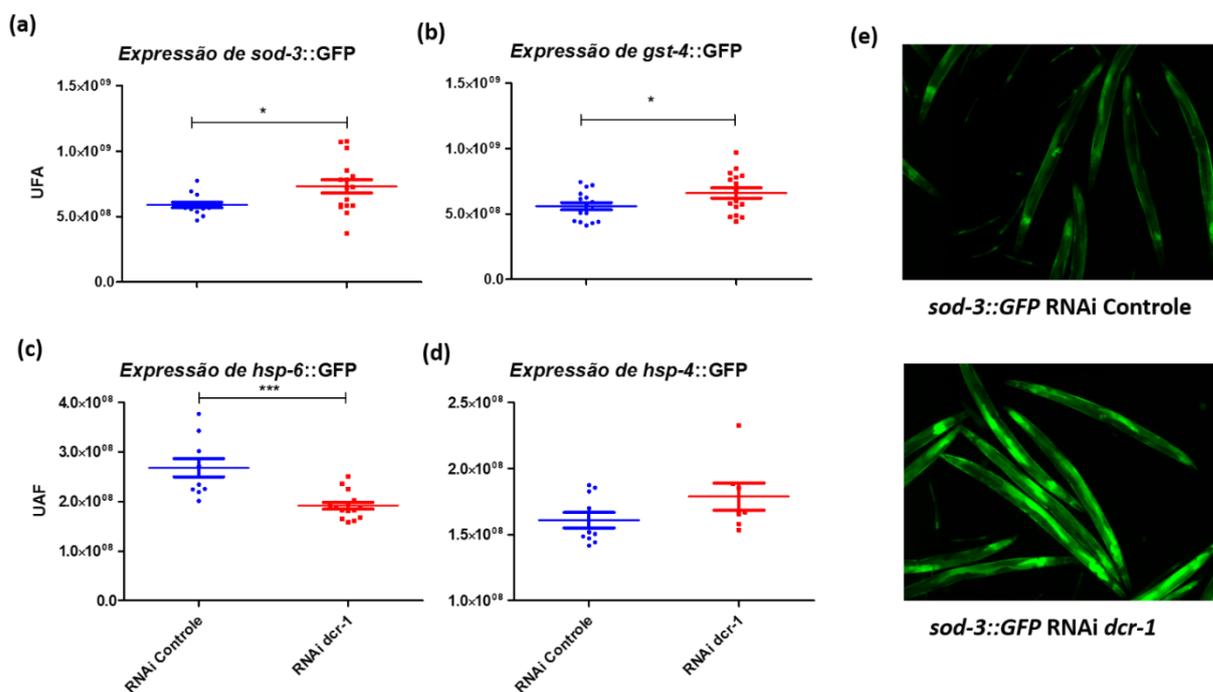


Figura 3 – Resposta ao estresse ativada pelo silenciamento de Dicer em vermes *reporter*. Expressão de GFP dirigida pelos promotores de (a) *sod-3*, (b) *gst-4*, (c) *hsp-6* e (d) *hsp-4* em vermes tratados com RNAi *dcr-1* e RNAi Controle. “***” indica $P < 0,001$ e “*” indica $P < 0,05$. Análise e gráfico feitos em Graphpad Prisma 5. Teste t-Student. Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes.

Baseando-se nesses dados, hipotetizamos que o uso de antioxidantes diminuiria os efeitos do silenciamento de Dicer por diminuir o que achávamos serem os

causadores do problema, ROS. Uma maneira muito comum de se fazer esta análise em vermes é por meio da utilização de antioxidantes nas placas de cultura de vermes juntamente com o tratamento que se quer avaliar. Tratamos então, concomitantemente, vermes com RNAi *dcr-1* ou RNAi Controle na presença ou ausência do antioxidante NAC na maior concentração em que este composto não apresenta efeito tóxico para os vermes³¹. Curiosamente, como pode ser visto na Figura 4a, os efeitos deletérios no tempo de vida de vermes selvagens tratados com RNAi *dcr-1* podem ser parcialmente revertidos com o tratamento simultâneo com o antioxidante, passando de uma diminuição de 30% (comparar linha azul cheia com linha azul pontilhada, $p < 0,0001$) para aproximadamente 20% (comparar linha azul cheia com linha vermelha pontilhada, $p < 0,0001$). Isso nos sugere que estes efeitos são, pelo menos em certo grau, causados pela elevação dos níveis de agentes pró-oxidantes. Porém, como o NAC também tem o efeito de se ligar a grupos tiol, utilizamos Vitamina C, outro antioxidante, como um controle adicional para diferenciarmos o efeito de redução de espécies reativas de oxigênio do efeito relacionado às ligações do enxofre. Como mostrado na Figura 4b, apesar do efeito neste experimento ter sido menor, há ainda uma reversão parcial e significativa da diminuição do tempo de vida de vermes expostos ao *dcr-1* RNAi de 50% (comparar linha azul cheia com linha azul pontilhada, $p < 0,0001$), para 40% no tratamento concomitante de RNAi *dcr-1* e NAC (comparar linha azul cheia com linha verde pontilhada, $p < 0,0001$). Este efeito protetor não é visto em vermes com silenciamento de Dicer concomitante ao tratamento com Vitamina C em que a diminuição do tempo de vida permanece em 50% (comparar linha azul cheia com linha vermelha pontilhada). Isto nos sugere que, ao invés de estarmos vendo um efeito causado apenas pela diminuição de agentes pró-oxidantes, aparentemente outros efeitos de NAC tenham também participação na proteção em relação à diminuição do tempo de vida observada nestes experimentos.

Temos, portanto, um desbalanço redox em vermes tratados com RNAi *dcr-1* como resposta ao silenciamento, o que fica evidenciado tanto pelo aumento de espécies reativas de oxigênio quanto pelo aumento na expressão de genes relacionados com a defesa ao estresse oxidativo, *sod-3* e *gst-4*^{110,111}. No entanto, agentes pró-oxidantes não parecem ser um fator determinante para o fenótipo de diminuição do tempo de vida observado.

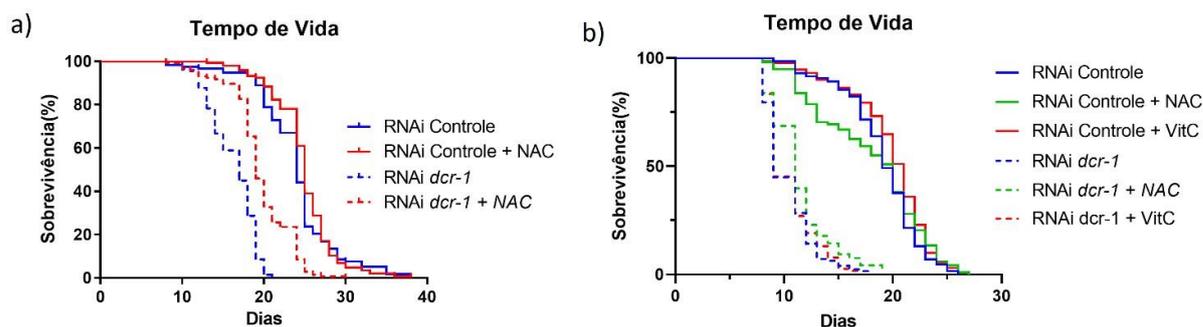


Figura 4 – Os efeitos deletérios do silenciamento de Dicer no tempo de vida de vermes é parcialmente revertido por NAC.

(a) Tempo de vida de vermes N2 tratados com RNAi *dcr-1* (n = 129) e RNAi Controle (n = 118), com tratamento simultâneo do antioxidante NAC (n = 143 e n = 146, respectivamente). (b) Tempo de vida de vermes N2 tratados com RNAi Controle (n = 130), RNAi Controle + NAC (n = 118), RNAi Controle + VitC (n = 131), RNAi *dcr-1* (n = 127), RNAi *dcr-1* + NAC (n = 118) e RNAi *dcr-1* + VitC (n = 115). Análise e gráfico feitos em Graphpad Prisma 5. Experimentos com NAC tem N=2 e com Vitamina C, N=1.

Tendo isto em vista e considerando a diminuição da expressão de *hsp-6* (Figura 3c), um marcador de UPR mitocondrial, uma hipótese levantada foi a possível inibição da ativação dessa resposta em vermes expostos a *dcr-1* RNAi, o que os deixaria mais sensíveis a estresses proteotóxicos mitocondriais. Como mostrado anteriormente, a ativação da via de UPR^{mit}, que está associada ao aumento do tempo de vida em alguns vermes mutantes, tem como alvos demetilases como *jmjd-1.2/PHF8* e *jmjd3.1/JMJD3*^{40,112}. A superexpressão dessas proteínas já é capaz de aumentar, por si, o tempo de vida de vermes com *background* selvagem e mutações nestas proteínas bloqueiam a extensão do tempo de vida em intervenções que ativam a UPR^{mit}, como mutantes *isp-1* e *nuo-6*⁴⁰. Para testar se a superexpressão destas demetilases poderia prevenir os efeitos deletérios da diminuição da expressão de Dicer por ativarem UPR^{mit} a jusante na via, novamente silenciamos Dicer, mas agora em duas linhagens de vermes que apresentam um transgene com uma construção que leva a superexpressão de *jmjd-1.2*⁴⁰ sob direção do promotor ubíquo *sur-5*.

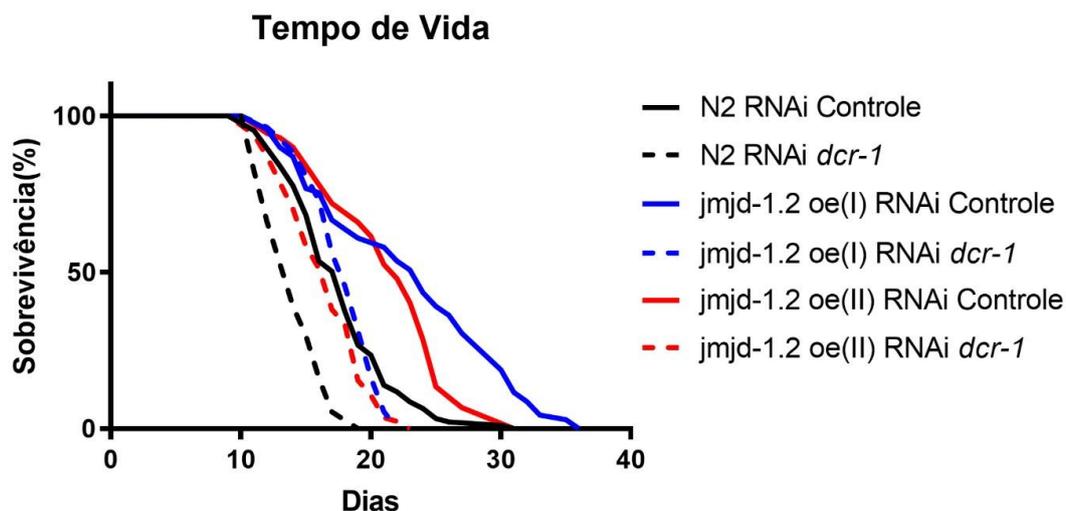


Figura 5 | A superexpressão de JMJD-1.2 não é capaz de prevenir os efeitos deletérios causados pelo silenciamento de Dicer. Quantificação do tempo de vida das linhagens wild-type (N2) e duas linhagens diferentes de vermes que contém o *transgene* N2, *uth1s404[myo-2::tdtomato; sur-5p::jmjd-1.2::3'UTR unc-54]* que leva a superexpressão de JMJD-1.2, tratados com RNAi *dcr-1* e RNAi controle. As curvas foram comparadas através do teste log-rank. Número de animais por condição = 150. Experimento feito em duplicata.

Como pode ser visto na Figura 5, o aumento de mais de 30% no tempo de vida induzido pela superexpressão de JMJD1.2 (comparar linha preta cheia com linhas coloridas cheias, $p < 0,0001$ em ambos os casos) é inibido pelo silenciamento de Dicer (comparar linha preta cheia com linhas coloridas pontilhadas, diferença não significativa), sugerindo que esta intervenção leva à alguma alteração que impede os efeitos benéficos da superexpressão de JMJD-1.2, assim como acontece com vermes mutantes em *isp-1* e *nuo-6*, que também são intervenções que ativam a UPR^{mit}. Esta diminuição é até maior do que a encontrada em vermes selvagens (comparar linhas preta cheia e pontilhada, diminuição de 20% no tempo de vida com $p < 0,0001$).

Com o intuito de avaliar se o silenciamento de Dicer poderia afetar de alguma forma a ativação da UPR^{mit}, silenciámos Dicer em mutantes ***clk-1(qm30) III***, ***isp-1(qm150) IV***, e ***nuo-6(qm200) I*** que apresentam, adicionalmente à cada umas destas mutações mitocondriais, um transgene com a expressão de GFP guiada pelo promotor do gene *hsp-6* – ***zcl13[hsp-6::GFP]***. Como estes vermes têm ativação constitutiva de *hsp-6*, se o silenciamento de Dicer afetasse a ativação desta chaperona, esperaríamos ver o bloqueio ou diminuição desta ativação. Porém, como pode ser observado na Figura 6, apesar da consistente diminuição da expressão de *hsp-6* em vermes com *background* selvagem tratados com RNAi *dcr-1* (Figura 6a), o mesmo tratamento nos

demais vermes, longevos mutantes, não foi capaz de bloquear a ativação de *hsp-6* (Figuras 6b, 6c e 6d). Estes dados, em conjunto, nos sugerem que os efeitos causados pela diminuição da expressão de Dicer não estão diretamente relacionados a alterações na capacidade de ativação da via de *UPR^{mit}*, pois ela permanece funcional neste tratamento.

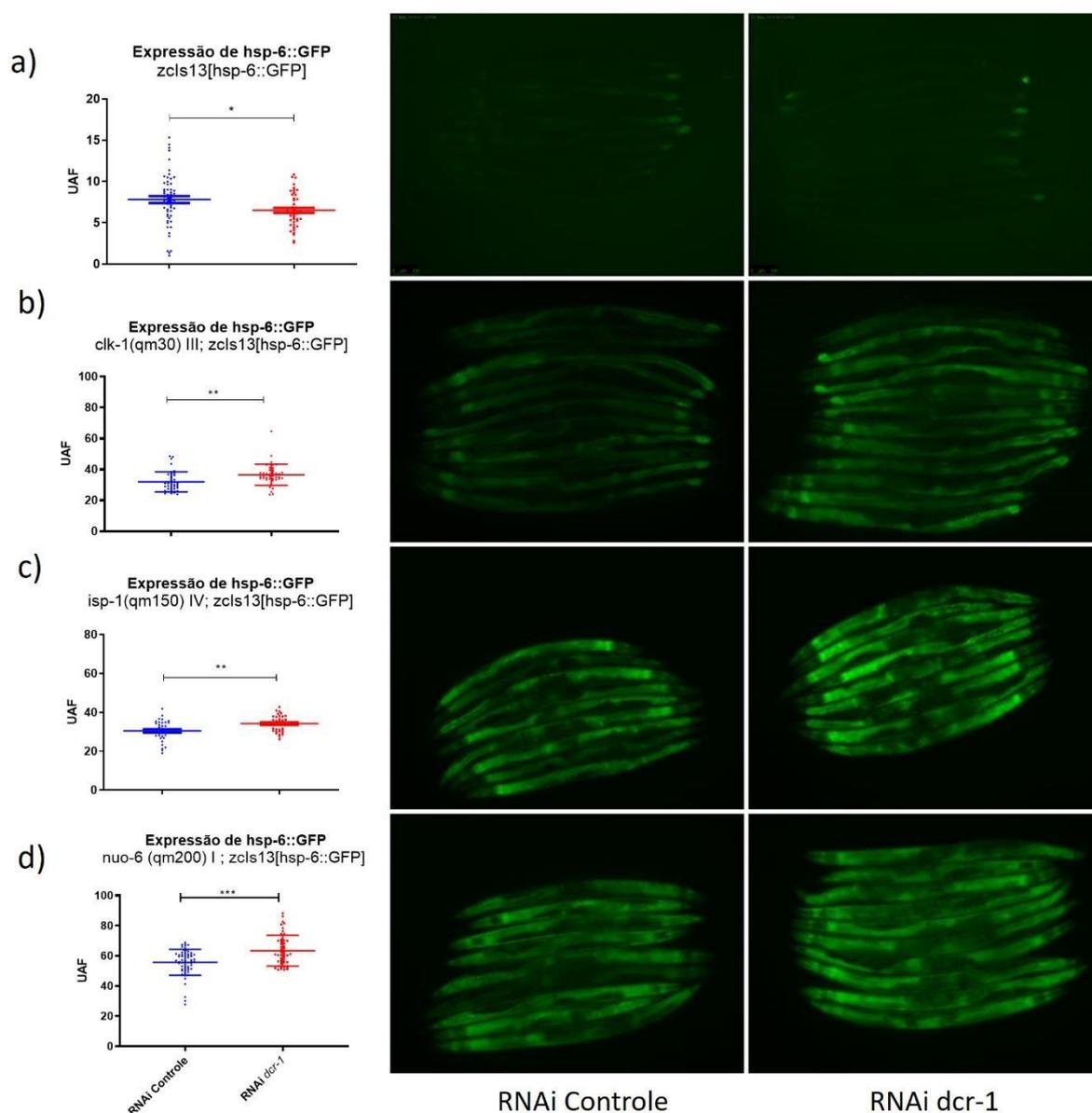


Figura 6 | *dcr-1* RNAi não bloqueia a ativação da via de *UPR^{mit}* mitocondrial em vermes longevos mutantes para componentes de cadeia respiratória. a-d. Expressão de *hsp-6::gfp* em a) vermes com background selvagem, b) *clk-1*(qm30) III, c) *isp-1* (qm150) IV e d) *nuo-6* (qm200) I, todos contendo o transgene zcls13[*hsp-6::GFP*], em resposta ao tratamento com RNAi *dcr-1* e RNAi Controle. Duplicata de experimentos. Vermes por condição = 15-45. Dados de expressão coletados no dia 3 da vida adulta dos vermes. Os dados são a média + desvio padrão da média da expressão de GFP em unidades arbitrárias de expressão. Análise estatística com t-Student test. Aumento de 10x. Equipamento Leica M165 FC.

Ao descartarmos a hipótese de problemas na ativação de UPR^{mit}, nos dedicamos à análise de dados de transcriptômica e mirnômica disponíveis para algumas linhagens mutantes e transgênicas utilizadas neste projeto com o intuito de tentar identificar os possíveis genes, e talvez miRNAs, envolvidos nos efeitos descritos anteriormente. Como já citado, vermes longevos com alteração em complexos mitocondriais (*isp-1* e *nuo-6*, por exemplo) têm o aumento do tempo de vida bloqueado quando tratados com RNAi *dcr-1*. Estes dados sugerem que a regulação da longevidade induzida por estas mutações é dependente de Dicer. Comparamos, portanto, RNAseq de vermes mutantes para *isp-1* e *nuo-6* com RNAseq de vermes tratados com RNAi *dcr-1*. Estas transcriptômicas foram obtidas de dados públicos através do GEO *Datasets* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>), uma ferramenta do NCBI que armazena dados de sequenciamento publicados em revistas indexadas na plataforma. As linhagens de mutantes mitocondriais foram sequenciadas no início da fase adulta dos vermes, dia 1 em período não fértil para evitar a presença de ovos, tendo como controle vermes selvagens no mesmo período. A linhagem em que Dicer foi silenciada é um mutante não fértil, *fem-1*, sequenciado no dia 4 da idade adulta e comparado com a mesma linhagem tratada com RNAi clonado com vetor vazio, como controle. O mutante *fem-1* não produz células germinativas masculinas, o que evita a postura de ovos férteis e a superpopulação das placas¹¹³. Os dados brutos foram obtidos e analisados novamente para estarem todos com o mesmo tipo de processamento e, então, comparados. Nestes *datasets* selecionamos genes diferencialmente expressos (FDR < 0,05) e com *fold-change* menor ou maior que 0,5 (log2). Buscamos nesta análise genes com o seguinte padrão: a) **aumento de expressão no grupo tratado com *dcr-1* RNAi** (devido ao fato de que esperávamos aumento de expressão de grande parte dos genes, pois estamos silenciando repressores de expressão, os miRNAs); e b) **alteração de expressão em sentido oposto em vermes mutantes *isp-1* e *nuo-6***, já que observamos bloqueio do fenótipo de longevidade destes mutantes quando Dicer está silenciada. Com isso esperávamos encontrar genes que poderiam estar alterados em vermes mutantes de componentes da cadeia transportadora de elétrons e que tivessem expressão revertida pelo silenciamento de Dicer, os quais poderiam explicar a interação observada anteriormente. Utilizando estes critérios, encontramos os genes F14H12.3, *ora-1*, F45D3.4, *ugt-1*, *pdi-2*, *acdh-2*, *lys-4* e *trap-2* (Figura 7a). De maneira geral, estes

são genes muito pouco estudados. Aproximadamente metade deles estão caracterizados como codificadores de proteínas hipotéticas. Submetendo estes genes para classificação no WormEnrichr encontramos uma via enriquecida em vários tipos de ontologias, via esta relacionada à atividade oxirredutase e isomerase de *Protein Disulfide Isomerase 2 (pdi-2)*, como pode ser visto na Figura 7b (p valor ajustado < 0,05 nas barras coloridas em tons de azul). O enriquecimento destas ontologias se deve basicamente à presença do gene *pdi-2*, pois há pouca informação sobre os outros genes, com exceção da *Translocon-associated protein subunit beta (trap-2)*, que é responsável pela retenção de proteínas residentes no Retículo Endoplasmático e também aparece como responsável por alguns desses enriquecimentos. Diferentemente do que achávamos inicialmente, estes dados apontam para uma possível alteração no retículo endoplasmático causada pelo silenciamento de Dicer ao invés de um problema limitado à mitocôndria.

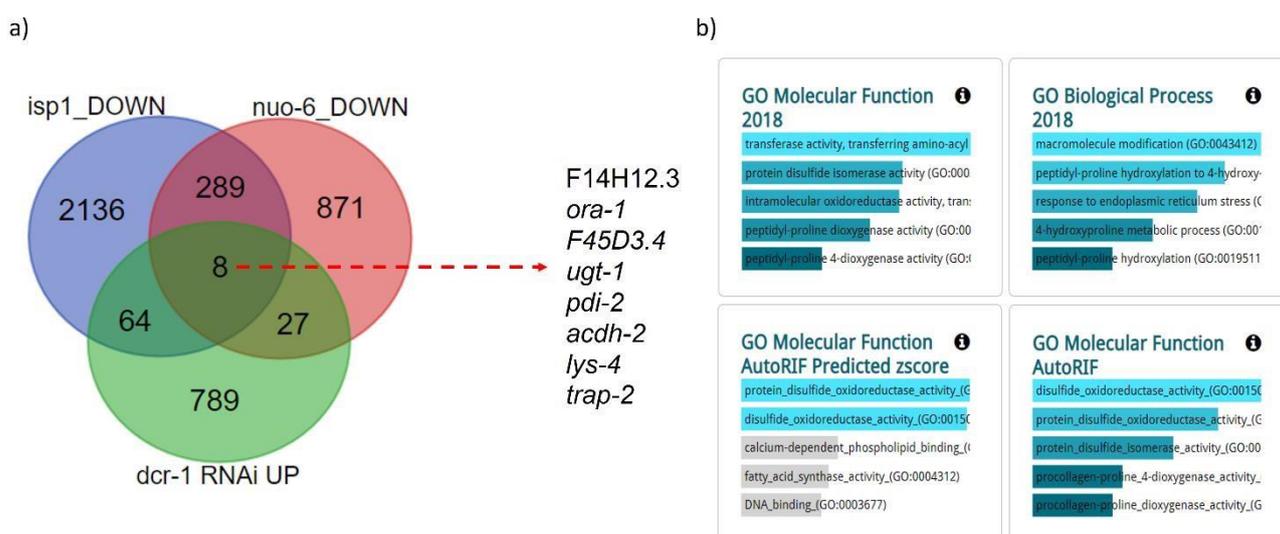


Figura 7 | Genes comumente regulados entre vermes mutantes para componentes de complexos mitocondriais e o silenciamento de Dicer. (a) Diagrama de Venn mostrando a intersecção entre genes com expressão aumentada em vermes selvagens tratados com RNAi *dcr-1* e genes com expressão diminuída em vermes *isp-1* e *nuo-6*. (b) Ontologia resultante para os genes encontrados em (a). Dados analisados em WormEnrichr.

Para tentar encontrar os possíveis miRNAs envolvidos na regulação deste grupo de genes e entender melhor como se dá esta interação Dicer/retículo endoplasmático (Figura 7a), identificamos, por meio da ferramenta TargetScan (http://www.targetscan.org/worm_52/), todos os miRNAs descritos como reguladores putativos deles e selecionamos aqueles que alvejassem ao menos três dos oito genes, pois miRNAs importantes em certo contexto metabólico tendem a regular múltiplos

genes dentro de uma mesma via¹¹⁴. Utilizando estes critérios encontramos um total de 26 miRNAs: *mir-1020*, *mir-85*, *mir-785*, *mir-86*, *mir-2221*, *mir-230*, *mir-1820*, *mir-1819*, *mir-355*, *mir-255*, *mir-799*, *mir-796*, *mir-4809*, *mir-252*, *mir-4805*, *mir-251*, *mir-245*, *mir358.2*, *mir-789-2*, *mir-789-1*, *mir-254*, *mir-792*, *mir-1*, *mir-4813*, *mir-60* e *mir-2218b*.

Além dos *datasets* de expressão gênica, também analisamos dados de expressão de miRNAs de vermes mutantes *isp-1* e de vermes com superexpressão de Dicer no intestino e no corpo inteiro, uma vez que estes dois últimos têm aumento no tempo de vida e da resistência ao estresse oxidativo mediado pela alteração de miRNAs⁸⁰. Estas linhagens apresentam as construções *ges-1p::dcr-1* e *dcr-1p::dcr-1*, que têm a expressão de Dicer dirigida por um promotor específico para as células intestinais ou pelo promotor endógeno de Dicer, respectivamente. Estes vermes foram construídos no nosso laboratório, têm estas construções integradas ao genoma e apresentam expressão estável de Dicer em níveis maiores que os níveis basais (dados não publicados do laboratório). Os RNAs pequenos destas linhagens foram sequenciados no dia 1 da idade adulta dos vermes, ainda no período não fértil para evitar a presença de miRNAs provenientes dos ovos. Utilizamos como critério de seleção o *fold-change* > 0.5 (log2). Curiosamente, dos miRNAs detectados no sequenciamento, seguindo estes critérios, mais de 90% deles aparecem aumentados no mutante *isp-1*, o que sugere que se os efeitos de extensão da longevidade nesta linhagem forem dependentes de miRNAs, há grande chance de eles estarem entre os aumentados. Nas linhagens com superexpressão de Dicer aproximadamente metade dos miRNAs aparecem aumentados e outra metade diminuídos. Portanto, na comparação entre estes diferentes *datasets* buscamos **a)** miRNAs com expressão aumentada no *isp-1* e **b)** miRNAs com expressão aumentada em ao menos um dos dois vermes transgênicos com superexpressão de Dicer. Neste caso procurávamos por miRNAs que fossem afetados pela mutação em *isp-1* e, concomitantemente, fossem responsáveis a alterações nos níveis de Dicer. Utilizando estes critérios encontramos um total de 18 miRNAs: miR-35-3p, miR-356b-3p, miR-230-3p, miR-356a, miR-799, miR-82-5p, miR81-5p, miR-240-5p, miR-259, miR-788, miR-233-3p, miR-45-5p, miR-251, miR-793, miR-49-3p, miR-90-3p, miR-8193-5p e miR-84-3p.

Por fim, comparamos os miRNAs que se apresentaram como possíveis reguladores dos genes identificados na análise de expressão gênica, com os miRNAs

simultaneamente alterados no mutante *isp-1* e em resposta à superexpressão de Dicer. Apenas 3 miRNAs aparecem simultaneamente nos grupos citados: *mir-230*, *mir-251* e *mir-779*. A quase totalidade dos genes possivelmente regulados por estes três miRNAs são alvejados por apenas um deles. Mas curiosamente o único gene alvejado por 2 destes miRNAs (*mir-230* e o *mir-251*), é o gene *pdi-2*. Ainda com a ajuda do software TargetScanWorm foi possível checar que a fita que se liga efetivamente no gene é *miR230-3p* (Figura 8). Este miRNA apresenta dois sítios preditos de ligação com o gene *pdi-2*, além de serem sítios com alta chance de apresentarem conservação (Figura 8, setas vermelhas indicam possíveis sítios onde o *miR-230-3p* alveja o gene *pdi-2*). O *miR-251*, por outro lado, tem apenas um sítio predito e com menor probabilidade de conservação, tendo assim menor chance de exercer regulação em *pdi-2*.

Considerando este conjunto de dados, até aqui temos que o gene *pdi-2* aparece com expressão aumentada na análise do RNAseq de vermes tratados com RNAi *dcr-1*, situação em que os miRNAs estão sendo menos processados. Seu provável regulador, o *miR-230-3p*, está aumentado em vermes com mutação mitocondrial, que são longevos e que tem o aumento do tempo de vida dependente de Dicer. Junto a isto, dados com o verme mutante para *alg-1*, outra proteína também importante na via de processamento de miRNAs, também apresenta expressão de *pdi-2* aumentada¹¹⁵. Se considerarmos, a priori, que o *miR-230-3p* é realmente um regulador de *pdi-2*, uma possibilidade é que a diminuição da expressão de Dicer, por causar problemas no processamento de miRNAs⁸⁰, levaria ao aumento de *pdi-2*, o que poderia ser um dos fatores que afeta, diretamente ou indiretamente, o tempo de vida dos vermes.

C. elegans *pdi-2* 180724.1 3' UTR [Other transcripts]

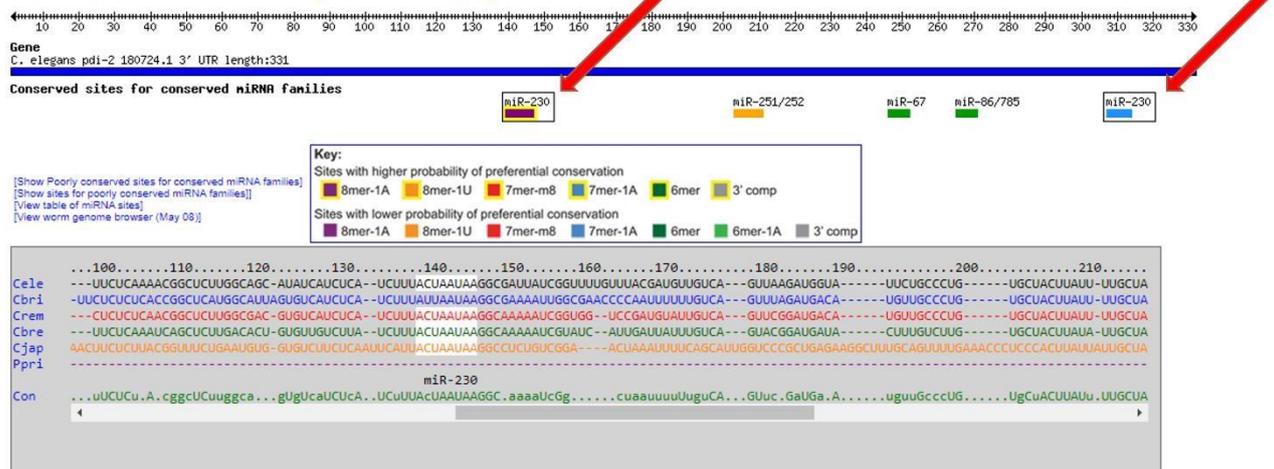


Figura 8 | Sitios putativos de ligação de miR-230 ao gene *pdi-2* indicados pela ferramenta TargetScan Worm. Setas vermelhas indicam a posição dos sites de ligação.

Para testar a hipótese de que o miR-230-3p e/ou *pdi-2* afetam a longevidade de vermes, primeiramente comparamos o tempo de vida de mutantes tanto do miRNA quanto do gene, com o tempo de vida de vermes selvagens. Como pode ser visto na Figura 9a, a mutação de perda de função no *mir-230* (linha vermelha) não é suficiente para afetar o tempo de vida desta linhagem mutante em relação ao verme selvagem (linha azul, diferença não significativa). De forma semelhante, quando avaliamos o tempo de vida de vermes com mutação em *pdi-2* (verme TP69), esta alteração também não é capaz de alterar o tempo de vida dos vermes em relação ao verme selvagem (Figura 9b, comparar linhas cheias azul e vermelha, diferença não significativa). No entanto, quando os vermes estão expostos a RNAi *dcr-1*, o mutante *pdi-2* se mostra mais resistente ao efeito desta intervenção, vivendo significativamente mais que o verme selvagem na mesma condição (Figura 9b, linhas tracejadas azul e vermelha). A redução no tempo de vida que é da ordem de 55% em vermes selvagens tratados com RNAi *dcr-1* (comparar linhas azul cheia com azul pontilhada, $p < 0,0001$), cai para uma redução de aproximadamente 36% nos vermes mutantes para *pdi-2* (comparar linhas vermelha cheia e vermelha pontilhada, $p < 0,0001$). Estes dados nos sugerem que, tanto *pdi-2* quanto miR-230 parecem não ter papel essencial na regulação do tempo de vida em situações normais, porém, o aumento da expressão de *pdi-2* em um contexto de

silenciamento de Dicer faz com que os efeitos deste silenciamento sejam mais deletérios para o verme.

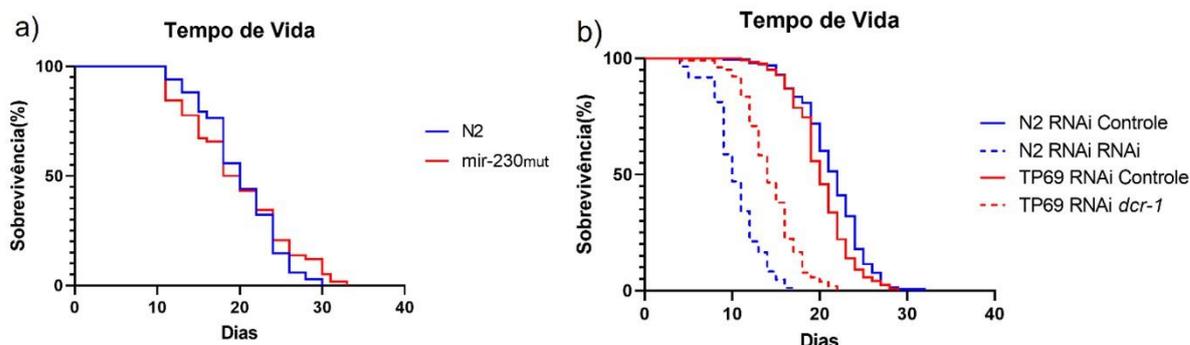


Figura 9 | Efeitos de mutações em *pdi-2* e *mir-230* na longevidade de nematoide *C. elegans*. (a) Tempo de vida de vermes N2 e vermes MT14662, mutantes para *mir-230*. (b) Tempo de vida de vermes N2 e vermes TP69, mutantes em heterozigose para *pdi2*, tratados com RNAi Controle ou RNAi *dcr-1*. Análise e gráfico feitos em Graphpad Prisma 5. Aproximadamente 120 vermes por condição. Experimentos feitos em duplicata.

Curiosamente, não há na literatura evidências de regulação de *pdi-2* por miRNAs e os dados do software Targetscan são apenas previsões de sítios de ligação. Buscamos, portanto, testar funcionalmente se miR-230-3p regula *pdi-2*. Para isto, a estratégia utilizada foi basicamente um teste para avaliar se há ligação entre o mimético do miR-230-3p e a região correspondente da região 3'UTR de *pdi-2* clonada no vetor pMir-Reporter (Figura 10a). Este vetor tem a região de clonagem (MCS, sigla do inglês para *Multiple Cloning Site*) na posição da região 3'UTR do gene da luciferase, gene expresso neste vetor. É possível, portanto, analisar se há alteração na expressão de luciferase e, conseqüentemente, se há interação de miRNAs com a região 3'UTR que pode ser clonada. Os sítios preditos de ligação de miR-230-3p e a região 3'UTR deste gene foram obtidos utilizando o programa TargetScan Worm.

Foram sintetizados pares de oligonucleotídeos contendo toda a região de ligação do miRNA na região 3'UTR de *pdi-2* (Figura 10b). Estes oligos possuem sequências complementares entre si, e podem ser anelados, compondo um segmento de DNA de fita dupla correspondente ao DNA que codifica para o sítio de ligação do miRNA à região 3'UTR do gene (conforme a representação esquemática na Figura 10c). Adicionalmente, para a clonagem foram inseridos sítios de restrição SpeI e HindIII,

permitindo a ligação destes oligos ao vetor dentro do MCS, nas regiões indicadas por setas pretas na Figura 10a. Além destes sítios, também foi inserido sítio de restrição para NotI, para facilitar a verificação da clonagem já que os fragmentos inseridos são pequenos (região azul na Figura 10b). Estes oligos foram chamados de fita “Positiva” e fita “Negativa” (Figura 10c). Como maneira de evitar o pareamento miRNA-gene, complementarmente, estes mesmos oligonucleotídeos foram mutados na região onde o miRNAs se liga à 3’UTR de *pdi-2*. Estes outros oligos foram chamados de fita “Positiva Mutada” e fita “Negativa Mutada” (Figura 10c). Temos, portanto, um controle para avaliar se a regulação é efetivamente mediada pela ligação miRNA-gene e não por algum artefato no experimento.

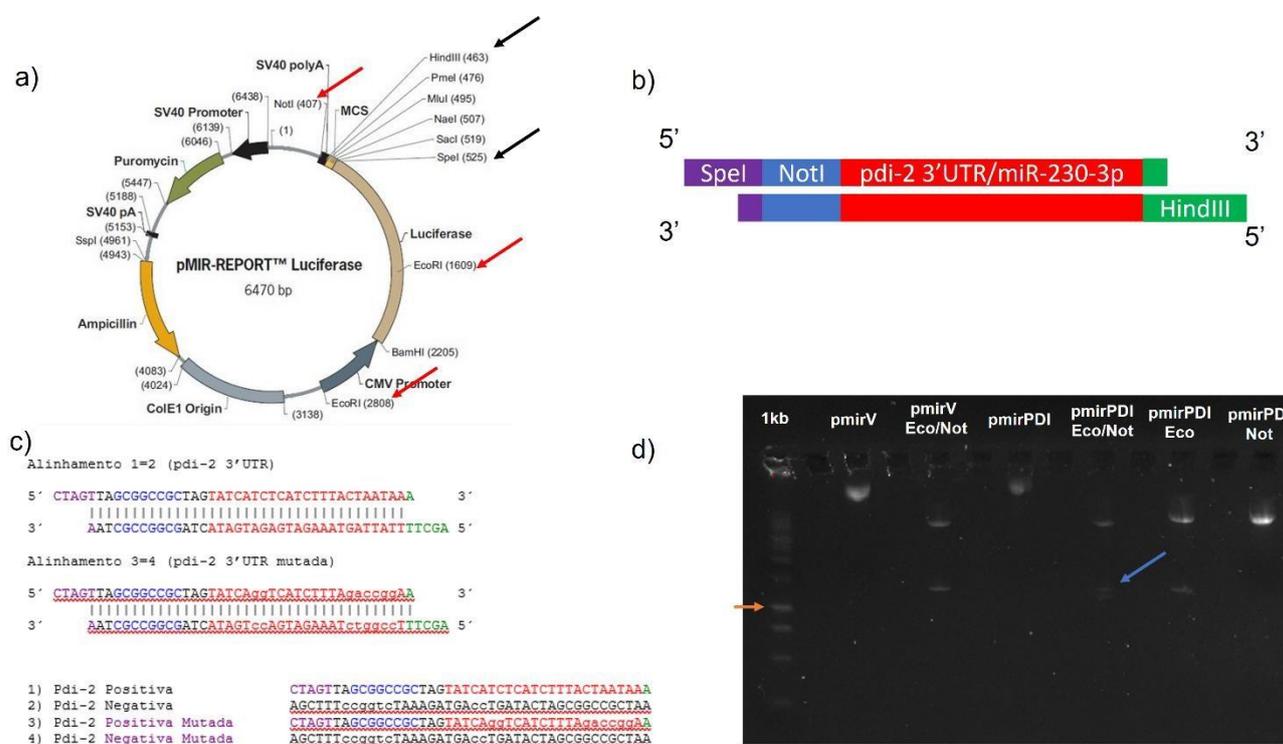


Figura 10 | Estratégia de clonagem e sequência dos oligos para a clonagem. a) Imagem esquemática do vetor pMIR-Reporter (ThermoScientific). Setas pretas representam sítios de clonagem e setas vermelhas sítios para verificação da clonagem. b) Representação do alinhamento dos oligos e da localização de cada um dos sítios de restrição neles inseridos. c) Sequência e alinhamento de cada um dos oligos. d) Gel 1,5% de agarose com a digestão dos plasmídeos pelas enzimas indicadas.

Os oligos foram anelados e clonados no vetor pMIR-Report digerido por SpeI e HindIII. Em seguida, para verificação, o vetor clonado foi digerido pelas enzimas NotI e EcoRI, com sítios marcados em vermelho na Figura 10a. O plasmídeo vazio (pMirV) também foi digerido com EcoRI e NotI, como controle, para ajudar a determinar a posição de cada banda no gel. O tamanho total do plasmídeo é 6470pb, os dois sítios

para EcoRI estão nas posições 1609pb e 2808pb e os sítios para NotI em 407pb e em 530pb (inserido junto com o oligo clonado). Esperávamos observar a abertura de pMirPDI quando o corte fosse feito apenas pela enzima NotI e que apenas a banda superior (aproximadamente 6kb) aparecesse no gel, já que a banda inferior teria tamanho aproximado de 150pb. É possível observar a banda superior quando pMirPDI é digerido com a enzima NotI (Figura 10d). Na digestão com a enzima EcoRI esperávamos uma banda de tamanho 1199pb e outra superior com aproximadamente 5kb, o que também pode ser observado na Figura 10b quando pMirPDI é digerido por esta enzima. Quanto ao corte simultâneo com EcoRI e NotI, esperávamos uma banda de 1199pb (1808pb – 1609pb, sítios para EcoRI), outra banda de 1079pb (1609pb – 530pb, sítio para EcoRI do vetor e NotI inserido nos oligos, respectivamente) e a banda superior com aproximadamente 4.2kb. Nesta digestão dupla, tanto a banda superior quanto as duas bandas menores são facilmente verificadas no gel (Figura 10d, banda inferiores indicadas pela seta azul) e podem ser bem definidas pela posição da banda de 1kb do padrão molecular (Figura 10d, seta laranja).

Antes do ensaio funcional testamos diferentes concentrações de plasmídeo e de componentes do kit de transfecção para avaliar a viabilidade celular. Seguindo as recomendações do kit Effectene Transfection Reagent (Qiagen), testamos as concentrações 0,5µg/mL, 1µg/mL, e 2µg/mL de plasmídeo em três proporções de Effectene, 1:10, 1:25 e 1:50. Fizemos uma avaliação qualitativa da morfologia de células HEK293 em comparação com o grupo não tratado e percebemos que as maiores proporções de Effectene deixaram as células com morfologia alterada e com descolamento da placa. Escolhemos então a concentração intermediária de plasmídeo, que é a mais utilizada, e a menor proporção de Effectene para os testes. Em seguida avaliamos 3 diferentes concentrações de miméticos de miR-230-3p (ThermoScientific), sendo elas 10nM, 17,5nM e 25 nM, de acordo com as recomendações do kit HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen). A qualidade da transfecção pode variar dependendo do tipo de células utilizadas e, normalmente, concentrações acima de 25nM elevam os níveis dessas moléculas muito acima do nível celular, podendo causar saturação da maquinaria de processamento¹¹⁶. Como pode ser visto na Figura 11a, não há diferença entre as concentrações de 10nM e 17,5nM e também não há diferença estatística entre elas e o grupo controle. Na concentração de 25nM, apesar de não haver diferença

estatística, observamos um aparente aumento de expressão de luciferase, o que é o oposto do que esperávamos, sugerindo, portanto, que este pode ser um efeito advindo da alta concentração de mimético utilizada. Tendo estes dados em vista, como não observamos diferenças entre as concentrações mais baixas, e a concentração mais alta parece tóxica, selecionamos 10nM para os testes, pois é a concentração recomendada pelo kit.

Com o protocolo estabelecido, células HEK293 foram pipetadas em placas de 96 poços, em meio DMEM e após 24 horas foram transfectadas com os vetores pMirPDI ou pMirPDI mut, além do vetor pRL-SV40 (que expressa Renilla luciferase) na presença ou ausência do mimético do miR-230-3p. Servindo como controle, foi utilizado o mimético do miR-85-3p, outro miRNA de *C. elegans* que não se liga a *pdi-2* ou a genes humanos. Após 24 horas da transfecção, o meio foi substituído para retirar os componentes dos kits utilizados. Após outras 24 horas as células foram lavadas com PBS e em seguida foi feita a leitura para captação da luminescência de Firefly Luciferase e Renilla Luciferase com a utilização do kit Dual-Glo® Luciferase Assay (Promega).

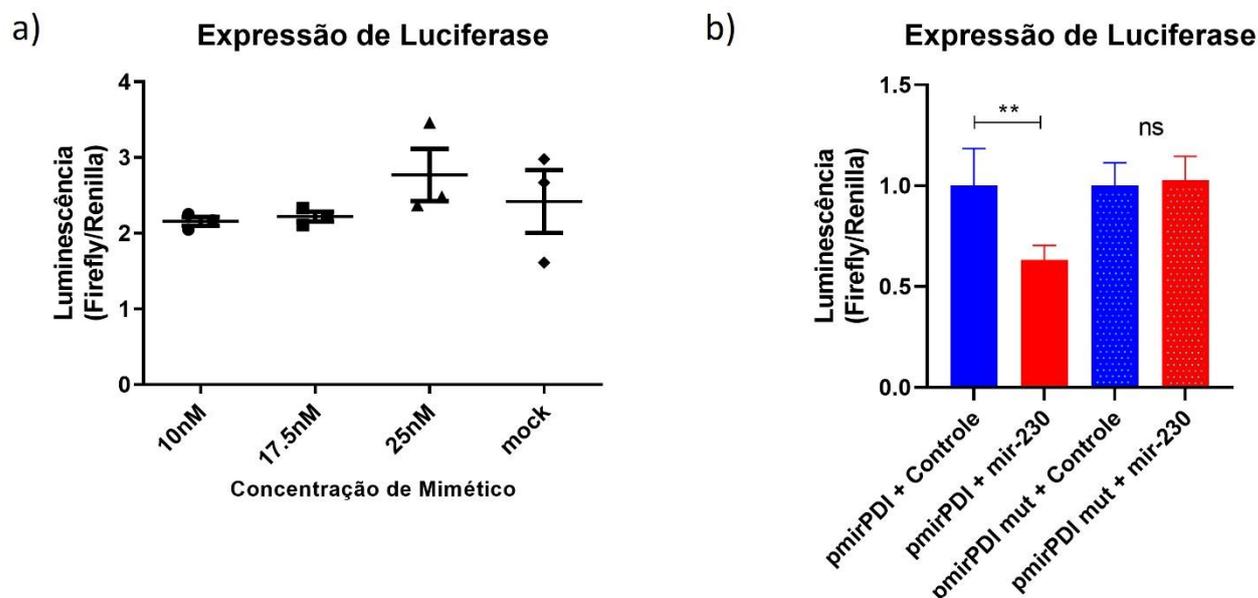


Figura 11 | Expressão de luciferase e sua regulação pelo miR-230-3p. (a) Expressão de luciferase pelo vetor pmir-Report clonado com o sítio de ligação de miR-230-3p e *pdi-2*. Teste com diferentes concentrações de mimético. (b) Expressão de luciferase pelo vetor pmir-Report clonado com os sítios de ligação de miR-230-3p e *pdi-2* e este mesmo sítio mutado. Experimento feito em triplicata. Teste t-Student. ** representa $p = 0,0011$.

Corroborando nossa hipótese de que o miR-230-3p regula o gene *pdi-2*, é possível observar na Figura 11b que na presença do mimético do miRNA a expressão de luciferase é diminuída em quase 50% (comparar barras azul e vermelha). Porém, na presença do vetor clonado com o sítio de ligação mutado não se observa diferença (comparar barras azul e vermelha pontilhadas). Isto mostra que este miRNA alveja *pdi2* e que esta regulação é dependente do sítio de ligação para miRNAs.

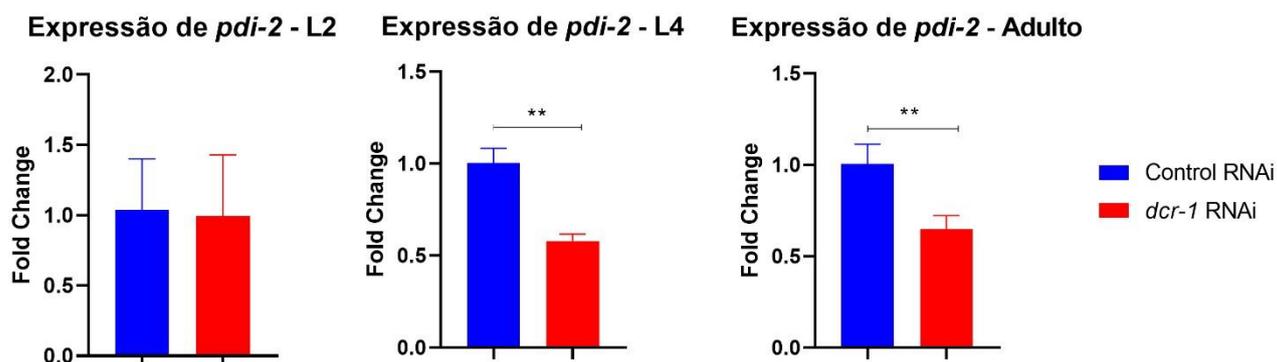


Figura 12 | Avaliação da expressão de *pdi-2* por PCR quantitativo em vermes selvagens após silenciamento de Dicer.

Expressão de *pdi-2* nos estágios larvais L2 e L4 e no verme Adulto. Teste t-Student. ** representam $p < 0,05$.

Porém, uma pergunta que se manteve é quando esta regulação acontece no contexto fisiológico, já que nossa hipótese se baseia justamente na regulação positiva de expressão de *pdi-2* quando há silenciamento de Dicer, vista no RNAseq. Como a regulação de genes por miRNA pode ser limitada a uma fase muito curta da vida dos vermes⁸³, medimos a expressão de *pdi-2* por meio de PCR quantitativo em diferentes etapas da vida do verme com o objetivo de tentar observar essa possível regulação. Escolhemos dois estágios larvais, sendo eles L2 e L4, e o estágio Jovem Adulto, quando os vermes acabam de entrar na fase adulta. Como observado na Figura 12, em um contexto de silenciamento de Dicer não há diferença na expressão de *pdi-2* no estágio L2, e este gene aparece diminuído nos estágios L4 e Jovem Adulto, diferentemente do que esperávamos. Como é clara a interação de *pdi-2* na regulação do tempo de vida e é também claro o efeito de silenciamento deste gene pelo miR-230-3p, provavelmente não encontramos o ponto exato da vida dos nematoides onde esta regulação acontece.

6. DISCUSSÃO

Estamos vivendo um momento de grande preocupação no que diz respeito às possíveis consequências do aumento da prevalência de doenças relacionadas ao envelhecimento em uma realidade em que o aumento da expectativa de vida mundial não significa uma velhice saudável. Encontrar mecanismos para remediar os problemas intrínsecos da velhice não é só prioridade por trazer mais qualidade de vida aos indivíduos, mas também uma obrigação social devido ao impacto financeiro que o descuido destas necessidades nos levaria. É, portanto, de fundamental importância tentarmos entender cada vez mais os mecanismos por trás dos processos que nos fazem envelhecer, na busca por minorar tanto o impacto individual quanto o impacto social.

Muitas vias de controle de regulação de estresse acabam por apresentar falhas na velhice e eventos estocásticos de erro que normalmente seriam remediados por estes mecanismos de regulação acabam acumulando, levando o organismo a um estado de difícil reversão e, em última análise, à morte. A via de resposta a proteínas mal enoveladas, UPR, é um destes casos. Proteínas envolvidas neste mecanismo, como as PDIs, têm papel fundamental na atividade protetora que esta via exerce, mas mesmo tendo papel na manutenção da proteostase celular, elas podem apresentar funções contraditórias em determinados contextos metabólicos. As PDIs estão, por exemplo, altamente expressas em uma multiplicidade de tipos de câncer como de pulmão, cérebro, ovário, dentre outros^{53,64,117,118}. O papel desta expressão positiva nos quadros tumorais é algo que ainda precisa ser investigado, no entanto, melhor é o prognóstico quanto menor é a expressão delas^{119,120}. Adicionalmente, muitos quimioterápicos testados recentemente são moléculas com função de inibir a expressão de PDIs^{121,122}. O ácido propiônico talvez seja uma das mais conhecidas destas moléculas, por inibir irreversivelmente PDI e ter efeito antitumoral em humanos, mas na realidade há uma gama de tipos de compostos com o mesmo efeito inibitório como estrogênios, polifenóis, antibióticos, etc¹²³⁻¹²⁶. E este não é o único contexto em que o aumento da expressão de PDIs parece ter papel deletério para o organismo, já que muitos quadros de trombose apresentam as mesmas características, e flavonoides,

como a quercetina, estão sendo testados para o tratamento desta doença por meio da inibição de PDIs^{126–128}.

De maneira geral, o silenciamento de Dicer parece ser outro contexto em que a expressão de PDI traz maior susceptibilidade aos efeitos deletérios, diminuindo o tempo de vida. Neste ponto é importante notarmos que o mecanismo de regulação de *pdi-2* por miRNAs, como mostramos na Figura 11b, aparece não só como um possível meio pelo qual estas enzimas sofrem regulação em diferentes doenças, mas também como um possível alvo terapêutico para doenças que envolvam a atividade de PDIs aumentada. Entretanto, o gene *mir-230* não é conservado em humanos. A avaliação da 3'UTR endógena das diversas PDIs humanas mostra que, diferente das PDIs de *C. elegans*, muito poucas delas são alvejadas por miRNAs. No entanto, de acordo com o TargetScan Human, a PDIA4 tem sítios de ligação para uma grande família de miRNAs conservada em mamíferos, a família do *mir-378*. Apesar da ausência de informações na literatura sobre a ligação destes miRNAs com PDIA4, há inúmeras evidências mostrando o miR-378 como inibidor de alguns tipos de câncer^{129,130}, o que sugere que este pode ser um mecanismo conservado através da função, não de *mir-230*, mas de outros miRNAs. Estes, no entanto, são aspectos que precisam ser explorados mais detalhadamente por trabalhos futuros. Nossos dados mostram que há diminuição de 50% de um constructo reporter da 3'UTR de *pdi-2* na presença do mimético do miR230-3p, o que sugere o alvejamento da 3'UTR de *pdi-2* por este miRNA. Vale mencionar que, na clonagem, apenas um sítio de ligação para este miRNA foi inserido, ainda que a 3'UTR de *pdi-2* apresente dois destes sítios. É possível, portanto, que a regulação seja ainda mais forte na 3'UTR endógena, representando um mecanismo importante de regulação de PDIs. Neste caso, caso haja conservação deste mecanismo em humanos via regulação de PDIs por outros miRNAs, a utilização de miméticos desses miRNAs para o tratamento de alguns tipos de câncer ou de trombose se torna algo muito plausível.

Diferente do que se poderia imaginar, a expressão de PDI não parece estar aumentada por regulação endógena nos vários períodos analisados da vida do verme. Na verdade, este não é um fenômeno incomum, já que muitos miRNAs, como os clássicos *lin-4* e *let-7*, têm pontos de regulação temporal muito específicos. Em relação

à *lin-4*, esta fase de regulação é muito pequena, abarcando apenas algumas horas entre os estágios larvais L1 e L2⁸³. Para *let-7* este período é limitado ao final da fase L4¹⁰⁷, tendo também pouca horas de efetividade, o que torna este mecanismo muito difícil de enxergar sem a medição precisa de variados pontos na vida do nematoide. Outro ponto importante de ser mencionado é que o RNAseq que mostra a expressão aumentada de *pdi-2* em vermes adultos foi realizado com vermes inférteis. A ausência de ovos e linhagem germinativa nestes nematoides pode facilitar a observação de diferenças de expressão gênica na linhagem somática do adulto. É importante, portanto, medir também a expressão deste gene em vermes selvagens em um período em que já não haja mais ovos, ou com a inibição da produção de ovos, para saber se este é um fator confundidor. De qualquer maneira, ainda é necessária uma análise mais precisa deste fenômeno, talvez com a utilização de RNAseq e considerando múltiplos *timepoints* separados por poucas horas para aumentar a chance de encontrar essa janela de regulação.

Um fato interessante é haver aumento na expressão de *pdi-2* quando há silenciamento de Dicer, enquanto *hsp-4*, também importante para a resposta da UPR^{er}, aparece não alterado (Figura 3d). Baseando-se em *hsp-4*, a UPR^{er} parece não estar induzida, apesar da expressão aumentada de *pdi-2* e da alteração de processamento de vários miRNAs que alvejam componentes da UPR^{er}, como citado na introdução. No entanto, o RNAseq mostra também que, além do aumento de expressão de *pdi-2*, há expressão aumentada de *hsp-3* (*dado do RNAseq*), outra proteína GPR78 da mesma família de *hsp-4*. Isto pode ser explicado pelo fato de que os diferentes componentes de UPR^{er} parecem ter papéis independentes e muitas vezes compensatórios, sendo que o aumento de expressão de *hsp-4* compensa a diminuição da expressão de *hsp-3* e vice-versa¹³¹. É, então, provável, que a perda de função de miRNAs seja um gatilho para proteotoxicidade, já que há perda de supressão pós-transcricional, e este gatilho ativa UPR^{er}, apesar de não ativar especificamente *hsp-4*. Uma possibilidade adicional é que *pdi-2* seja inicialmente regulada como forma de proteger a célula do agravo causado pelo silenciamento de Dicer, porém, a partir de certo ponto, a ausência de regulação causada principalmente pela falta do seu repressor, o miR-230-3p, faz com a resposta seja exacerbada e tenhamos não mais um efeito benéfico da ativação de UPR^{er}, mas deletério, como mostrado na Figura 9b. No entanto, esta hipótese precisa

ser testada. Estes e outros pontos podem ser melhor avaliados em vermes com superexpressão de *pdi-2*, para se testar com mais precisão a função desta enzima no contexto de silenciamento de Dicer.

Dicer parece ser necessária para a manutenção do tempo de vida normal e para o efeito de aumento no tempo de vida proporcionado por várias intervenções. Isto poderia ser causado apenas pelo fato de o verme, na ausência de Dicer, ser tão doente que nenhuma intervenção poderia reverter tal fenótipo. Mas, pelo contrário, alguns tipos de intervenções, como o resgate da expressão do miRNA *lin-4* e mutação no receptor de insulina/IGF-1, reverterem totalmente o fenótipo ou são muito pouco afetados pelo silenciamento de Dicer, respectivamente^{80,101}. Por outro lado, mutantes ou intervenções que afetam a função mitocondrial e mecanismos redox apresentam maior suscetibilidade aos efeitos deste silenciamento (Figura 1 e Figura 5). No entanto, apesar deste efeito, os nossos dados também sugerem que aumento agentes pró-oxidantes não são os únicos fatores envolvidos na diminuição do tempo de vida como consequência da perda de função de Dicer. Hoje já é bem clara na literatura a função celular de sistemas antiestresse de desbalanço redox, como a sinalização via *skn1/Nrf2*, e dos sistemas de controle proteico, como a UPR^{er}. No entanto, muito pouco se sabe sobre como estes sistemas interagem¹³². Dados da literatura sugerem que a via de *skn-1/Nrf2* regula diversos componentes da resposta de UPR^{er}, como *hsp-3*, *hsp-4* e *pdi-2*¹³³. O fato de observarmos ativação de componentes da resposta ao estresse oxidativo, como *sod-3* e *gst-4*, que é alvo de *skn-1/Nrf2* (Figuras 3a e 3b), assim como aumento da expressão de *pdi-2*, ajudam a fortalecer esta interação, mas suscita dúvidas sobre como esses genes são co-regulados. Fica também a pergunta de como é a interação entre a UPR^{er} e as intervenções ou mutações ligadas a alterações redox, como *isp-1* e *nuo-6*, que têm clara relação com UPR^{mit}, mas carece de informações quanto à sua relação com o retículo endoplasmático.

O fato de haver redução do estresse no tratamento com NAC e não com vitamina C nos indica que possivelmente o estresse proteico tenha maior efeito tóxico do que o estresse oxidativo. NAC é amplamente conhecido por seu efeito antioxidante como precursor de glutathiona reduzida (GSH), mas outro efeito importante mas menos difundido é o poder de quebra de pontes dissulfeto¹³⁴. Um dos grandes problemas

celulares advindos da falta de enovelamento proteico é a agregação de proteínas mal enoveladas, levando a formação de extensos agregados que têm efeito tóxico e estão altamente relacionados com múltiplos tipos de doenças ligadas ao envelhecimento¹³⁵⁻¹³⁷. NAC, por apresentar grupos tiol expostos e aptos a interagir com pontes dissulfeto não nativas, tem a capacidade de desfazer estas ligações, reduzindo parcialmente os aglomerados e o estresse celular^{135,138}. Nossos dados, portanto, podem explicar a correlação entre o declínio na expressão de Dicer com o envelhecimento e o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento que tem como causa principal a formação de aglomerados proteicos como Alzheimer's e Huntington's. A falta de processamento de miRNAs com o envelhecimento pode ser fator determinante para o aparecimento deste tipo de doença¹³⁹. Esta é uma ideia que vem emergindo recentemente na literatura e tende a se estabelecer com mais força se dados como os mostrados neste trabalho se revelarem robustos e determinantes para o mecanismo de gênese destas doenças.

7. CONCLUSÃO

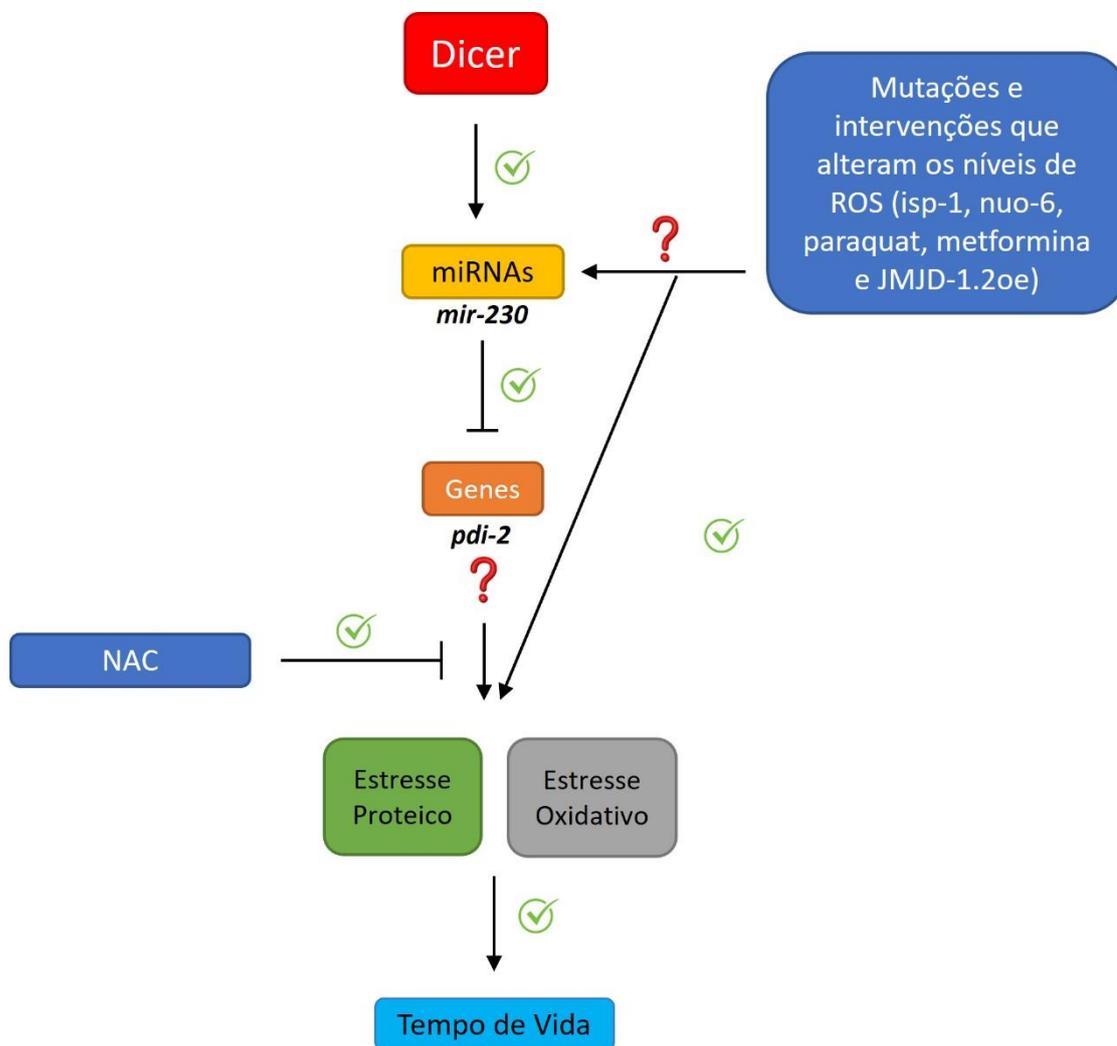


Figura 13 – Esquema representado as informações que temos até o momento sobre os efeitos de Dicer sobre a regulação do tempo de vida em vermes. Marcados em verde, as *check marks* indicam os pontos da via em que já se tem, profunda ou superficialmente, informações sobre as relações indicadas. Estas marcações se referem tanto a informações obtidas neste projeto quanto na literatura científica. Indicados com o símbolo de interrogação em vermelho estão os pontos onde outros miRNAs ou genes podem estar envolvidos.

Nesta tese apresentamos um conjunto de dados que nos indicam o importante papel de Dicer e de miRNAs para o controle do estresse oxidativo, do estresse proteico, além da dependência desta via para os efeitos benéficos de intervenções que aumentam o tempo de vida em *C. elegans* (Figura 13). A demonstração do mecanismo de regulação das PDIs por miRNAs abre margem para diversas perguntas e traz a possibilidade de se encontrar alvos terapêuticos para uma série de doenças onde elas estão envolvidas. Muito provavelmente não são apenas *pdi-2* e miR-230 os agentes

responsáveis pelos fenômenos observados neste trabalho, havendo a possibilidade de se encontrar outros destes coadjuvantes (Figura 13, pontos onde há interrogações). Estas e outras hipóteses precisam ser testadas, mas de maneira geral enxergamos um quadro em que o silenciamento de Dicer durante a fase de desenvolvimento leva a perda de processamento de miRNAs e em que genes regulados por estes miRNAs se apresentam desregulados, sendo assim causadores dos efeitos deletérios observados. Atores importantes neste quadro são *pdi-2* e *mir-230*, que controlam o estado redox e o estresse desencadeado por proteínas mal enoveladas e a via de UPR^{er}.

8. REFERÊNCIAS

1. World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240051157>.
2. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, P. D. World Population Ageing 2013. *World Popul. Ageing 2013* 114 (2013) doi:ST/ESA/SER.A/348.
3. Pearl, R. The Rate of Living. *Johns Hopkins Univ.* (1928).
4. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
5. Harman, D. Free radical theory of aging: Consequences of mitochondrial aging. *Age (Omaha)*. **6**, 86–94 (1983).
6. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* **464**, 504–512 (2010).
7. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461–4 (1993).
8. Friedman, D. B. & Johnson, T. E. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118**, 75–86 (1988).
9. Fontana, L. & Partridge, L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell* **161**, 106–118 (2015).
10. Fontana, L., Partridge, L. & Longo, V. D. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* **328**, 321–6 (2010).
11. Mattison, J. A. *et al.* Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat. Commun.* **8**, 14063 (2017).
12. Selman, C. *et al.* Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J.* **22**, 807–818 (2008).
13. Suh, Y. *et al.* Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3438–42 (2008).
14. Tazearslan, C., Huang, J., Barzilai, N. & Suh, Y. Impaired IGF1R signaling in cells expressing longevity-associated human IGF1R alleles. *Aging Cell* **10**, 551–554 (2011).
15. Pawlikowska, L. *et al.* Association of common genetic variation in the insulin/IGF1 signaling pathway with human longevity. *Aging Cell* **8**, 460–472 (2009).
16. Masoro, E. J. & Austad, S. N. *Handbook of the biology of aging.* (Academic Press, 2011).
17. Greer, E. L. & Brunet, A. Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*. *Aging Cell* **8**, 113–127 (2009).
18. Greer, E. L. *et al.* An AMPK-FOXO Pathway Mediates Longevity Induced by a Novel Method of Dietary Restriction in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **17**, 1646–1656 (2007).
19. Yun, J. & Finkel, T. Mitohormesis. *Cell Metab.* **19**, 757–766 (2014).
20. Lee, S. S. *et al.* A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* **33**, 40–48 (2002).
21. Felkai, S. *et al.* CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **18**, 1783–1792 (1999).

22. Wong, A., Boutis, P. & Hekimi, S. Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* **139**, 1247–1259 (1995).
23. Dillin, A. *et al.* Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development. *Science* (80-.). **298**, 2398–2401 (2002).
24. Yang, W. *et al.* A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* **8**, e1000556 (2010).
25. Onken, B. & Driscoll, M. Metformin Induces a Dietary Restriction – Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans*. *PLoS One* **5**, 8758 (2010).
26. Martin-Montalvo, A. *et al.* Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* **4**, 2192 (2013).
27. Schulz, T. J. *et al.* Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metab.* **6**, 280–293 (2007).
28. Van-Raamsdonk, J., Hekimi, S., Van Raamsdonk, J. M. & Hekimi, S. Reactive oxygen species and aging in *Caenorhabditis elegans*: causal or casual relationship? *Antioxid Redox Signal* **13**, 1911–1953 (2010).
29. Van Raamsdonk, J. M. & Hekimi, S. Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5785–5790 (2012).
30. Lee, S. J., Hwang, A. B. & Kenyon, C. Inhibition of respiration extends *C. elegans*' lifespan via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr. Biol.* **20**, 2131 (2010).
31. Wei, Y. & Kenyon, C. Roles for ROS and hydrogen sulfide in the longevity response to germline loss in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E2832–E2841 (2016).
32. Ristow, M. *et al.* Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 8665–8670 (2009).
33. Ristow, M. & Schmeisser, S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 327–336 (2011).
34. E, L. *et al.* Effects of Long-term Vitamin E Supplementation on Cardiovascular Events and Cancer. *JAMA* **293**, 1338 (2005).
35. Da Cunha Fernanda, M. *et al.* Mitochondrial form, function and signalling in aging. *Biochem. J.* **473**, 3421–3449 (2016).
36. Jovaisaite, V., Mouchiroud, L. & Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J. Exp. Biol.* **217**, 137 (2014).
37. Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
38. Houtkooper, R. H. *et al.* Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* **497**, 451–457 (2013).
39. Durieux, J., Wolff, S. & Dillin, A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* **144**, 79–91 (2011).

40. Merkwirth, C. *et al.* Two Conserved Histone Demethylases Regulate Mitochondrial Stress-Induced Longevity. *Cell* **165**, 1209–1223 (2016).
41. Cox, J. S. & Walter, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391–404 (1996).
42. Higuchi-Sanabria, R., Frankino, P. A., Paul, J. W., Tronnes, S. U. & Dillin, A. A Futile Battle? Protein Quality Control and the Stress of Aging. *Dev. Cell* **44**, 139–163 (2018).
43. Metcalf, M. G., Higuchi-Sanabria, R., Garcia, G., Kimberly Tsui, C. & Dillin, A. Beyond the cell factory: Homeostatic regulation of and by the UPRER. *Sci. Adv.* **6**, (2020).
44. Nuss, J. E., Choksi, K. B., DeFord, J. H. & Papaconstantinou, J. Decreased enzyme activities of chaperones PDI and BiP in aged mouse livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 355–361 (2008).
45. Henis-Korenblit, S. *et al.* Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 9730–9735 (2010).
46. Chen, D., Thomas, E. L. & Kapahi, P. HIF-1 Modulates Dietary Restriction-Mediated Lifespan Extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genet.* **5**, e1000486 (2009).
47. Taylor, R. C. & Dillin, A. XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell* **153**, 1435 (2013).
48. Taylor, R. C. & Dillin, A. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–17 (2011).
49. Saxena, S., Cabuy, E. & Caroni, P. A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat. Neurosci.* **12**, 627–636 (2009).
50. Thomas, P. J., Qu, B. H. & Pedersen, P. L. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456–459 (1995).
51. Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 385–407 (1997).
52. Koo, E. H., Lansbury, J. & Kelly, J. W. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9989–9990 (1999).
53. Benham, A. M. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 781–789 (2012).
54. Hatahet, F. & Ruddock, L. W. Protein disulfide isomerase: A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxidants Redox Signal.* **11**, 2807–2850 (2009).
55. Wang, L., Wang, X. & Wang, C. C. Protein disulfide-isomerase, a folding catalyst and a redox-regulated chaperone. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, 305–313 (2015).
56. Koivu, J. & Myllylä, R. Protein Disulfide-Isomerase Retains Procollagen Prolyl 4-Hydroxylase Structure in Its Native Conformation. *Biochemistry* **25**, 5982–5986 (1986).
57. Janiszewski, M. *et al.* Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 40813–40819 (2005).

58. Wilkinson, B. & Gilbert, H. F. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1699**, 35–44 (2004).
59. Matsusaki, M. *et al.* The Protein Disulfide Isomerase Family: from proteostasis to pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1864**, 129338 (2020).
60. Winter, A. D., McCormack, G. & Page, A. P. Protein disulfide isomerase activity is essential for viability and extracellular matrix formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **308**, 449–461 (2007).
61. Melo, S. *et al.* Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4394–9 (2011).
62. Winter, A. D. & Page, A. P. Prolyl 4-hydroxylase is an essential procollagen-modifying enzyme required for exoskeleton formation and the maintenance of body shape in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4084–4093 (2000).
63. Hetz, C., Chevet, E. & Oakes, S. A. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat. Cell Biol.* **17**, 829–838 (2015).
64. Eletto, D., Eletto, D., Dersh, D., Gidalevitz, T. & Argon, Y. Protein disulfide isomerase A6 controls the decay of IRE1 α signaling via disulfide-dependent association. *Mol. Cell* **53**, 562–576 (2014).
65. Higa, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6 α requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1839–1849 (2014).
66. Eletto, D., Eletto, D., Boyle, S. & Argon, Y. PDIA6 regulates insulin secretion by selectively inhibiting the RIDD activity of IRE1. *FASEB J.* **30**, 653–665 (2016).
67. Mao, T. *et al.* PKA phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1 α to glucagon signaling in glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15852–15857 (2011).
68. Hourihan, J. M., Moronetti Mazzeo, L. E., Fernández-Cárdenas, L. P. & Blackwell, T. K. Cysteine Sulfenylation Directs IRE-1 to Activate the SKN-1/Nrf2 Antioxidant Response. *Mol. Cell* **63**, 553–566 (2016).
69. Karam, R. *et al.* The unfolded protein response is shaped by the NMD pathway. *EMBO Rep.* **16**, 599–609 (2015).
70. Carreras-Sureda, A. & Hetz, C. RNA metabolism: putting the brake on the UPR. *EMBO Rep.* **16**, 545–546 (2015).
71. Gardner, L. B. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3729–3741 (2008).
72. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–60 (2004).
73. Bartel, D. P. *MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions*. *Cell* vol. 136 215–233 (2009).

74. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
75. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–6 (2003).
76. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. & Hannon, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366 (2001).
77. Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* (2018) doi:10.1016/j.cell.2018.03.006.
78. Lee, R. C. & Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862–4 (2001).
79. Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T. & Jewell, D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **13**, 807–818 (2003).
80. Mori, M. A. *et al.* Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab.* **16**, 336–347 (2012).
81. Bethke, A., Fielenbach, N., Wang, Z., Mangelsdorf, D. J. & Antebi, A. Nuclear Hormone Receptor Regulation of MicroRNAs Controls Developmental Progression. *Science (80-.)*. **324**, 95–98 (2009).
82. Boehm, M. & Slack, F. A Developmental Timing MicroRNA and Its Target Regulate Life Span in *C. elegans*. *Science (80-.)*. **310**, (2005).
83. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
84. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
85. Inukai, S. & Slack, F. MicroRNAs and the Genetic Network in Aging. *J. Mol. Biol.* **425**, 3601–3608 (2013).
86. Reis G., F. *et al.* Fat-specific Dicer deficiency accelerates aging and mitigates several effects of dietary restriction in mice. *Aging (Albany, NY)*. **8**, 1201–1222 (2016).
87. Jadhav, V. *et al.* CHO microRNA engineering is growing up: Recent successes and future challenges. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1501 (2013).
88. Shimizu, S. *et al.* The *let-7* family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **52**, 698–704 (2010).
89. Lin, X. *et al.* Downregulation of Bcl-2 expression by miR-34a mediates palmitate-induced Min6 cells apoptosis. *J. Diabetes Res.* **2014**, (2014).
90. Geraldo, M. V., Yamashita, A. S. & Kimura, E. T. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene* **31**, 1910–1922 (2012).
91. Li, Z. *et al.* IGF1/IGF1R and microRNA *let-7e* down-regulate each other and modulate proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Cell Cycle* **17**, 1212 (2018).

92. Esau, C. *et al.* miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* **3**, 87–98 (2006).
93. Dávalos, A. *et al.* miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9232–9237 (2011).
94. Pinto, S. *et al.* Enoxacin extends lifespan of *C. elegans* by inhibiting miR-34-5p and promoting mitohormesis. (2018) doi:10.1016/j.redox.2018.06.006.
95. Caruso, P. *et al.* Identification of MicroRNA-124 as a Major Regulator of Enhanced Endothelial Cell Glycolysis in Pulmonary Arterial Hypertension via PTBP1 (Polypyrimidine Tract Binding Protein) and Pyruvate Kinase M2. *Circulation* **136**, 2451–2467 (2017).
96. Byrd, A. E., Aragon, I. V. & Brewer, J. W. MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. *J. Cell Biol.* **196**, 689 (2012).
97. Ahmadi, A., Khansarinejad, B., Hosseinkhani, S., Ghanei, M. & Mowla, S. J. miR-199a-5p and miR-495 target GRP78 within UPR pathway of lung cancer. *Gene* **620**, 15–22 (2017).
98. Ouyang, Y. B. *et al.* miR-181 regulates GRP78 and influences outcome from cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Neurobiol. Dis.* **45**, 555–563 (2012).
99. Su, S. F. *et al.* miR-30d, miR-181a and miR-199a-5p cooperatively suppress the endoplasmic reticulum chaperone and signaling regulator GRP78 in cancer. *Oncogene* **2013 3239** **32**, 4694–4701 (2012).
100. Guerra, B. A. *et al.* Dietary sulfur amino acid restriction upregulates DICER to confer beneficial effects. *Mol. Metab.* (2019) doi:10.1016/j.molmet.2019.08.017.
101. Volovik, Y. *et al.* Temporal requirements of heat shock factor-1 for longevity assurance. *Aging Cell* **11**, 491–499 (2012).
102. Kamath, R. S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A. G. & Ahringer, J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0002 (2001).
103. Ferraz, R. C. *et al.* IMPACT is a GCN2 inhibitor that limits lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol.* **14**, 87 (2016).
104. Mouchiroud, L. *et al.* The NAD⁺/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* **154**, 430–441 (2013).
105. Dobin, A. *et al.* STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (2013) doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
106. Tabara, H. *et al.* The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123–132 (1999).
107. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
108. Croll, N. A., Smith, J. M. & Zuckerman, B. M. The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture. *Exp. Aging Res.* **3**, 175–189 (1977).

109. Mouchiroud, L. *et al.* The NAD⁺/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* **154**, 430–441 (2013).
110. Papp, D., Csermely, P. & Soti, C. A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
111. Park, S. K., Tedesco, P. M. & Johnson, T. E. Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell* **8**, 258–269 (2009).
112. Zhang, Q. *et al.* The Mitochondrial Unfolded Protein Response Is Mediated Cell-Nonautonomously by Retromer-Dependent Wnt Signaling. *Cell* (2018) doi:10.1016/j.cell.2018.06.029.
113. Doniach, T. & Hodgkin, J. A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **106**, 223–235 (1984).
114. Xu, P. *et al.* A Systematic Way to Infer the Regulation Relations of miRNAs on Target Genes and Critical miRNAs in Cancers. *Front. Genet.* **11**, 278 (2020).
115. Zisoulis, D. G. *et al.* Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2010) doi:10.1038/nsmb.1745.
116. Jin, H. Y. *et al.* Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Front. Genet.* **6**, 340 (2015).
117. Goplen, D. *et al.* Protein Disulfide Isomerase Expression Is Related to the Invasive Properties of Malignant Glioma. *Cancer Res.* **66**, 9895–9902 (2006).
118. Xu, S., Sankar, S. & Neamati, N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov. Today* **19**, 222–240 (2014).
119. Hashida, T., Kotake, Y. & Ohta, S. Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J. Toxicol. Sci.* **36**, 1–7 (2011).
120. Thongwatchara, P. *et al.* Differential protein expression in primary breast cancer and matched axillary node metastasis. *Oncol. Rep.* **26**, 185–191 (2011).
121. Lee, E. & Lee, D. H. Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer. *BMB Rep.* **50**, 401–410 (2017).
122. Powell, L. E. & Foster, P. A. Protein disulphide isomerase inhibition as a potential cancer therapeutic strategy. *Cancer Med.* **10**, 2812–2825 (2021).
123. Xu, S. *et al.* Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16348–16353 (2012).
124. Badolato, M., Carullo, G., Aiello, F. & Garofalo, A. Synthesis and Experimental Validation of New PDI Inhibitors with Antiproliferative Activity. *J. Chem.* **2017**, (2017).
125. Lovat, P. E. *et al.* Increasing Melanoma Cell Death Using Inhibitors of Protein Disulfide Isomerases to Abrogate Survival Responses to Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Res.* **68**, 5363–5369 (2008).

126. Jasuja, R. *et al.* Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J. Clin. Invest.* **122**, 2104–2113 (2012).
127. Heindryckx, F. *et al.* Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE1 α -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing. *EMBO Mol. Med.* **8**, 729–744 (2016).
128. Bekendam, R. H. & Flaumenhaft, R. Inhibition of Protein Disulfide Isomerase in Thrombosis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **119 Suppl 3**, 42–48 (2016).
129. Castellani, G. *et al.* MiR-378a-3p Acts as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer Stem-Like Cells and Affects the Expression of MALAT1 and NEAT1 lncRNAs. *Front. Oncol.* **12**, 3027 (2022).
130. Zhang, G. jun, Zhou, H., Xiao, H. xu, Li, Y. & Zhou, T. MiR-378 is an independent prognostic factor and inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *BMC Cancer* **14**, 1–9 (2014).
131. Kapulkin, V., Hiester, B. G. & Link, C. D. Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*. *FEBS Lett.* (2005) doi:10.1016/j.febslet.2005.04.062.
132. Choe, K. P. & Leung, C. K. SKN-1/Nrf, A New Unfolded Protein Response Factor? *PLoS Genet.* **9**, (2013).
133. Glover-Cutter, K. M., Lin, S. & Blackwell, T. K. Integration of the Unfolded Protein and Oxidative Stress Responses through SKN-1/Nrf. *PLOS Genet.* **9**, e1003701 (2013).
134. Aldini, G. *et al.* N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564> **52**, 751–762 (2018).
135. Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. & Buchner, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology. (N. Y.)* **9**, 825–829 (1991).
136. March, D., Bianco, V. & Franzese, G. Protein Unfolding and Aggregation near a Hydrophobic Interface. *Polymers (Basel)*. **13**, 1–14 (2021).
137. Taylor, R. C. Aging and the UPR(ER). *Brain Res.* **1648**, 588–593 (2016).
138. Pedre, B., Barayeu, U., Ezeriņa, D. & Dick, T. P. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacol. Ther.* **228**, 107916 (2021).
139. Francisco, S. *et al.* The Role of MicroRNAs in Proteostasis Decline and Protein Aggregation during Brain and Skeletal Muscle Aging. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).

Anexo1



UNICAMP

Of. CIBio/IB 05/2016

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
16 de maio de 2016.

Prof. Dr. MARCELO MORI
Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual
Instituto de Biologia
UNICAMP

Prezado Professor:

Informamos que o projeto CIBio interferindo com o Envelhecimento por Meio da Via de Interferência por RNA, sob sua responsabilidade, envolvendo OGM do tipo I, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp para ser desenvolvido nas dependências do Laboratório de Biologia do Envelhecimento, DBBT/IB/UNICAMP e Biotério do Laboratório de Neurobiologia Molecular, Área de Genética e Evolução, DGEB/IB/UNICAMP, ambos Nível de Biossegurança 1, protocolado sob o número 2016/03:

Transcrição do parecer:

O projeto visa estudar o papel da via de RNAi no envelhecimento e em doenças metabólicas. Para isso usará 2 modelos de animais geneticamente modificados (*C. elegans* e camundongos) que superexpressam ou apresentam perda de função de componentes-chave da via de RNAi (como Dicer) para esclarecer se essas modificações são suficientes para alterar o tempo e a qualidade de vida dos animais.

Todos os OGMs e experimentos requerem apenas instalações laboratoriais de nível NB-1. O pessoal do laboratório já possui treinamento e serão supervisionados por cientistas com treinamento em biologia molecular e fisiologia animal. Há um Manual de Biossegurança disponível e todos os integrantes foram ou serão treinados para executar as técnicas e procedimentos dele constantes.

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

Informamos que toda documentação, assim como uma cópia desta aprovação deve estar impressa e assinada para futuras visitas/inspeções pela CIBio/IB-UNICAMP e pelos órgãos externos competentes.

Atenciosamente,

Atenciosamente,


Prof. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira
Presidente da CIBio
Instituto de Biologia – UNICAMP

Cópia: chefia DBBT, Profa. Dra. Sarah Arana

CIBio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13083-970 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 - e-mail: comisib@unicamp.br

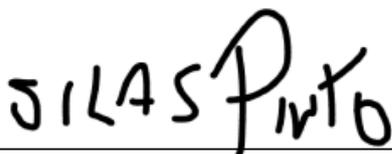
Anexo2

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ESTUDO DA FUNÇÃO DE DICER E MIRNAS NA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS E NO ENVELHECIMENTO DE NEMATÓIDES C. ELEGANS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 21/06/2023

Assinatura : _____



Nome do(a) autor(a): **Silas Pinto da Silva**

RG n.º 52.318.858-4

Assinatura : _____



Nome do(a) orientador(a): **Marcelo Alves da Silva Mori**

RG n.º 32684904