



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO RENAL DA ENZIMA
CONVERSORA DA ANGIOTENSINA POR MEIO DE UM
PEQUENO RNA INTERFERENTE REDUZ PRESSÃO
ARTERIAL SISTÊMICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Aluna: Aletheia Moraes Rocha

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Junho - 2006

UBERABA - MG

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

SUB-ÁREA: PATOLOGIA CLÍNICA

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Patologia
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Patologia.**

Aluna: Aletheia Moraes Rocha

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

UFTM – UBERABA – MG

R571d

Rocha, Aletheia Moraes.

Diminuição da expressão renal da enzima conversora de angiotensina por meio de um pequeno RNA interferente reduz pressão arterial sistêmica em ratos espontaneamente hipertensos / Aletheia Moraes Rocha. - - 2006.

93f.: tab.; graf.; fig.

Tese de mestrado em Patologia.

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva.

1. HIPERTENSÃO. 2. MICRORNA. 3. E.C.A. 4. TERAPIA GÊNICA. I. Título. II. Dias da Silva., Valdo José

NLM – WG340

ALETHEIA MORAES ROCHA

“DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO RENAL DA ENZIMA CONVERSORA DA ANGIOTENSINA POR MEIO DE UM PEQUENO RNA INTERFERENTE REDUZ PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia como parte das exigências para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Uberaba, junho de 2006.

Comissão Examinadora

VALDO JOSÉ DIAS DA SILVA
Titulação: Doutor em Fisiologia
Assinatura:
Instituição: Disciplina de Fisiologia – UFTM – Uberaba – MG.

EDUARDO BARBOSA COELHO
Titulação: Doutor em Medicina Clínica Médica
Assinatura:
Instituição: Departamento de Clínica Médica – FMRP/USP – Ribeirão Preto– SP.

LUIZ CARLOS DOS REIS
Titulação: Doutor em Fisiologia
Assinatura:
Instituição: Disciplina de Fisiologia – UFTM – Uberaba – MG.

DEDICATÓRIA

**A ti meu amado Marcus Paulo, dedico este
trabalho, meu amor e minha vida!**

Alma Gêmea de minha alma,
Flor de luz de minha vida,
Sublime estrela caída
das belezas da amplidão.
Quando eu vagava no mundo...
Triste e só, no meu caminho chegaste,
devagarzinho e encheste-me o coração.
Vinhas nas bênçãos dos deuses,
da divina claridade, tecer-me a felicidade
em sorrisos de esplendor!!
És meu tesouro infinito.
Juro-te eterna aliança.
Se eu sou tua esperança
Tu és todo o meu amor
Alma gêmea de minha alma...
Se eu te perder um dia,
Serei a escura agonia
Da claridade nos seus véus
Se um dia me abandonares...
Luz terna dos meus amores,
Hei de esperar-te, entre as flores
Junto aos anjos lá nos céus.

(Emmanuel / Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Esta tese de mestrado não teria sido possível sem a ajuda e apoio de muitos que comigo estiveram durante essa jornada. Nesta seção tenho a oportunidade de lhes fazer um pequeno agradecimento por escrito, demonstrando assim um pouco do sentimento de gratidão que nutro por elas.

Á Deus, pela bênção da vida e aprendizado eternos, pela permissão de realizar um grande sonho e pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

Ao meu grande amor... Marcus Paulo pelo amor incondicional, pela dedicação, compreensão e companheirismo; a você que foi por mim eleito meu co-orientador o meu eterno agradecimento, sem sua ajuda eu jamais teria chegado até aqui. Você é a motivação e a força para a conclusão desta tese; você é o porto que me abrigou nos dias de tempestade e o vento que me levou ao fim do percurso nos dias de sol; você é tudo e muito mais. Jamais terei palavras para te agradecer e é contigo que compartilho mais essa conquista em minha vida.

Agradeço ao meu orientador Valdo José Dias da Silva, um profundo sentimento de gratidão por ter acreditado em mim, aceitando o convite para a orientação deste trabalho. Pela dedicação, apoio, incentivo e disponibilidade, pela sábia orientação e ajuda na elaboração desta tese. Enfim, a todas as qualidades desse profissional que me serviram como exemplo de um pesquisador incansável e plenamente empenhado em seu trabalho. Valdo você sempre será um exemplo de virtude e determinação a ser seguido.

Aos meus pais, Irany e Maria Abadia, a minha eterna gratidão por todo o amor e dedicação. Foi graças a todo o apoio que vocês dedicaram a mim que tive a oportunidade de estudar e de concluir mais esta etapa. É também por vocês que sinto a maior alegria ao concluir esta tese, podendo retribuir um pouco do imenso

orgulho sinto de vocês. Aos meus irmãos Tatiana por sua sabedoria, Ariane por sua doçura e Rafael pelo bom humor. Aos meus cunhados Giovani e José Antônio que sempre torcem por mim.

Àqueles que são minha segunda família Dr. Magnus (paizinho), Dinalva (mãe Dina), Íris, vô Alcides, Júnior e Andreza, Maikel e Fabíola, a minha eterna gratidão por todo o apoio e carinho que dedicam a mim. Vocês que me ajudaram quando eu mais precisei e que me acolheram no seio da vossa família como um de vós, saibam que sempre estarão em meu coração.

Luiz Carlos e Edison: professores, amigos e incentivadores.

Obrigada ao amigo Marco Aurélio por me incentivar a ampliar meus conhecimentos e interceder a meu favor, foi graças a você que trilhei meu primeiro passo e serei eternamente grata a você por isso.

Esta tese foi desenvolvida com a cooperação de minha querida amiga Thaís, cujo apoio e dedicação foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Obrigado a todos os amigos de laboratório: Octávio, Vanessa, Marília, Karime, Patrícia, Ricardo, Ana Paula, Lurdinha, Booker, Carlos Henrique, Washington e Elizabete, Débora e Daniel. Um obrigado também aos funcionários da disciplina de fisiologia: Ana, Margareth, Donizetti, Izabel e Glauco por toda a ajuda prestada ao longo desta jornada.

Um especial agradecimento a Thiago C. Pereira e aos professores Iscia Lopes-Cendes e Kleber G. Franchini da Universidade de Campinas (UNICAMP) e seus respectivos Departamentos de Genética e Clínica Médica por terem provido e processado o material de que necessitei. Agradeço a CAPES pelo financiamento da minha dissertação de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

"Não há garantia de que o universo se resigna às nossas predisposições. Mas não vejo como poderemos tratar com o universo - tanto o universo exterior como o interior - sem estudá-lo. A melhor maneira de evitar abusos é que a população em geral seja cientificamente educada, para compreender as implicações de tais investigações. Em troca da liberdade de investigação, os cientistas estão obrigados a explicar seus trabalhos. Se a ciência é considerada um sacerdócio fechado, muito difícil e elitista para a compreensão da pessoa média, os perigos de abuso são maiores. Mas se a ciência é um tópico de interesse e preocupação geral - se tanto suas coisas boas como suas conseqüências sociais forem discutidas regular e competentemente nas escolas, na imprensa, e nas mesas familiares - teremos aumentado enormemente nossas possibilidades de entender como é realmente o mundo, e como melhorar a ele e a nós mesmos."

(Carl Sagan)

SUMÁRIO

Dedicatória	IV
Agradecimentos	VI
Epígrafe	X
Sumário	XI
Resumo	XIV
Abstract	XVII
Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas	XX
Lista de Tabelas	XXVI
Lista de Figuras	XXVIII
1. Introdução	01
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Plataforma Para Desenho do siRNA	14
3.1.1. Localização no RNA alvo	15
3.1.2. Polimorfismos	15
3.1.3. Formato das moléculas	15
3.1.4. Atividade do oligonucleotídeo guia	16
3.1.5. Estrutura secundárias dos oligonucleotídeos	16
3.1.6. Conteúdo de GC	16
3.1.7. Extremidade 3' overhang	16
3.1.8. Especificidade	16
3.1.9. Identificação do alvo	17
3.1.10. Características do siRNA dirigido contra o RNAm da ECA do rato	17

3.1.11. Síntese do siRNA	17
3. 2. Animais e Cirurgia	18
3. 3. Protocolo Experimental	18
3. 4. Análise dos dados cardiovasculares	20
3. 5. “Western Blot”	21
3. 6. RT-PCR	23
3. 7. Análise Estatística	23
4. Resultados	25
5. Discussão	35
6. Conclusões	48
7. Bibliografia	50

RESUMO

No presente estudo avaliamos o efeito de uma pequena molécula de RNA com seqüência específica para silenciar a expressão do gene da enzima conversora da angiotensina (ECA) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Para tal, 19 animais SHR machos com 16 semanas de idade foram submetidos sob anestesia a canulação de artéria e veia femorais para registro crônico da PA e administração de drogas respectivamente. Após registro basal da PAM e FC em sistema computadorizado, 09 animais receberam por via endovenosa RNA interferente para o gene da ECA (grupo RNAi-ECA, dose de 150ug/Kg) e os outros 10 animais receberam RNA interferente para um gene não expresso em mamíferos (RNA para o gene da proteína fluorescente verde – eGFP, dose de 150ug/Kg) os quais constituíram o grupo controle. A seguir, a cada 12 horas pelos próximos 04 dias, registros contínuos de PA direta por 30 minutos foram efetuados em ambiente quieto e controlados. Ao final do quarto dia, após o último registro da PA e quantificação da resposta pressora a angiotensina I (100 ng/Kg, i.v., bolus), todos os animais foram eutanasiados e os pulmões e rins foram extraídos e submetidos à análise de “Western Blot” e de RT-PCR para verificar o grau de expressão da ECA tecidual. Os valores basais de PAM e FC prévios ao tratamento não diferiram entre os grupos (182±3 mmHg e 366±10 bpm no grupo RNAi-ECA e 172±4 mmHg e 356±16 bpm no grupo controle, respectivamente, p=ns). Os valores de PAM permaneceram semelhantes nos dois grupos até a metade do segundo dia de registro, após o que iniciaram queda progressiva nos animais RNAi-ECA atingindo os valores mais baixo no quarto dia de seguimento (136±8 mmHg versus 167±4 mmHg no grupo controle, p<0,02). Os valores de FC bem como a resposta pressora à angiotensina I não diferiram entre os grupos. Análise de Western-blot em tecidos revelou uma redução de 52,9% na expressão da ECA nos rins dos animais tratados em comparação com

o controle, sem modificação no nível de expressão da ECA pulmonar. A expressão de RNAm para a ECA nos rins dos animais tratados, avaliada por RT-PCR, não foi significativamente diferente daquela observada nos rins de animais controles.

Esses dados sugerem que um pequeno RNA específico para o gene da ECA, administrado intravenosamente, pode atuar in vivo atenuando de forma tecido-seletiva a expressão da ECA, com grande repercussão sobre a pressão arterial sistêmica. A redução da expressão da proteína sem modificação significativa do RNA mensageiro sugere que o pequeno RNA administrado pode estar exercendo um efeito de microRNA, bloqueando a tradução do RNA mensageiro da ECA em proteína. Tal achado sugere uma potencial aplicação de pequenos RNAs interferentes ou microRNAs como uma promissora estratégia terapêutica no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

ABSTRACT

In the present study we evaluated the effects of a small interfering RNA (siRNA) targeting angiotensin converting enzyme (ACE) gene in spontaneously hypertensive rats (SHR). Nineteen male sixteen weeks-old SHR were submitted under anesthesia to femoral vessels catheterization for chronic recordings of arterial pressure (AP) and drug administration, respectively. After baseline AP and heart rate (HR) recordings in a computerized system, nine animals received by intravenous infusion 150ug/Kg of ACE-siRNA and other ten animals (control group) received also intravenously siRNA targeting enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene, not expressed in mammals. Following, each twelve hours for the next four days, continuous recordings of AP and HR for 30 minutes each one were performed in quiet and controlled room. At the end of fourth day, after last AP recording and evaluation of angiotensin I (100 ng/Kg, i.v.) pressor response, all animals were sacrificed and lungs and kidneys were extracted to perform western-blot and RT-PCR analysis of tissue ACE expression. Baseline values of mean AP (MAP) and HR did not differ between groups before treatment (182 ± 3 mmHg e 366 ± 10 bpm in ACE-siRNA group and 172 ± 4 mmHg e 356 ± 16 bpm in control group, respectively, $p=ns$). MAP values remained similar in both groups until second day, after which they began to decrease in ACE-siRNA group reaching the lowest values in the fourth day (136 ± 8 mmHg versus 167 ± 4 mmHg in control, $p<0,02$). HR values as well as angiotensin I pressure responses did not differ between groups. Western-blot analysis of tissue ACE expression revealed 52,9% of reduction of kidneys ACE expression in ACE-siRNA group as compared to control group, without changes in lung ACE expression. Despite of reduction of protein expression in the kidneys of the treated animals, RT-PCR was not able to demonstrate any change in messenger RNA expression for ACE in treated animals. These data suggest that a naked small RNA targeting ACE

gene, intravenously injected, may act in vivo attenuating ACE expression in a tissue-selective way, with marked repercussion on systemic arterial pressure in SHR. Since the expression of messenger RNA for ACE was not modified, a possible microRNA effect could be suggested. These findings point out small interferent RNAs or microRNAs as a promising strategy to treat systemic arterial hypertension.

LISTA DE SÍMBOLOS, SÍGLAS E ABREVIATURAS

SÍMBOLOS

≈	Aproximadamente
B	Base
C	Citosina
°C	Graus Celsius
Δ	Diferença
(ΔG)	energia livre
g	Gramma
G	Guanina
GC	Guanina e citosina
H	Hora
Hz	Hertz
K	Kilo
L	Litro
μ	Micro
Mg	Miligramma
Ms	Milisegundos
n	Número
N	Qualquer nucleotídeo
S	Segundo
V	Volts
%	Porcentagem

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i> (Enzima Conversora de Angiotensina)
AGT	Angiotensinogênio
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AP	<i>Arterial Pressure</i> (Pressão Arterial)
AS-ONs	<i>Antisense Oligonucleotides</i> (oligonucleotídeos antisense)
Bpm	Batimentos por Minuto
cDNA	Código DNA
Cols	Colaboradores
DP	Desvio Padrão
DPM	Desvio Padrão da Média
dsRNA	<i>double strand RNA</i> (RNA dupla fita)
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
Ep	Erro Padrão
EPM	Erro Padrão da Média
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i> (Fragmento de Sequências Expressas)
EUA	Estados Unidos da América
FC	Freqüência Cardíaca
FCI	Freqüência Cardíaca Intrínseca
Fig	Figura
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde)
h	Hora

HA	Hipertensão Arterial
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HF	<i>High Frequency Component</i> (Componente de Alta Freqüência)
HF(nu)	<i>High Frequency Normalized Component</i> (Componente de Alta Freqüência Normalizado)
HR	<i>Heart Rate</i> (Freqüência Cardíaca)
IP	Intervalo de Pulso
i.p.	Intra-peritonal
i.v.	Intra-venoso(a)
LF	<i>Low Frequency Component</i> (Componente de Baixa Freqüência)
LF(nu)	<i>Low Frequency Normalized Component</i> (Componente de Baixa Freqüência Normalizado)
LF/HF	Relação LF/HF
miRNAs	microRNAs
ml	mililitro
mm	milímetro
mmHg	Milímetro de Mercúrio
mmol/L	Relação Milimol/Litro
ng/Kg	Relação Nanograma/kilograma
ns	nanosegundos
nt	nucleotídeo
Δ PAM	Varição da Pressão Arterial Média
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média

PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia Polimerase)
PE-10	Cânulas de polietileno PE-10
PE-50	Cânulas de polietileno PE-50
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i> (Complexo de silenciamento induzido por RNA)
RNAi	<i>RNA interfering</i> (Interferência por RNA)
RNAm	RNA Mensageiro
RT-PCR	<i>Reverse transcription- polymerase chain reaction</i> (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase)
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (pequeno interferente de RNA)
siRNA-ECA	pequeno interferente de RNA para a ECA
siRNA-eGFP	pequeno interferente de RNA para a GFP
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> (Ratos Espontaneamente Hipertensos)
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UV	Ultravioleta
VAR	Variância
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLF	<i>Very Low Frequency Component</i> (Componente de Muito Baixa Frequência)
VPA	Variabilidade da Pressão Arterial

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros espectrais 29
calculados para a variabilidade da pressão arterial sistólica no
período basal e no 4^o dia de observação (período final), usando
análise espectral autorregressiva.
- TABELA 2** Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros espectrais 30
calculados para a variabilidade da pressão arterial diastólica no
período basal e no 4^o dia de observação (período final), usando
análise espectral autorregressiva
- TABELA 3** Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros espectrais 31
calculados para a variabilidade do intervalo de pulso no período
basal e no 4^o dia de observação (período final), usando análise
espectral autorregressiva.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Efeitos da administração endovenosa de siRNA-ECA ou siRNA-eGFP (controle) sobre a pressão arterial média (PAM) em SHRs.	26
FIGURA 2	Efeitos da administração endovenosa de siRNA-ECA (150 µg/Kg) ou de siRNA-eGFP (controle) sobre a frequência cardíaca (FC) em SHRs.	27
FIGURA 3	Valores médios (±erro padrão) da resposta pressora (□PAM) à angiotensina I (100 ng/Kg) administrada endovenosamente em ratos controles (si-RNA-eGFP) e em ratos que receberam siRNA-ECA (p=0,293).	28
FIGURA 4	“Imunoblot” para ECA de rato nos rins (“pool” de 2 a 3 amostras) de 10 animais controles (siRNA-eGFP) e de 09 animais tratados com siRNA-ECA.	32
FIGURA 5	“Immunoblot” para ECA de rato nos pulmões (“pool” de 2 a 3 amostras) de 10 animais controles (siRNA-eGFP) e de 09 animais tratados com siRNA-ECA.	33
FIGURA 6	RT-PCR para ECA e IGFR1 (controle interno) de extratos teciduais (“pool” total) de rins de animais do grupo tratado (siRNA-ECA) e do grupo controle (siRNA-eGFP).	34

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma síndrome clínica freqüentemente observada na população adulta, com uma incidência média estimada de 15-20%. Embora inicialmente assintomática, esta síndrome está associada a inúmeras alterações em órgãos alvos como coração, rins, cérebro, vasos sanguíneos, etc. com profundo impacto na morbi-mortalidade dos indivíduos de populações do mundo ocidental. Embora inúmeros avanços tenham sido feitos no entendimento das bases fisiopatológicas desta síndrome, muito ainda falta por ser investigado para que se conheça bem a patogênese da hipertensão arterial, reconhecidamente de origem multifatorial. Por outro lado, um enorme arsenal terapêutico dotado de grande eficácia no tratamento da HAS e de suas conseqüências está atualmente disponível com grande impacto na melhoria da qualidade de vida e redução da morbi-mortalidade de indivíduos hipertensos.

Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos, um tratamento definitivo para a hipertensão arterial essencial primária ainda não está disponível e muita investigação científica ainda se faz necessária para a completa elucidação da fisiopatologia, bem como para a cura definitiva da hipertensão arterial essencial.

A hipertensão arterial essencial compreende mais de noventa por cento dos casos de hipertensão arterial humana. Por ser observada em determinados grupos familiares, ela pode ser classificada como uma doença de causa genética. Os fenótipos resultantes podem ser modulados por vários fatores ambientais, assim, alterando a intensidade da elevação da pressão sanguínea.

Muitos fatores têm sido implicados na gênese da hipertensão essencial humana: aumento da atividade do sistema nervoso simpático, talvez relacionado a exposição e resposta ao stress psicológico; a superexposição a hormônios retentores de sódio e vasoconstrictores; alta ingestão de sódio por longos períodos;

ingestão alimentar inapropriada de potássio e cálcio; aumento ou inapropriada secreção de renina com resultante aumento da produção de angiotensina II e aldosterona; deficiências de vasodilatadores como prostaciclina, óxido nítrico, e peptídeos natriuréticos; anormalidades na resistência vascular periférica, incluindo lesões seletivas na microvasculatura renal, diabetes mellitus, alterações no transporte de íons, etc. (Calhoun, 2000).

Evidências para a influência genética na pressão arterial vêm de várias fontes. Estudos em gêmeos relatam maior concordância no valor da pressão sanguínea em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos (Feinleib, 1977). E estudos populacionais mostraram alta similaridade na pressão arterial entre indivíduos da mesma família, que aquela observada entre famílias distintas (Longini et al, 1984). A última observação não pode ser atribuída unicamente a fatores ambientais desde que estudos de adoção demonstraram maior concordância da pressão arterial entre filhos de pais biológicos, que filhos adotivos morando na mesma casa (Biron et al, 1976).

Embora a mutação de genes individuais responda por somente pequena porcentagem dos casos de hipertensão, estudos dessas raras desordens poderiam elucidar mecanismos fisiopatológicos que predisporia às formas mais comuns de hipertensão e poderia sugerir novos enfoques terapêuticos (Lifton, 2001). Foram descritas, até o presente momento, mutações em dez genes que causam formas Mendelianas da hipertensão humana, e nove genes que causam hipotensão (Lifton, et al 2001). Essas mutações reforçam a hipótese de Arthur C. Guyton (Guyton, 1991) de que o desenvolvimento da hipertensão depende da disfunção renal, determinada geneticamente pela retenção de sal e água (Calhoun, et al 2000).

Na maioria dos casos, a hipertensão resulta de uma complexa interação de fatores genéticos, ambientais, e demográficos. Aprimoramento de técnicas de análise genética, especialmente análise por “linkage”, tem tornado viável a busca por genes que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial primária na população. A aplicação dessa técnica tem encontrado ligação, estatisticamente significativa, entre a pressão arterial e várias regiões cromossômicas, bem como regiões ligadas à hiperdislipidemia familiar combinada. Esses achados sugerem que existem muitos *loci* gênicos relacionados, cada qual exercendo um pequeno efeito na pressão sanguínea na população em geral. Esses dados mostram que a causa da hipertensão primária é multifatorial (Harrap, 2000).

Estudos vêm demonstrando o papel de genes relacionados ao sistema renina –angiotensina-aldosterona, tais como o polimorfismo M235T variante do gene responsável pela codificação do angiotensinogênio. Essa variante tem sido associada ao aumento dos níveis de angiotensinogênio circulante e da pressão sanguínea em muitas populações distintas (Jeunemaire et al 1992, Corvol et al 1999, Staessen et al 1999). Variantes comuns no gene da enzima conversora de angiotensina (ECA) têm sido associadas a elevações da pressão sanguínea em seres humanos (Fornage et al 1998, O'Donnell et al 1998).

O uso de modelos experimentais de HAS tem contribuído em muito para o entendimento dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial e também no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes para o controle dos níveis tensionais elevados (Fazan Jr et al, 2001). Neste contexto, um modelo em especial merece destaque: o modelo de hipertensão espontânea em ratos (ratos espontaneamente hipertensos – “spontaneously hypertensive rats” - SHR).

Desenvolvido originalmente a partir de endo-cruzamentos seletivos de ratos da cepa Wistar em Kyoto no Japão em 1963 (Okamoto e Aoki, 1963), este modelo é talvez o mais estudado na literatura. A sua importância tem sido creditada à similaridade da sua patogenia com a HAS essencial humana, embora algumas ressalvas devam ser feitas (Trippodo e Frohlich, 1981).

Os SHR iniciam o desenvolvimento de HAS com aproximadamente 05 semanas de idade, apresentando níveis tensionais considerados hipertensivos já entre a 7^a e a 15^a semanas, atingindo um platô entre a 20^a e a 28^a semanas. A partir desta idade a hipertensão se estabiliza até aproximadamente 1 a 1,5 anos de idade quando os animais começam a desenvolver um quadro de insuficiência cardíaca congestiva, a qual é associada com uma elevada taxa de mortalidade (Yamori, 1984).

Os mecanismos associados aos níveis tensionais elevados são decorrentes de uma considerável elevação na resistência periférica total acompanhado de um débito cardíaco normal ou mesmo reduzido. Uma das principais responsáveis pela elevação da resistência periférica total é a marcada hiperatividade simpática, a qual se constitui numa das características mais importantes dos SHR (Judy e cols., 1976).

Além da hiperatividade simpática, uma outra marcante característica deste modelo é a acentuada disfunção endotelial, caracterizada principalmente por uma vasodilatação dependente de endotélio profundamente deprimida e uma reduzida biodisponibilidade do óxido nítrico, provavelmente decorrente de um stress oxidativo endotelial excessivamente elevado (Kerr e cols., 1999, Touyz, 2004). A disfunção endotelial observada no SHR também está diretamente implicada na elevação da

resistência periférica total e na lesão crônica de órgãos alvo (Keer e cols., 1999, Touyz, 2004).

Uma outra característica marcante dos animais SHR, e que diretamente está associada à elevação da pressão arterial, é a hiperatividade do sistema renina angiotensina, principalmente em nível tecidual, a qual resulta em produção aumentada de angiotensina II em vários leitos vasculares, o que seguramente também contribui para a elevada resistência periférica total observada neste modelo (Mullins e cols., 2006). A elevada atividade do sistema renina angiotensina nos vasos renais, ao promover vasoconstricção renal, bem como nos túbulos renais, ao promover maior reabsorção de sal e água, parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial sistêmica (Mullins e cols., 2006). A hiperatividade do sistema renina angiotensina observada na hipertensão arterial representa um importante alvo da terapia farmacológica moderna baseada no emprego de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) e antagonistas de receptores AT-1 da angiotensina II, os quais são altamente eficazes em reduzir a pressão arterial sistêmica e atenuar lesão de órgãos alvo (Mullins e cols., 2006).

Dadas as características deste modelo e a sua similaridade com a hipertensão essencial humana, estratégias terapêuticas anti-hipertensivas são normalmente estudadas nos SHR. Nos últimos anos, novas modalidades terapêuticas principalmente baseadas em manipulação gênica (terapia gênica) têm sido intensamente estudadas em inúmeras doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial (Phillips, 2001).

A medicina moderna vem passando por uma importante revolução no que diz respeito à terapêutica. Drogas farmacológicas e intervenções cirúrgicas vêm

sendo paulatinamente substituídas por terapias celulares e gênicas. Tal fato coloca a medicina moderna na chamada era da terapia gênico-celular.

A introdução de RNA dupla fita dentro de um organismo pode causar específica interferência na expressão gênica (Fire et al, 1998). Esse fenômeno, conhecido como interferência de RNA (“RNA interference” - RNAi), resulta na inativação de um alvo específico de RNA mensageiro (RNAm) por uma maquinaria celular presente em plantas, invertebrados e células de mamíferos (Tuschl et al 1999, Montgomery et al 1998).

A interferência de RNA (RNAi) é um processo pós-transcricional ativado pela introdução de um RNA de dupla fita (“double strand RNA” - dsRNA), o qual leva ao silenciamento de um gene com uma seqüência específica. O RNAi tem sido relatado como uma ocorrência natural em diversos organismos como nematóides, plantas e fungos. Provavelmente, este processo serve para proteger organismos eucariotos do ataque de vírus, regular atividade de transposons e eliminar produtos de transcrições anômalas (Mello e Conte Jr., 2004; Meister e Tuschl, 2004).

A primeira evidência de que dsRNA poderia realizar um silenciamento eficiente através de RNAi veio de estudos realizado no nematóide *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Estudos posteriores em *Drosophila melanogaster* indicaram que o RNAi é um mecanismo de duas etapas. Primeiro, longas fitas de dsRNA são clivados por enzimas conhecidas como Dicer em fragmentos de 21-23 nucleotídeos (nt), chamados RNAs curtos interferentes (“small interference RNA” - siRNAs). Os siRNAs são recrutados ao complexo de ribonuclease denominado RISC (“RNA Induced Silencing Complex”), o qual por sua vez regula a clivagem do mRNA alvo (Mello e Conte Jr., 2004; Meister e Tuschl, 2004).

Portanto, a interferência de RNA (RNAi) é um processo que ocorre quando se introduz em uma célula um RNA dupla fita (dsRNA) correspondente a um determinado gene. Este dsRNA irá guiar um processo de silenciamento gênico através da degradação do mRNA correspondente ao dsRNA introduzido, levando à uma inibição específica (Mello e Conte Jr., 2004; Meister e Tuschl, 2004).

As proteínas que mediam a interferência de RNA são parte de uma via celular evolutivamente conservada que processa RNAs celulares endógenos para silenciar genes importantes no desenvolvimento (Grishok et al 2001, Hutvagner et al 2001). No caso do RNAi, a proteína Dicer, uma enzima RNA polimerase III, é provavelmente responsável pelo processamento dos RNAs dupla fita em pequenos RNA interferentes. Testes funcionais conduzidos em plantas e vermes têm identificado um grande número de outros genes conservados, os quais participam na via do RNAi. Esses genes incluem um número de diferentes helicases, uma exonuclease, proteínas ligantes de RNA dupla fita, RNA polimerase dependente de RNA e novos genes de função desconhecida (McManus et al 2002, Bernstein e al 2001, Cullen et al 2002, Hannon 2002, Zamore 2001).

RNAi em mamíferos foi primeiramente descrita em embriões de camundongos usando longas fitas de RNA dupla fita (Svoboda et al 2000, Wianny et al 2000). Assim, seguindo a análise das estruturas que intermediam esse processo, pequenos RNAs interferentes (siRNA) foram usados para silenciar genes de tecidos de mamíferos em cultura (Elbashir 2001, Caplen 2001). A maioria dos genes descobertos em plantas e vermes relacionados à via do RNAi estão também presentes em camundongos e outros mamíferos, o que alicerça a evidência de que vias referentes ao RNAi foram conservadas ao longo da escala evolutiva e que devem exercer importante papel funcional na regulação da expressão gênica. Uma

notável exceção é o gene da RNA polimerase dependente de RNA, descrito em *Caenorhabditis elegans*, e relacionado à amplificação das duplas fitas de RNA interferente (Sijen et al 2001, Lipardi et al 2001), o que garante nesta espécie a perpetuação da resposta de RNAi para os descendentes. A ausência desta enzima em mamíferos demonstra que a perpetuação da resposta do RNAi é inexistente em mamíferos, o que difere daquela observada nos organismos inferiores.

Com base nas propriedades discutidas acima, o RNAi tem se transformado numa importante ferramenta para as ciências biológicas. Com ela pode-se estudar desde o papel de um determinado gene específico dentro do campo integrado da fisiologia ou fisiopatologia até o uso terapêutico para o tratamento de doenças virais como o HIV, a hepatite, o câncer, doenças genéticas, etc (Hannon et al, 2004).

A primeira evidência de que RNAs interferentes poderiam ser utilizados como agentes terapêuticos em mamíferos veio a partir de um trabalho publicado em 2002 (Husuwa et al., 2002), em que se demonstrou *in vivo* que siRNAs purificados (“naked”) administrados endovenosamente em camundongos e ratos intactos eram capazes de silenciar um dado gene específico por um tempo relativamente prolongado, cerca de uma semana (Husuwa et al., 2002). Após esta demonstração, vários outros trabalhos têm sido publicados utilizando-se siRNAs dirigidos contra diversos alvos relacionados a várias doenças e condições fisiopatológicas (Hannon et al., 2004), incluindo várias doenças de origem genética (Hannon et al., 2004).

Nenhum relato na literatura, até o momento, associou a técnica de interferência por RNA ao estudo dos genes relacionados ao desenvolvimento da hipertensão essencial. Assim sendo, consideramos a hipótese de que poderíamos intervir na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), diminuindo seus níveis de pressão, inibindo a tradução do RNAm responsável pela codificação

da enzima conversora de angiotensina (ECA). O gene da ECA foi escolhido como alvo pelo fato de que alterações na expressão do mesmo têm sido implicados na gênese da hipertensão arterial e também pelo fato de que inibidores farmacológicos da ECA são altamente eficazes em reduzir a pressão arterial tanto em modelos animais como em seres humanos hipertensos.

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo averiguar o efeito da interferência de RNA dirigida para o gene da ECA sobre a pressão arterial sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Verificar, por meio do registro direto da pressão arterial, o efeito funcional do RNAi para seqüência específica do RNAm do gene da ECA sobre os valores da pressão arterial sistêmica em ratos SHR.

2) Avaliar, por meio de análise de variabilidade cardiovascular da frequência cardíaca e da pressão arterial, o efeito funcional do RNAi para seqüência específica do RNAm do gene da ECA sobre os parâmetros autonômicos cardíacos e vasculares em ratos SHR.

3) Averiguar, por meio de técnicas moleculares como o Western Blot e RT-PCR, o efeito em nível molecular do RNAi para o gene da ECA, quantificando os níveis de proteína (Western Blot) e expressão do RNAm (RT-PCR) da ECA.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PLATAFORMA PARA DESENHO DO siRNA

A interferência de RNA é conhecida como uma ferramenta de *knock-down* gênico, isto é, elevado grau de inativação dos alvos (90 a 99% em estudos *in vitro*), mas não total como observado em ferramentas de *knock-out*.

A utilização sistemática de siRNAs revelou que algumas moléculas direcionadas para diferentes alvos de um mesmo RNA são mais eficientes que outras (Holen et al, 2002). Esses dados sugeriram a existência de parâmetros que determinariam a eficiência de *knock-down* de um siRNA, entre eles: i) posição no RNA alvo ii) conteúdo de bases GC e estrutura secundária do siRNA (Reynolds et al, 2004) e iii) estabilidade termodinâmica das extremidades (Schwarz et al., 2003; Khvorova et al. 2003).

Vários grupos e empresas começaram então a desenvolver programas capazes de identificar siRNAs funcionais a partir de um RNA alvo (Yamada e Morishita 2005; Yuan et al., 2004; Naito et al.,2004; Amarguioui e Prydz, 2004; Levenkova et al., 2004; Yiu et al.,2005). Um dos algoritmos mais usados para desenho de siRNAs é aquele baseado no protocolo definido por Thomas Tuschl e colaboradores (Elbashir et al., 2001).

No presente trabalho, utilizamos a plataforma denominada *Débora*, criada e aperfeiçoada e validada durante o projeto de doutorado de Tiago Campo Pereira, doutor em genética e biologia molecular na área de genética animal e evolução pela Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Esta plataforma baseia-se em alguns parâmetros já descritos na literatura e outros identificados durante o projeto de doutorado citado acima. Todos eles são aplicados aos oligonucleotídeos *guia e passageiro*, como apresentado na ordem:

3.1.1. Localização no RNA alvo

O alvo (21-mer) deve estar localizado na região codificante, excluído os 100 primeiros nucleotídeos após o códon de iniciação (“start códon”) e os 100 últimos nucleotídeos antes do códon de parada (“stop códon”). Isso devido à possibilidade dessas regiões (de 100 nucleotídeos) estarem complexadas a proteínas regulatórias da tradução, dificultando o acesso do siRNA. Regiões não traduzidas 5’ e 3’ (“untranslated regions” - UTR) geralmente não são consideradas devido à mesma questão. Contudo os microRNAs- que atuam de uma forma muito similar aos siRNAs- têm como alvo a 3’UTR e alguns estudos de RNAi relatam a identificação de bons alvos nessas regiões.

3.1.2. Polimorfismos

Várias seqüências do gene (alvo) são compiladas e alinhadas – usando por exemplo o programa Custal X – excluindo-se regiões com presença de polimorfismos. O seqüenciamento deve ser feito caso não haja potenciais seqüências de 21-mer sem polimorfismos.

3.1.3. Formato das moléculas

Os siRNAs utilizados neste trabalho foram produzidos por transcrição *in vitro*. Este procedimento exige que o primeiro nucleotídeo seja uma guanina e o décimo nono seja uma citosina (forma molecular 5’ GN₁₇ CN₂ 3’). Uma transcrição *in vitro* mais intensa é esperada para moléculas com o formato G₂N₁₆CN₂. Oligos obtidos comercialmente podem ser adquiridos em qualquer formato (N₂₁). A procura por tais seqüências é conduzida por programa *Gene Runner*.

3.1.4. Atividade do oligonucleotídeo guia

Preferência pelos maiores valores de energia livre (ΔG) gerados pelos programas Strand Analysis versão 1.0 ou 2.0

3.1.5. Estrutura secundárias dos oligonucleotídeos

Evitam-se siRNAs que apresentem estruturas secundárias (*hairpins*, *duplexes* ou *internal loops*) cuja temperatura de fusão seja maior que 0 graus Celsius. Essa análise é conduzida no programa Gene Runner, subprograma oligo, sempre trabalhando com o formato RNA da seqüência.

3.1.6. Conteúdo de GC

Preferência por conteúdos de GC entre 30% e 55% - o que reduz a ocorrência de estruturas secundárias.

3.1.7. Extremidade 3' overhang

Vários estudos observaram que di-nucleotídeos de timina nas extremidades 3' conferem maior estabilidade ao siRNA.

3.1.8. Especificidade

A busca por identidade é realizada através do programa BLAST Search for Short, Nearly Exact Matches (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), usando sempre o oligo antisenso do siRNA (que será a molécula funcional contra o banco EST (seqüências expressas) do organismo em questão. A identidade (em termos de nucleotídeos contínuos) máximas permitida entre o oligo antisenso e um alvo inespecífico é de 15 nucleotídeos.

3.1.9. Identificação do alvo

Uma seqüência alvo contra o gene da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) de ratos foi desenhada de acordo com o algoritmo Débora proposto acima, na região codificante (número de acesso no GenBank: AF201332).

3.1.10. Características do siRNA dirigido contra o RNAm da ECA do rato

Posição na seqüência (AF201332)	2024
Molécula	siRNA
Fórmula molecular	G ₂ N ₁₉ (transcrição <i>in vitro</i> intensificada)
%GC (oligo antisense)	42,9%
3'TT	Apenas no antisense
Atividade do oligo guia	Ok
Polimorfismos	Não apresenta
Estrutura antisense/sense	Ok
Especificidade (blast)	Ok

Posição no gene da ECA: 2024

siRNA:

sense: 5' GGTGTTGTGGAACGAATACGC 3'

antisense: 3' TTCCACAACACCTTGCTTATG 5'

3.1.11. Síntese do siRNA

O siRNA foi produzido em laboratório por transcrição *in vitro* (Donze e Picard, 2002).

3. 2. ANIMAIS E CIRURGIA

Foram utilizados dezoito animais SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) machos pareados em peso (aproximadamente 250 gramas) e idade (aproximadamente 16 semanas).

Esses animais foram submetidos, após a anestesia por pentobarbital sódico (40 mg/Kg, intra-peritoneal), à canulação da artéria e veia femorais no intuito de se obter o registro da pressão arterial (por meio da artéria femoral) e administração de drogas (por meio da veia femoral). Para a canulação utilizaram-se cânulas de polietileno (PE-10 fundido com uma extensão de PE-50) (ClayAdams Brand, Polyethylene Tubing, Becton Dickinson, Sparks, USA).

Os animais foram alojados em biotério, com ambiente controlado (temperatura= 23 graus Celsius, umidade = 40-70%, ciclo claro/escuro 12h/12h) e tiveram livre acesso à ração e água durante todo o período experimental.

3. 3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após doze horas da canulação dos vasos femorais e implantação das cânulas, os animais foram conectados ao sistema de aquisição de dados por computador (Aqdados, Lynx Tecnol. Eletron. Ltda, SP, São Paulo, SP) para aquisição dos sinais de pressão arterial com uma frequência de amostragem de 1000Hz. Após trinta minutos de estabilização, um registro contínuo de trinta minutos de pressão arterial pulsátil foi realizado para medir os valores basais de pressão

arterial e frequência cardíaca, os quais foram posteriormente processados para avaliação da pressão arterial média, sistólica e diastólica.

Ao final dos trinta minutos de registro basal e comprovada a similaridade das pressões dos animais, os mesmos foram divididos em dois grupos pareados por valores de pressão arterial média:

Grupo I: animais que receberam por meio da veia femoral pequeno RNA interferente ("*small interfering RNA*"-siRNA) dirigido contra o gene da ECA (total de nove animais)

Grupo II: animais do grupo controle (total de nove animais), que receberam siRNA para um gene não expresso em mamíferos (RNA para o gene da proteína fluorescente verde -eGFP) também pela veia femoral já canulada.

A massa de siRNA contra ECA e eGFP utilizada foi de 150 µg/kg (aproximadamente 45-50µg por animal).

A seguir, a cada doze horas pelos próximos quatro dias, registros contínuos de pressão arterial direta por trinta minutos foram efetuados em ambiente quieto e controlado. Ao final do quarto dia, após o último registro da pressão arterial, os animais receberam uma dose intravenosa de angiotensina I, na dose de 100 ng/Kg, para a quantificação da resposta pressora à angiotensina I. Em seguida, todos os animais foram sacrificados e pulmões e rins foram extraídos e submetidos à análise de *western blot* para verificar o grau de expressão protéica da ECA tecidual e RT-PCR, para avaliar o nível de expressão de RNAm da ECA.

3. 4. ANÁLISE DOS DADOS CARDIOVASCULARES

Os valores médios de PA média e FC foram calculados para cada período de 30 minutos de registro. As respostas pressoras à angiotensina I foram quantificadas subtraindo-se os valores de pico de pressão média observados após a administração de angiotensina I dos valores basais médios medidos antes da administração.

Para o estudo da variabilidade cardiovascular, os sinais de PA, continuamente registrados ao longo de 30 minutos, no período inicial prévio à administração dos siRNAs e no último período do protocolo (no 4º dia), foram processados por software (Software PRE 24, gentilmente cedido por Eng. Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália) de modo a gerar séries temporais batimento-a-batimento de intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS). A variância dos valores de IP e PAS dentro de cada período foi tomada como um índice de variabilidade no domínio do tempo.

A variabilidade do IP e da PAS foi também avaliada no domínio da frequência empregando-se o método de análise espectral autoregressivo. Os procedimentos teóricos e analíticos estão completamente descritos em publicações prévias (Baselli et al 1986; Malliani, 1991). Brevemente, séries temporais batimento a batimento de IP e PAS, coletados durante cada 30 minutos de registro, foram divididas em segmentos seriados de 200 batimento, sendo que todo segmento sucessivo sobrepunha-se em 50% (100 batimento) no segmento anterior (método de Welch). Usando segmentos estacionários das séries temporais, parâmetros autoregressivos foram estimados através do método de Levinson-Durbin e a ordem do modelo foi escolhida de acordo com o critério de Akaike. Em seguida, sobre cada segmento

estacionário individual de 200 batimentos, a decomposição espectral foi realizada mediante uso de software apropriado (software, LA 24, gentilmente cedido pela engenheiro Dr. Alberto Porta, Universidade de Milão, Itália). Este procedimento permite automaticamente quantificar a frequência central e a potência de cada componente espectral relevante em unidades absolutas bem como em unidades normalizadas. O procedimento de normalização, aplicado apenas à variabilidade do IP, foi realizado pela divisão da potência do componente de baixa frequência (low frequency – LF; 0,20-0,80 Hz) ou de alta frequência (high frequency – HF; 0,80 - 0,250 Hz) pela potência espectral total da qual se subtrai a potência da banda de muito baixa frequência (very low frequency – VLF, 0,01-0,20 Hz), multiplicando-se o resultado por 100 (Baselli, 1986, Malliani, 1991). Os parâmetros espectrais obtidos para cada segmento estacionário individual de 200 batimentos foram mediados e valores médios resultantes de 30 minutos de registro foram obtidos para cada animal.

3. 5. “WESTERN BLOT”

No final do quarto dia pós-injeção de siRNA-ECA ou siRNA-eGFP, os animais foram anestesiados e rapidamente sacrificados pela abertura da cavidade torácica e abdominal. Os pulmões e os rins de cada animal foram rapidamente removidos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente congelados em freezer a -80°C para posterior processamento. No processamento dos tecidos, os mesmos foram banhados em PBS e homogeneizados em 10 volumes de tampão de solubilização (1% Triton-X 100; 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4); 100 mmol/L

pirofosfato de sódio; 100 mmol/L fluoreto de sódio; 10 mmol/L EDTA; 10 mmol/L vanadato de sódio; 2 mmol/L PMSF; e 0.1 mg aprotinina/mL) a 4°C com homogeneizador polytron operado na velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados em 10 000g a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante foi usado para o ensaio. A concentração das proteínas totais no sobrenadante foi determinada pelo método de *Bradford*. O sobrenadante foi tratado com tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L ditioneitol e aquecido em água fervente por 4 minutos e então submetido à eletroforese em SDS-PAGE (8% bis-acrylamide) em um aparelho de eletroforese em miniatura (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories). Quantidades idênticas de proteínas totais foram usadas para todas as amostras teciduais. Eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos em 120 V (corrente contínua).

Em seguida a membrana de nitrocelulose foi pre-incubada em tampão bloqueador (5% de leite em pó desnatado, 10 mmol/L de Tris, 150 mmol/L de NaCl, e 0.02% de *Tween 20*) a 4°C "overnight". A membrana foi então incubada com anticorpo policlonal anti-ECA (Santa Cruz *Biotechnology*) diluído em 10 mL of tampão bloqueador (3% de BSA ao invés de leite em pó desnatado) "overnight" a 4°C e lavada por 60 minutos em tampão bloqueador sem leite em pó ou BSA. Os blots foram subseqüentemente incubados com 2 µCi de proteína A marcada com ¹²⁵I (30 µCi/µg) em 10 mL de tampão bloqueador por 2 horas em temperatura ambiente e então lavada outra vez por 30 minutos como acima descrito. Proteína A marcada com ¹²⁵I ligada aos anticorpos específicos foi detectada por autoradiografia. Intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica a partir das autoradiografias empregando-se o software Image J (NIH, USA).

3. 6. RT-PCR

RNA total foi extraído de fragmentos teciduais de rins e pulmões usando um RNAqueous kit (Ambion Inc.) de acordo com instruções do fabricante. Um micrograma de RNA total foi submetido à transcrição reversa usando transcriptase reversa do vírus da leucemia murina de Moloney (SuperScript II kit; Roche Diagnostics Corp.). Os produtos da retrotranscrição foram submetidos então à reação em cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR) usando Taq DNA polimerase (Roche Diagnostics Corp.) por quarenta ciclos consecutivos de amplificação. A medida semi-quantitativa da expressão de RNAm para o gene da ECA foi calculada com base na expressão do gene do receptor para o IGF-1 (IGF1R). Os primers de PCR usados foram: ECA: 5’: CCAAGGCTAA CAGGTTTCGTGGAGGAGTATGACCGGACAGC; 3’: TATAACACCAACATTACCAT AGAGGGCAGCAAGATCCTGC e IGF1R: 5’: GTGGCTAACACCACCATGTC CAGCCGAAGCAGGAACACCA; 3’: CGAGACAGAATACCCTTTCTTTGAGAGCAG AGTGGATAAC. Os produtos da RT-PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com controles ladder de 100-bp (*Invitrogen Corp.*) e quantificados com um analisador de imagens UV (modelo Eagle Eye II, Stratagene).

3. 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros foram expressos como média (\pm erro padrão). Os valores de pressão arterial média e de frequência cardíaca avaliados nos períodos de 30 minutos de registro a cada doze horas durante os quatro dias subsequentes ao

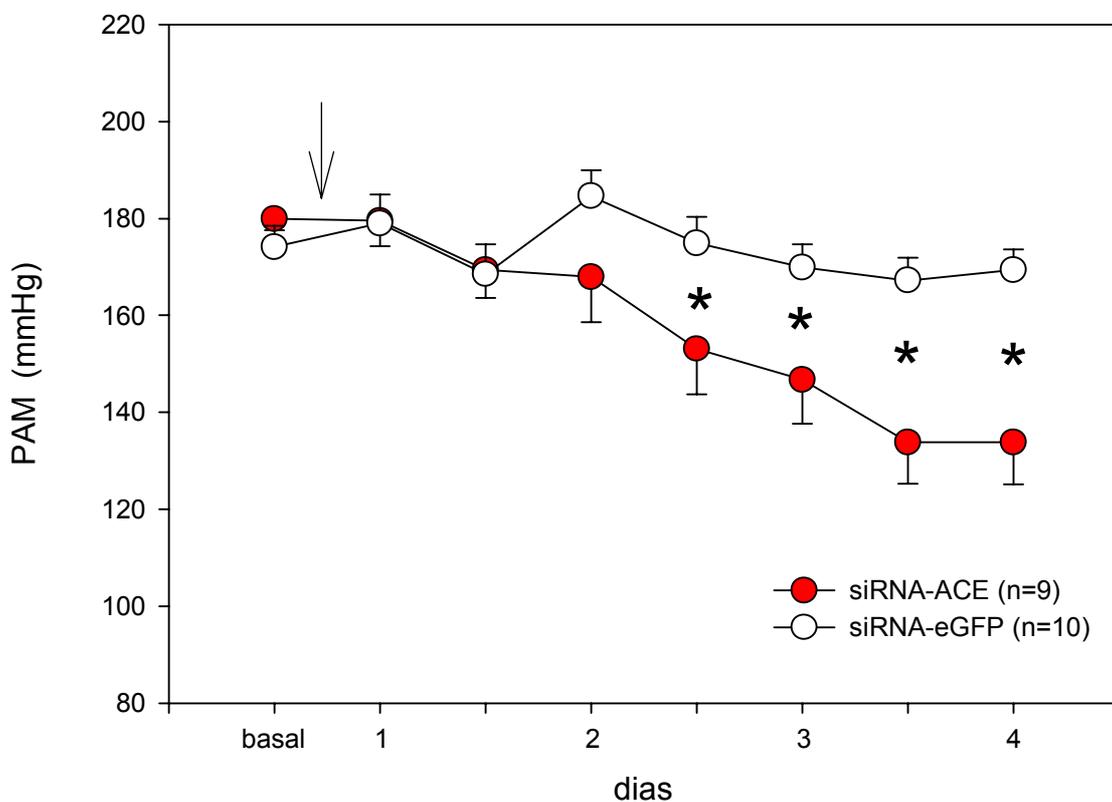
tratamento, bem como os parâmetros obtidos da análise de variabilidade cardiovascular foram avaliados por meio de ANOVA "two way" para medidas repetidas seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Para os demais parâmetros, teste t de "Student" para medidas independentes ou de Mann-Whitney, foram empregados quando apropriados. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores basais de PAM e FC prévios ao tratamento não diferiram entre os grupos tratado e controle (182 ± 3 mmHg e 366 ± 10 bpm no grupo RNAi-ECA e 172 ± 4 mmHg e 356 ± 16 bpm no grupo controle, respectivamente, $p=ns$).

Os valores de PAM permaneceram semelhantes nos dois grupos até a metade do segundo dia de registro, após o que iniciaram queda progressiva nos animais RNAi-ECA (Figura 1), atingindo os valores mais baixos no quarto dia de seguimento (136 ± 8 mmHg versus 167 ± 4 mmHg no grupo controle, $p<0,02$).

Figura 1: Efeitos da administração endovenosa de siRNA-ECA ou siRNA-eGFP (controle) sobre a pressão arterial média (PAM) em SHRs. Seta indica o momento da injeção (* $p < 0.05$ versus controle).



Os valores de FC ao longo do período de observação (figura 2), bem como a resposta pressora à angiotensina I ao final do quarto dia de estudo (Figura 3) não diferiram entre os grupos.

Figura 2: Efeitos da administração endovenosa de siRNA-ECA (150 µg/Kg) ou de siRNA-eGFP (controle) sobre a frequência cardíaca (FC) em SHRs. Seta indica o momento da injeção.

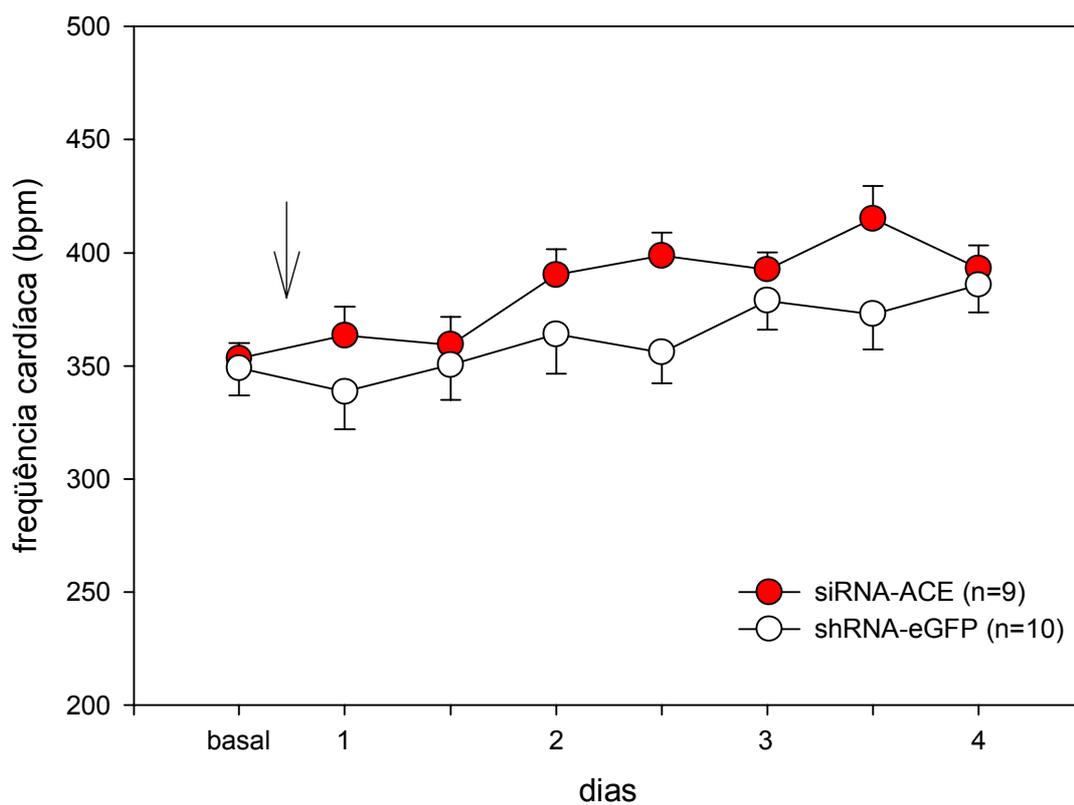
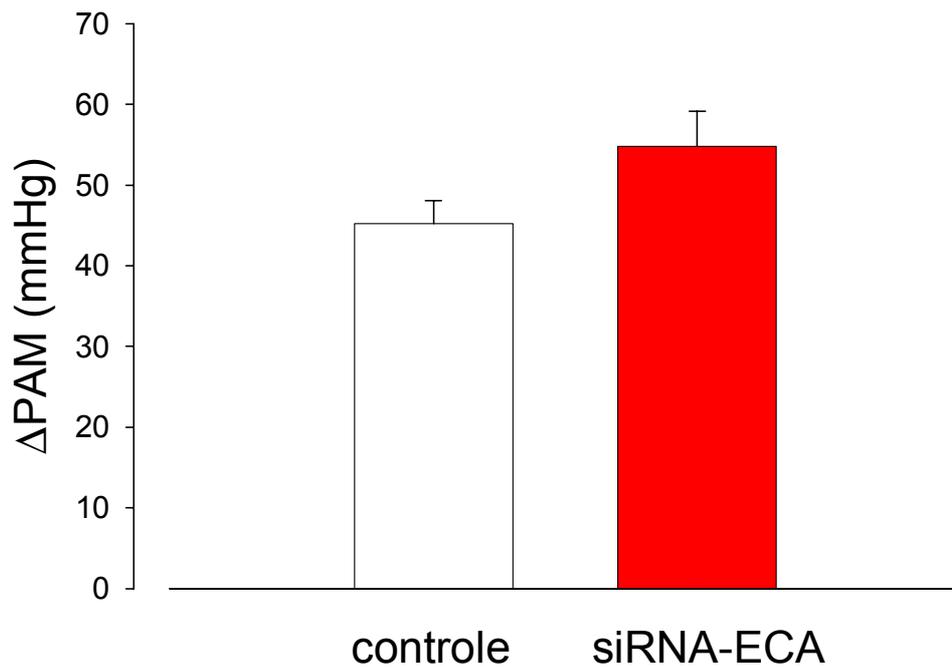


Figura 3: Valores médios (\pm erro padrão) da resposta pressora (Δ PAM) à angiotensina I (100 ng/Kg) administrada endovenosamente em ratos controles (si-RNA-eGFP) e em ratos que receberam siRNA-ECA ($p=0,293$).



Os dados obtidos após a análise de variabilidade da pressão arterial sistólica (tabela 1) revelaram que o tratamento com siRNA-ECA não modificou de forma significativa a variância e nem os componentes espectrais VLF, LF e HF da pressão arterial sistólica. O mesmo pode ser descrito para a análise de variabilidade da pressão arterial diastólica (tabela 2).

Tabela 1: Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros espectrais calculados para a variabilidade da pressão arterial sistólica no período basal e no 4^o dia de observação (período final), usando análise espectral autorregressiva.

	siRNA-ECA (n=9)	siRNA-eGFP (n=10)	P
BASAL			
<i>Variância (mmHg²)</i>	44,3 \pm 7,9	43,1 \pm 5,6	0,999
<i>VLF (mmHg²)</i>	16,8 \pm 2,3	21,6 \pm 2,6	0,515
<i>LF (mmHg²)</i>	23,0 \pm 5,8	16,6 \pm 3,1	0,777
<i>HF (mmHg²)</i>	4,3 \pm 0,8	3,8 \pm 0,9	0,996
FINAL			
<i>Variância (mmHg²)</i>	22,1 \pm 5,9	32,3 \pm 5,1	0,784
<i>VLF (mmHg²)</i>	7,8 \pm 1,9	12,4 \pm 1,5	0,552
<i>LF (mmHg²)</i>	10,4 \pm 3,8	12,4 \pm 2,6	0,991
<i>HF (mmHg²)</i>	4,3 \pm 1,0	7,0 \pm 2,3	0,538

P quantificado após aplicação de ANOVA de dois fatores seguido do teste t modificado de Tukey

Tabela 2: Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros espectrais calculados para a variabilidade da pressão arterial diastólica no período basal e no 4º dia de observação (período final), usando análise espectral autorregressiva.

	siRNA-ECA (n=9)	siRNA-eGFP (n=10)	P
BASAL			
Variância ($mmHg^2$)	23,9 \pm 3,3	21,2 \pm 2,4	0,934
VLF ($mmHg^2$)	10,4 \pm 1,1	11,0 \pm 1,3	0,985
LF ($mmHg^2$)	11,3 \pm 2,6	8,0 \pm 1,2	0,712
HF ($mmHg^2$)	1,9 \pm 0,3	2,1 \pm 0,2	0,984
FINAL			
Variância ($mmHg^2$)	13,9 \pm 3,3	19,1 \pm 2,2	0,688
VLF ($mmHg^2$)	4,8 \pm 1,1	8,6 \pm 0,9	0,128
LF ($mmHg^2$)	7,1 \pm 2,1	7,1 \pm 1,5	0,999
HF ($mmHg^2$)	1,4 \pm 0,3	3,1 \pm 0,6	0,050

P quantificado após aplicação de ANOVA de dois fatores seguido do teste t modificado de Tukey

Por outro lado, em relação à variabilidade da frequência cardíaca (expressa como intervalo de pulso), alterações significativas decorrentes do tratamento com siRNA-ECA foram observadas no componente VLF da variabilidade do IP, o qual foi significativamente reduzido nos animais tratado com siRNA-ECA ao final do quarto dia (3,9 \pm 1,1ms² versus 11,7 \pm 2,8ms² no grupo tratado com siRNA-eGFP, p<0,05). Os demais parâmetros espectrais de variabilidade do IP não diferiram entre os grupos.

Tabela 3: Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros espectrais calculados para a variabilidade do intervalo de pulso no período basal e no 4^o dia de observação (período final), usando análise espectral autorregressiva.

	siRNA-ECA (n=9)	siRNA-eGFP (n=10)	P
BASAL			
Variância (ms^2)	20,0 \pm 3,7	24,5 \pm 4,4	0,788
VLF (ms^2)	11,6 \pm 2,3	16,1 \pm 3,0	0,533
LF (ms^2)	1,9 \pm 0,9	1,9 \pm 0,7	0,999
LF (nu)	14,1 \pm 2,2	20,9 \pm 4,1	0,429
HF (ms^2)	5,4 \pm 1,1	6,1 \pm 1,2	0,942
HF (nu)	67,6 \pm 5,9	77,1 \pm 4,3	0,517
LF/HF ratio	0.34 \pm 0.07	0,39 \pm 0,11	0,978
FINAL			
Variância (ms^2)	6,7 \pm 1,4	17,1 \pm 3,8	0,164
VLF (ms^2)	3,9\pm1,1	11,7\pm2,8	0,024
LF (ms^2)	0,3 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	0,979
LF (nu)	7,9 \pm 2,6	9,1 \pm 1,4	0,993
HF (ms^2)	1,8 \pm 0,3	4,4 \pm 0,9	0,181
HF (nu)	68,7 \pm 3,3	80,2 \pm 3,3	0,355
LF/HF ratio	0,23 \pm 0,09	0,15 \pm 0,03	0,921

P quantificado após aplicação de ANOVA de dois fatores seguido do teste t modificado de Tukey.

A análise de “Western-blot” em tecidos revelou uma redução de 52,9% na expressão da ECA nos rins (figura 4) dos animais tratados em comparação com o controle, sem modificação no nível de expressão da ECA pulmonar (Figura 5).

Figura 4: “Imunoblot” para ECA de rato nos rins (“pool” de 2 a 3 amostras) de 10 animais controles (siRNA-eGFP) e de 09 animais tratados com siRNA-ECA. Note a menor expressão de ECA nos animais tratados com siRNA-ECA (52,9% menor que a densidade média do grupo controle, quantificado por densitometria óptica, $p < 0.05$).

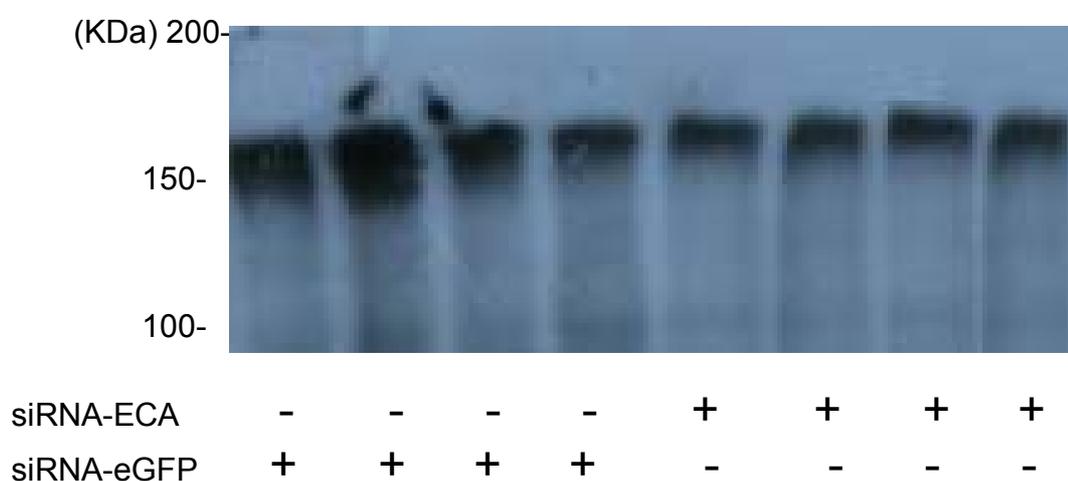
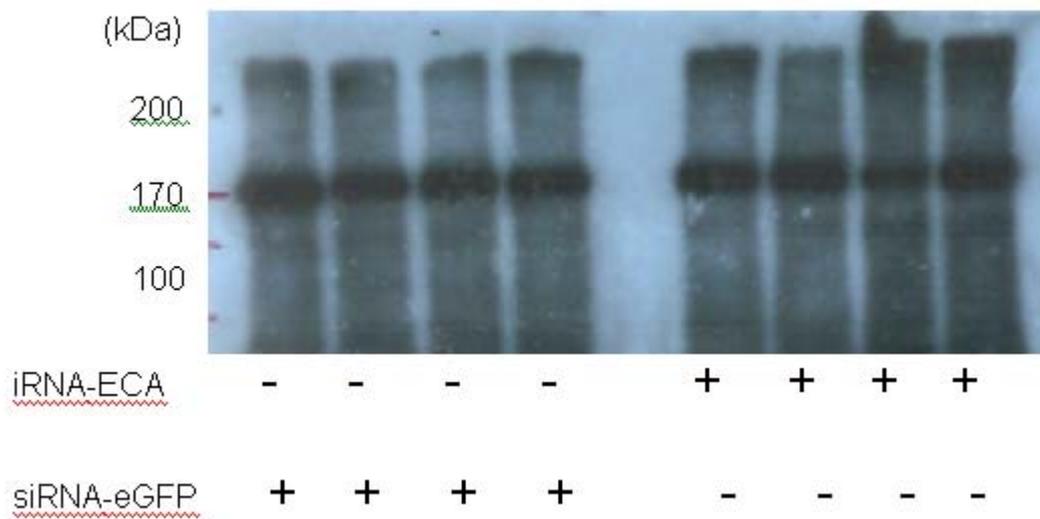
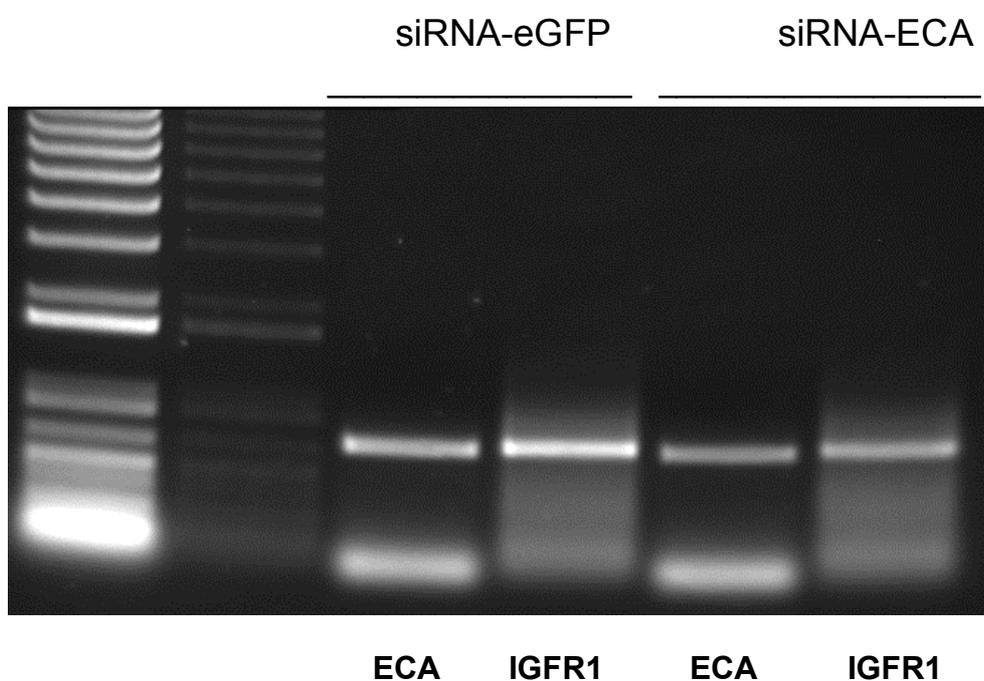


Figura 5: “Immunoblot” para ECA de rato nos pulmões (“pool” de 2 a 3 amostras) de 10 animais controles (siRNA-eGFP) e de 09 animais tratados com siRNA-ECA. Note o perfil similar de expressão da ECA.



A análise semi-quantitativa de RT-PCR em tecidos não foi capaz de revelar qualquer modificação na expressão de RNAm para a ECA nos rins de animais tratados com siRNA-ECA em comparação com o controle interno (RNAm para IGFR1) e em comparação com o grupo de animais controle (siRNA-eGFP) (Figura 6).

Figura 6: RT-PCR para ECA e IGFR1 (controle interno) de extratos teciduais (“pool” total) de rins de animais do grupo tratado (siRNA-ECA) e do grupo controle (siRNA-eGFP). Note o perfil similar de expressão do RNAm para a ECA nos dois grupos.



RESULTADOS

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez, para o nosso conhecimento, a ação anti-hipertensiva de um pequeno RNA interferente de dupla fita (21 pares de base) dirigido contra o gene da enzima conversora da angiotensina (siRNA-ECA) em ratos espontaneamente hipertensos. A redução da pressão arterial induzida pelo siRNA-ECA administrado sistemicamente em uma única dose foi duradoura (a partir do 2º dia até o 4º dia de registro) e acompanhada por frequência cardíaca média inalterada e redução do componente de muito baixa frequência da variabilidade da FC. O efeito anti-hipertensivo foi associado a uma redução tecido-seletiva da expressão da ECA renal sem modificação na expressão de RNAm para ECA, o que sugere um possível efeito microRNA, atenuando especificamente o processo de tradução e formação da ECA, pelo menos nos rins.

O emprego de agentes anti-hipertensivos que modificam o funcionamento do sistema renina angiotensina data de cerca de 40 anos quando foram pela primeira vez isolados peptídeos extraídos do veneno da cobra jararaca (*Bothrops jararaca*), os quais eram capazes de bloquear a enzima de conversão da angiotensina I (ECA) (Ferreira, 1965). O emprego de inibidores da ECA ganhou grande importância a partir de 1978, com a síntese do primeiro inibidor da ECA não peptídico, o captopril (Cushman et al., 1977). Paralelamente, no início dos anos 70, foram sintetizados os primeiros antagonistas peptídicos não seletivos da angiotensina II, entre os quais, a saralasin (Pals et al., 1971), a qual foi muito empregada em estudos de avaliação do papel do sistema renina angiotensina na patogênese de diferentes formas de hipertensão (Bumpus et al., 1973). No final dos anos 80, o uso de antagonistas da angiotensina passou a ser bastante prescrito, após a síntese dos primeiros antagonistas seletivos não peptídicos da angiotensina II (Wong et al., 1990). Tais agentes farmacológicos são hoje uma das principais opções terapêuticas no

tratamento da hipertensão arterial sistêmica tendo um grande impacto na morbimortalidade associada à hipertensão. Além disso, estas drogas não somente reduzem a pressão, como também apresentam uma grande gama de efeitos secundários protetores em órgãos alvo. Vale ressaltar que a eficácia terapêutica dos agentes que modificam o sistema renina angiotensina vem apenas comprovar de forma indireta o papel fundamental desempenhado pelo sistema renina angiotensina na patogênese da hipertensão essencial humana, bem como na hipertensão genética experimental em animais de laboratório (Mullins et al., 2006).

Embora nos dias atuais uma vasta gama de agentes anti-hipertensivos excelentes estejam comercialmente disponíveis para o tratamento da hipertensão arterial, problemas cardiovasculares relacionados à hipertensão continuam a afetar milhões de pessoas ao redor do mundo. Além disso, muitas drogas são caras e assim não disponíveis para os segmentos mais pobres da sociedade. Um outro problema é a detecção: a hipertensão arterial é indetectada em cerca de ≈30% da população norte-americana, de acordo com o sétimo relatório do Comitê Nacional Conjunto dos Estados Unidos – JNC-VII (Chobanian et al., 2003). Entre os hipertensos diagnosticados, apenas cerca de 54% dos pacientes recebem tratamento. O problema se torna ainda maior se levarmos em consideração que cerca de somente 28% dos pacientes com hipertensão diagnosticada tomam medicação regularmente (Chobanian et al., 2003).

Claramente, pode-se observar que existe uma necessidade grande de repensar a abordagem atual do tratamento da hipertensão essencial. A detecção de novos casos de hipertensão poderia ser aumentada por educação dos pacientes. Tratamento não-farmacológico, tais como exercício físico, perda de peso e dietas de

baixo sal, os quais provêm um tratamento barato, tem provado ser de baixa aderência. Assim mesmo, para o tratamento da hipertensão em uma escala mundial, nós necessitamos desenvolver modos que possam melhorar o controle da hipertensão por prover efeitos de longo prazo com uma única dose e com efeitos colaterais reduzidos, a fim de aumentar a aderência ao tratamento.

A terapia gênica somática, que na hipertensão começou a ser desenvolvida no início dos anos 90 (Guyko et al, 1993; Phillips, et al., 2001) pode representar uma dessas alternativas para se atingir o controle prolongado da hipertensão arterial. Duas abordagens têm sido adotadas: uma usada com o intuito de aumentar atividade de genes vasodilatadores (Chao e Chao, 1997) e outra com o objetivo de reduzir a atividade de genes vasoconstrictores (Phillips, et al., 2001). Estas duas abordagens representam os dois lados da transferência de DNA para dentro das células somáticas: a abordagem “sense” (i.e., direção da seqüência de DNA normal) e a abordagem “antisense” (i.e., direção de seqüência de DNA oposta).

Chao e Chao (1997) têm uma série de estudos de transferência de genes que atuam para aumentar proteínas vasodilatadoras. Eles usaram genes tais como calicreína, peptídeo natriurético atrial, adrenomedulina e NO sintase endotelial (Chao e Chao, 1997). Em diferentes modelos de hipertensão arterial em ratos (SHR, hipertensão Dahl sal-sensível, modelo DOCA, etc.) eles mostraram que eles poderiam atingir efeitos redutores de pressão arterial por 3 a 12 semanas com a hiperexpressão destes genes. A queda resultante na pressão variou de -21 a -41 mmHg. Ainda que os efeitos não fossem prolongados, reduções em lesões de órgãos alvo foram também verificadas (Dobrzynski et al., 1999). A transfecção de DNA pode ser feita utilizando-se de vetores virais (adenovírus) ou DNA plasmidial. Entretanto, o

uso de vetores adenovirais para o implante de DNA limita a possibilidade de transportar estas estratégias para seres humanos, ao menos para o período atual. O uso de plasmídeos ou DNA “naked”, por outro lado tem a desvantagem de trazer uma baixa capacidade de incorporação no genoma e efeitos mais discretos e menos duradouros.

Para reduzir a hiper-expressão de um dado gene que desempenha um fator contribuinte crítico para a hipertensão, a terapia gênica somática “antisense” pode ser adequada. Oligonucleotídeos “antisense” provêm uma abordagem biológica altamente específica para produzir atenuação da expressão “sense” de DNA, o qual poderia estar produzindo muita proteína com perfil vasoconstrictor (Phillips, 2001). A terapia gênica “antisense” envolve a construção de um DNA “antisense” para dirigir a síntese de um RNA “antisense” ou oligonucleotídeos “antisense” os quais, por sua vez, irão inibir o RNAm desenhado especificamente para reduzir uma proteína hiper-expressa, que é crucial para o desenvolvimento da hipertensão (Phillips, 2001). Dado que a hipertensão arterial é uma doença poligênica, torna-se difícil escolher um gene candidato para a terapia gênica “antisense”. Vários genes têm sido alvo da terapia com oligonucleotídeos “antisense” (AS-ONs). Uma abordagem a ser adotada na escolha de genes alvo é concentrar-se sobre aqueles genes que já tenham sido mostrados ser alvos bem sucedidos com base na experiência com drogas farmacológicas (Ian Philips, 2001). Estes incluem os β -receptores, ECA, receptors AT-1 da angiotensina (AT₁) e o angiotensinogênio (AGT). Transferência de genes “antisense” para células somáticas pode ser realizada com abordagem *in vivo*. Pode também ser adotada uma abordagem *ex vivo*, no qual células alvo são removidas, transduzidas *in vitro* e então re-implantadas como células geneticamente modificadas. Entretanto, esta estratégia poderia não ter nenhuma aplicabilidade,

uma vez que a causa da hipertensão encontra-se na hiper-reatividade vascular e não num tecido específico. Ainda que coração, rins e cérebro sejam muito importantes para a patogênese da hipertensão (Phillips, 2001). A abordagem *in vivo* é repleta de grandes desafios. Um deles é prover oligonucleotídeos “antisense” em quantidades suficientes, sejam sozinhos (“naked”) ou incorporados a um vetor, para produzirem uma concentração suficiente para serem captados por um grande número de células. Até o presente momento, duas estratégias têm sido aplicadas no contexto da terapia gênica “antisense” da hipertensão arterial: (1) oligonucleotídeos “antisense” puros e (2) vetores virais para liberar o DNA “antisense” (Phillips, 2001).

Oligonucleotídeos “antisense” são fitas curtas de DNA sintéticos desenhados para hibridizar com uma seqüência específica de RNA mensageiro. A hibridização tem vários efeitos, entre os quais podemos destacar a estimulação da RNase H, a inibição do processo de leitura da fita de RNAm no ribossomo e prevenção do agrupamento de subunidades ribossomais responsáveis pela tradução (Phillips, 2001).

A liberação de AS-ONs pode ser realizada com injeção direta de DNA puro (“naked”), o qual tem sido demonstrada efetiva, porém de baixa magnitude. A eficiência de captação do DNA pela célula é enormemente aumentada pela liberação de DNA em lipossomas catiônicas (Zhang et al., 2000). A título de exemplo, o AS-ON-AGT, quando administrado endovenosamente, reduziu a pressão arterial significativamente quando administrado juntamente com um lipossoma. Estes resultados mostraram que o AS-ODN-AGT reduz a pressão arterial por até 7 dias com apenas uma única dose sistêmica (Makino et al., 1998).

Desde a descrição do fenômeno da interferência de RNA, por Mello e cols, 1997, seguida da descrição de vários eventos moleculares relacionados, o uso de pequenos RNA interferente tem sido preconizado como eventual estratégia terapêutica baseada em RNAi. Administrados na forma pura (“naked”), ou complexados com lipossomas ou ainda integrados em vetores virais, os siRNAs têm sido demonstrados muito eficientes em ativar de forma altamente específica a destruição do RNA mensageiro alvo, reduzindo assim a expressão da proteína alvo. Embora algumas tentativas de emprego de siRNA tenham sido feitas contra genes alvo relacionados ao sistema renina-angiotensina (receptores AT-1) seja *in vitro* (Vásquez et al., 2005) ou *in vivo* (intra-cerebroventricular) (Chen et al., 2006), para o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que um siRNA dirigido contra a ECA está sendo testado *in vivo* como agente terapêutico na redução da hipertensão arterial em SHRs.

À semelhança dos efeitos observados para AS-ODN contra proteínas do SRA, a pressão arterial de SHRs começou a reduzir-se por volta do segundo dia pós administração de dose única e permaneceu assim até o quarto dia de registro. O relativo retardo na queda da PA após a introdução do siRNA-ECA (a partir do 2º dia) deve-se à ação sobre a expressão da enzima e não sobre a atividade da enzima pré-formada e também possivelmente à cinética do “turnover” da enzima nos tecidos. A queda atingida foi moderada, em torno de 30-40 mmHg. Em função do desenho experimental do presente projeto, no qual, para a coleta de órgãos, os animais foram sacrificados no 4º dia de registro, nós não fomos capazes de observar a duração do efeito anti-hipertensivo mediado pelo siRNA-ECA.

O mecanismo de ação anti-hipertensiva pode ser atribuído à redução da expressão da ECA, a qual foi demonstrada nos rins. Porém, não nos pulmões e possivelmente nem nos vasos periféricos, onde a ECA encontra-se acoplada ao endotélio e também dissolvida no plasma. A resposta pressora à administração de angiotensina I foi mantida nos animais tratados com siRNA-ECA, corroborando com a manutenção dos níveis de expressão das ECAs pulmonar, vascular e plasmática, as quais são as responsáveis diretas pela conversão plasmática da angiotensina I em II, quando de uma administração intravenosa de angiotensina I.

A redução da pressão arterial sistêmica dos SHRs associada à redução parcial da ECA tecidual renal (em cerca de 50%) atesta a importância da ECA renal para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial sistêmica no modelo do SHR (Mullins et al., 2006). A ECA renal, ao promover a conversão de angiotensina I em II intra-renal, desempenha um importante papel na vasoconstrição renal, afetando a taxa de filtração glomerular, além de ter efeito significativo em nível tubular, já que a angiotensina II formada pela ECA da borda em escova do túbulo contorcido proximal tem uma importante ação em estimular a reabsorção de sal e água naquela região dos rins (Ikemoto et al., 1986; Mullins et al., 2006). A inadequada capacidade renal de eliminar sal e água é uma das características mais marcantes dos rins de pacientes e modelos experimentais hipertensos (Guyton, 1991).

Os parâmetros de variabilidade da PAS e PAD, tanto no domínio do tempo como no domínio da frequência não sofreram modificações ao longo do período de observação. Estes resultados contrariam até certo ponto dados da literatura que mostram um efeito dos inibidores de ECA reduzindo a variabilidade global da PA em

animais SHR cronicamente tratados (Pagani et al., 1993). As razões para esta diferença não são conhecidas, mas poderia decorrer do fato de que em nosso contexto experimental, a redução da expressão da ECA foi observada nos rins e não nos pulmões e na ECA sistêmica (estimada pela resposta pressora à angiotensina I). Como a variabilidade da PA é, de forma muito marcada, dependente de mecanismos moduladores vasomotores periféricos, é possível que uma mudança na expressão da ECA somente em nível renal não consiga reduzir a variabilidade global da PA, fato que seguramente é verificado com os inibidores de ECA em função da ação sistêmica destes fármacos.

A frequência cardíaca não sofreu modificações importantes ao longo dos quatro dias de observação após a administração do siRNA-ECA. Uma vez que neste mesmo período a pressão arterial a partir do segundo dia começou a reduzir, seria esperado que uma taquicardia reflexa fosse observada, mediada pelos barorreceptores arteriais (Chapleau et al., 1995). Curiosamente, uma característica marcante da ação anti-hipertensiva dos inibidores de ECA e dos antagonistas de receptores AT-1 da angiotensina II é a ausência de taquicardia reflexa, a qual tem sido atribuída a uma série de efeitos destes agentes farmacológicos em vários pontos do arco reflexo barorreceptor, inibindo a ativação simpática e estimulando a ativação vagal (Montano et al., 1993; Dias da Silva et al., 1994). Pelo fato de que a taquicardia também foi ausente nos animais tratados com siRNA-ECA, nós especulamos que talvez o siRNA-ECA tenha tido algum efeito em algum ponto do arco reflexo barorreceptor. Em apoio a esta hipótese, podemos citar trabalho recente de (Chen e cols, 2006), os quais demonstraram em camundongos normotensos a ação de um siRNA dirigido contra o receptor AT-1 da angiotensina II dentro do sistema nervoso central.

Uma possível ação do siRNA-ECA sobre os mecanismos de controle da frequência cardíaca também pode ser reforçada pela observação de redução do componente VLF da variabilidade da frequência cardíaca nos animais tratados com siRNA-ECA. Desde os trabalhos iniciais de (Akselrod et al., 1981), sabe-se que este componente de muito baixa frequência da variabilidade da FC é ao menos parcialmente mediado pelo sistema renina angiotensina (Akselrod et al., 1981; Taylor et al., 1998). Uma redução da expressão de ECA cardíaca poderia explicar a menor oscilação observada na faixa de VLF. Porém, experimentos adicionais fazem-se necessários para comprovar esta hipótese.

Um achado intrigante deste trabalho é a ação tecido–seletiva do siRNA-ECA, o qual reduziu a expressão da ECA nos rins, mas não nos pulmões. Como no presente trabalho outros órgãos não foram investigados, nada podemos dizer sobre a expressão de ECA nos demais tecidos. Porém, vale ressaltar que em estudos de cinética e distribuição de siRNAs em camundongos (Hasuwa et al., 2002) foi observado uma redução de expressão diferencial de eGFP em camundongos transgênicos para eGFP, sendo o fígado, o baço, os rins os órgãos mais afetados. Nestes experimentos, a via de administração foi a veia caudal. Como a mesma é tributária do plexo hemorroidário, que por sua vez drena para o sistema porta hepático e a administração do siRNA foi feita usando injeção hidrodinâmica, pode-se facilmente entender porque o fígado e o baço foram mais afetados. Além disso, como os rins também recebem cerca de $\frac{1}{4}$ do débito cardíaco, consideráveis quantidades de siRNA podem atingir este órgão. Curiosamente, fígado e baço são órgão hematopoiético e com grande quantidade de células fagocitárias, as quais poderiam estar incorporando os siRNAs através da maquinaria fagocitária intracelular. Os rins também possuem, principalmente nos túbulos contorcidos

proximais um sistema pinocítico importante capaz de pinocitar pequenos peptídeos e também oligonucleotídeos (como é o caso dos siRNAs) eventualmente filtrados no glomérulo. É possível, que talvez seja dessa forma, que os rins consigam incorporar siRNAs. Entretanto, para a confirmação destas hipóteses, mais experimentos são necessários.

Por fim, resta considerar o mecanismo pelo qual o siRNA-ECA especificamente sintetizado utilizando a plataforma Débora, da UNICAMP, exerce seu efeito de redução da expressão da ECA, pelo menos nos rins. O efeito esperado de acordo com o protocolo de construção e síntese do pequeno RNA interferente seria o da interferência de RNA, que se traduziria em queda na expressão de proteína (ECA) simultânea à queda na expressão do RNAm correspondente. Entretanto, para a nossa surpresa, os dados de RT-PCR não demonstraram uma redução esperada da expressão de RNAm específico para a ECA, o que a princípio descarta um provável efeito de interferência de RNA.

Redução de expressão de proteína associada a manutenção dos níveis de RNAm após administração de pequenos RNAs de dupla fita sugerem que estes pequenos RNAs estariam promovendo modificações no processo de tradução do RNAm, um efeito conhecido como microRNA. Este efeito ocorre quando um pequeno RNA de dupla fita com grande especificidade, porém não completa, se hibridiza com o RNAm alvo específico. Como a complementaridade de base não é total, a região sem pareamento de bases acaba formando alças não hibridizadas que acabam por modificar a conformação espacial do RNAm. Isto tem como principal consequência um acoplamento espacial inadequado do RNAm com o ribossomo e a consequente inibição do processo de tradução e síntese da proteína

alvo específica. Em outras palavras, o microRNA reduz a expressão de proteína sem afetar a quantidade de RNAm específico. Este fenômeno parece ser extremamente importante como um mecanismo fisiológico de regulação da expressão gênica (Ambros, 2004). Vários microRNAs de ocorrência natural têm sido recentemente descritos em várias espécies, do verme às plantas, dos insetos aos mamíferos, incluindo seres humanos (Ambros, 2004). Estes microRNAs de ocorrência natural são importante por exemplo no controle de expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário (Ambros, 2004).

Se a construção do siRNA realizado pela plataforma Débora foi baseada na seqüência do cDNA obtida de um banco internacional de cDNA para rato (código do cDNA da ECA do rato Wistar: N01224), o pareamento entre o RNAm e o siRNA sintetizado deveria ser total e deveríamos portanto observar um efeito de interferência de RNA e não de microRNA. Uma possível explicação para o achado no presente trabalho seria a existência na seqüência de bases do RNAm da ECA de ratos SHR de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) exatamente na posição entre os nucleotídeos 2024 e 2045 do RNAm. Entretanto, a busca de seqüência similares usando a base de dados pública BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi) mostra apenas a similaridade com a seqüência expressa para o gene da ECA do rato Wistar (*Rattus norvergicus*). Como os animais SHR de nosso biotério encontram-se em isolamento reprodutivo a pelo menos 30 gerações, não podemos descartar eventuais mutações pontuais, as quais poderiam explicar os efeitos observados. Entretanto, a comprovação desta hipótese seguramente deverá passar pela genotipagem do gene da ECA dos animais SHR de nosso biotério, o que está sendo programado para um futuro próximo.

Este trabalho possui algumas limitações importantes. Entre elas destacamos o registro da pressão arterial por apenas 04 dias, o que impediu o conhecimento da duração do efeito do pequeno siRNA administrado. Uma outra limitação importante é que apenas dois tecidos foram avaliados quanto à expressão de proteína, o que também impede o conhecimento do nível de abrangência da redução de expressão da ECA em outros tecidos. Terceiro, em função da observação de um eventual efeito de microRNA, o seqüenciamento do gene da ECA dos animais de nossa colônia se faz imperativo, para a adequada explicação do fenômeno observado. Experimentos adicionais em nosso laboratório estão sendo planejados no intuito de suplantar estas limitações.

CONCLUSÃO

A análise de Western-blot em tecidos revelou uma redução de 52,9% na expressão da ECA nos rins dos animais tratados em comparação com o controle sem modificação no nível de expressão da ECA pulmonar. Como a expressão de RNAm para a ECA não foi modificada, os resultados do presente trabalho sugerem que um siRNA específico para o gene da ECA, administrado intravenosamente, pode atuar *in vivo* por um provável efeito de microRNA, atenuando de forma tecido-seletiva a expressão da ECA, com grande repercussão sobre a pressão arterial sistêmica, apontando o uso de pequenos RNAs interferentes como uma promissora estratégia terapêutica no tratamento da hipertensão arterial sistêmica.

BIBLIOGRAFIA

AKSELROD, S.; GORDON, D.; UBEL, F.A.; SHANNON, D.C.; BERGER, A.C.; COHEN, R.J. **Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control.** Science. 1981, Jul 10;213(4504):220-2.

AMARZGUIOUI, M.; PRYDZ, H.. **An algorithm for selection of functional siRNA sequences.** Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 16;316(4):1050-8.

AMBROS V. **The functions of animal microRNAs.** Nature. 431:338-378, 2004.

BASELLI G, CERUTTI S, CIVARDI S, LIBERATI D, LOMBARDI F, MALLIANI A, PAGANI M. **Spectral and cross-spectral analysis of heart rate and arterial blood pressure variability signals.** Comput. Biomed. Res. 1986 Dec;19(6):520-34.

BERNSTEIN, E.A.M; DENLI, G.J.; HANNON. 2001. **The rest is silence.** RNA. 2001 Nov;7(11):1509-21.

BIRON, P.; MONGEAU, J.G.; BERTRAND, D. **Familial aggregation of blood pressure in 558 adopted children.** Can. Med. Assoc. J.. 1976,115:773-4.

BUMPUS, F.M.; SMEBY, R.R.; SWEET, C.; FERRARIO, C.M.; KHOSLA, M.C. **Use of angiotensin II antagonists in experimental hypertension.** Circ Res.. 1973 May 5;32:Suppl 1:150-8.

CALHOUN, D.A.; BAKIR, S.E.; OPARIL, S. **2000 Etiology and pathogenesis of essential hypertension.** In: Crawford, M.H.; DiMarco, J.P.; eds. *Cardiology*. London: Mosby International; 2000:3.1-3.10.

CAPLEN, N. J. S.; PARRISH, F.; IMANI, A.; MORGOAN, F.; MORGOAN, R.A . **Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001.USA 98:9742.

CHAO, J.; CHAO, L.; KALLIKREIN. **Gene therapy: a new strategy for hypertensive diseases.** *Immunopharmacology*. 1997; 36: 229–236

CHAPLEAU, M.W.; CUNNINGHAM, J.T.; SULLIVAN, M.J.; WACHTEL, R.E.; ABOUD, F.M. **Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex.** *Hypertension*. 1995 Aug;26(2):341-7.

CHEN, P.Y.; SANDERS, P.W. **L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats.** *J. Clin. Invest.*, 88: 1559-1567, 1991.

CHEN, Y.; CHEN, H.; HOFFMANN, A.; COOL, D.R.; DIZ, D.I.; CHAPPELL, M.C.; CHEN, A.F.; MORRIS, M. **Adenovirus-mediated small-interference RNA for in vivo silencing of angiotensin AT1a receptors in mouse brain.** *Hypertension*. 2006 Feb;47(2):230-7.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J.L. JR.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T. JR.;

ROCCELLA, E.J.; **Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.** Hypertension. 2003, Dec; 42: 1206–1252.

CORVOL, P.; PERSU, A.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.P.; JEUNEMAITRE, X. **Seven Lessons from two candidate genes in human essential hypertension: angiotensinogen and epithelial sodium channel.** Hypertension. 1999; 33:1324.

CULLEN, B. R.. **RNA interference: antiviral defense and genetic tool.** Nat Immunol.. 2002; 3:597.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A.. **Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids.**Biochemistry. 1977 Dec 13;16(25):5484-91.

DIAS DA SILVA, V.J.; SILVA, S.V.; SALGADO, M.C.; SALGADO, H.C. **Chronic converting enzyme inhibition facilitates baroreceptor resetting to hypertensive levels.** Hypertension. 1994 Jan;23(1 Suppl):I68-72

DOBZYNSKI, E.; YOSHIDA, H.; CHAO, J.; CHAO, L. **Adenovirus-mediated kallikrein gene delivery attenuates hypertension and protects against renal injury in deoxycorticosterone-salt rats.** Immunopharmacology. 1999; 44: 57–65.

DONZE, O.; PICARD, D.. **RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase.** Nucleic Acids Res. 2002 May 15;30(10):e46.

ELBASHIR, S. M.; J. HARBORTH, W.; LENDECKEL , A.; YALCIN, K.; TUSCHL, W.; TUSCHL, T.. **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** Nature. 2001. 411:494.

FAZAN, JR. R.; DIAS DA SILVA, V.J.; SALGADO, H.C.. **Modelos de hipertensão arterial.** Revista Brasileira de Hipertensão. 2001, 8: 19-29.

FEINLEIB, M.; GARRISON, R.J.; FABSITZ, R.; CHRISTIAN, J.C.; HRUBEC, Z.; BORHANI, N.O.; ET AL. **The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results.** Am. J. Epidemiol.. 1997.106:284.

FERREIRA, S.H.; ROCHA, M; SILVA, M. **Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from Bothrops jararaca venom.** Experientia. 1965 Jun 15;21(6):347-9.

FIRE, A. S.; XU, M. K.; MONTGOMERY, S. A.; KOSTAS, S. E.; MELLO, D.; MELLO, C. C. **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.** Nature. 1998. 391:806.

FORNAGE, M.; AMOS, C.I.; KARDIA, S.; SING, C. F.; TURNER, S.T.; BOERWINKLE, E.. **Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme**

gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. Circulation. 1998; 97:1773.

GRISHOK, A. A. E.; PASQUINELLI, D.; CONTE, N.; LI, S.; PARRISH, I.; HÁ, D. L.; BAILLIE, A.; FIRE, G.; MELLO R.; MELLO, C.C.. **Genes and mechanism related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C.elegans* developmental timing** .Cell. 2001.106:23.

GUYTON, A.C. **Blood pressure control – special role of the kidneys and body fluids.** Science. 1991. 252:1813-6.

GYURKO, R.; WIELBO, D.; PHILLIPS, M.I.. **Antisense inhibition of AT₁ receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin.** Reg Pep.. 1993; 49: 167–174.

HANNON, G. J.. **RNA interference.** Nature. 2002. 418:244.

HANNON, G.J.; ROSSI, J.J.. **Unlocking the potencial of the human genome with RNA interference.** Nature Insights. 2004. 431: 337

HARRAP, S. B.; Genetics. In: OPARIL, S.; WEBER, M. A.; eds. **Hypertension: A Companion to Brenner and Rector`s The Kidney.** Philadelphia: WB Saunders. 2000: 29-42.

HASUWA, H.; KASEDA, K.; EINARSDOTTIR, T.; OKABE, M.. **Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats.** FEBS. Lett. 2002 Dec 4;532(1-2):227-30.

HOLEN, T.; AMARZGUIOUI, M.; WIIGER, M. T.; BABAIE, E.; PRYDZ, H. **Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor.** Nucleic Acids Res. 2002 Apr 15;30(8):1757-66.

HUNTVAGNER, G. J.; MCLACHLAN, A. E.; PASQUINELLI, E.; BALINT, T.; ZAMORE, T.; ZAMORE, P.D.. **A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.** Science. 2001. 293:834.

IKEMOTO, F.; TANAKA, M.; ITOH, S.; SONG, G.B.; TOMINAGA, M.; HIRUMA, M.; TAKADA, T.; NAKAMURA, N.; YAMAMOTO, K.. **Angiotensin converting enzyme (ACE) in the kidney: contribution to blood pressure regulation and possible role of brush-border ACE.** J. Cardiovascular Pharmacol.. 1986; 8 Suppl 10:S69-74.

JEUNEMAIRE, X.; SOUBRIER, F.; KOTELEVTSSEV, Y. V.; LIFTON, R. P.; WILLIAMS, C. S.; CHARRU, A.. **Molecular basis of human hypertension:role of angiotensinogen.** Cell. 1992;71:169-80.

JUDY, W. V.; WATANABE, A. M.; HENRY, D. P.; BESCH, H. R. JR.; MURPHY, W. R.; HOCKEL, G. M.. **Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat.** Circulation Research. 38 (Suppl 2):21-9, 1976.

KERR, S.; BROSNAN, M. J.; MCINTYRE, M.; REID, J. L.; DOMINICZAK, A. F.; HAMILTON, C. A.. **Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium.** Hypertension. 1999 Jun;33(6):1353-8.

LEVENKOVA, N.; GU, Q.; RUX, J. J.. **Gene specific siRNA selector.** Bioinformatics. 2004 Feb 12;20(3):430-2. Epub 2004 Jan 22.

LIFTON, R. P.; GHARAVI, A. G.; GELLER, D. S.. **Molecular mechanismms of human hypertension.** Cell. 2001;104:545-56.

LIPARDI, C.; WEI, Q.; PATERSON. B. M.. **RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs.** Cell. 2001.107:297.

LONGINI, I. M. JR.; HIGGINS, M. W.; HINTON, P. C.; MOLL, P. P.; KELLER, J. B.. **Environmental and genetic sources of familial aggregation of blood pressure in Tecumseh, Michigan.** Am. J. Epidemiol.. 1984;120:131-44.

MAKINO, K.; SUGANO, M.; OHTSUKA, S.; SAWADA, S.. **Intravenous injection with antisense oligodeoxynucleotides against angiotensinogen decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats.** Hypertension. 1998; 31: 1166–1170.

MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; CERUTTI, S.. **Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain.** Circulation. 1991; 81: 537-547.

MC MANUS, M.T.; SHARP, P. A.. **Gene silencing in mammals by siRNAs.** Nat. Genet.. 2002. Rev.3:737.

MEISTER, G.; TUSCHL, T.. **Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.** Nature. 2004 Sep 16;431(7006):343-9.

MELLO, C. C.; CONTE, D. JR.. **Revealing the world of RNA interference.** Nature. 2004 Sep 16;431(7006):338-42.

MONTANO, N.; GNECCHI-RUSCONE, T.; CONTINI, M.; FINOCCHIARO, M. L.; LOMBARDI, F.; MALLIANI, A.. **Effect of captopril on sympathetic preganglionic efferent activity in cats.** Am. J. Physiol.. 1993 Feb; 264(2 Pt 2):H345-51.

MONTGOMERY, M. K.; XU, S.; FIRE, A.. **RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1998 Dec 22;95(26):15502-7.

MULLINS, L. J.; BAILEY, M. A.; MULLINS, J. J.. **Hypertension, kidney, and transgenics: a fresh perspective.** Physiol Rev.. 2006, Apr;86(2):709-46.

NAITO, Y.; YAMADA, T.; UI-TEI, K.; MORISHITA, S.; SAIGO, K.. **siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference.** *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32.

O'DONNELL, C. J.; LINDPAINNER, K.; LARSON, M. G.; RAO, V. S.; ORDOVAS, J. M.; SCHAEFER, E. J.. **Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study.** *Circulation.* 1998;97:1766-72.

OKAMOTO, K., AOKI, K.. **Development of a strain of spontaneously hypertensive rats.** *Jpn. Circ. J.* 1963 Mar;27:282-93.

PAGANI, M.; LUCINI, D.; PIZZINELLI, P.; BRERA, V.; SOMMARIVA, D.; DI MICHELE, R.; MALLIANI, A..**The effects of chronic cilazapril treatment on sympathetic vasomotor tonus: a spectral analysis study of pressure variability.** *Cardiologia.* 1993 Mar;38(3):149-56

PALS, D. T.; MASUCCI, F. D.; SIPOS, F.; DENNING, G. S. JR.. **A specific competitive antagonist of the vascular action of angiotensin II.** *Circ Res.* 1971 Dec; 29(6):664-72.

PHILLIPS, I. M.. **Gene Therapy for Hypertension: The Preclinical Data.** *Hypertension.* 2001;38:543.

PHILLIPS, M. I.. **Gene therapy for hypertension: sense and antisense strategies.**

Expert Opin Biol Ther. 2001 Jul;1(4):655-62.

REYNOLDS, A.; LEAKE, D.; BOESE, Q.; SCARINGE, S.; MARSHALL, W. S.;

KHVOROVA, A.. **Rational siRNA design for RNA interference.** Nat Biotechnol.

2004 Mar;22(3):326-30.

SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P.

D..**Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** Cell. 2003 Oct

17;115(2):199-208.

SIJEN, T.; J. FLEENOR; F. SIMMER; K. L.; THIJSSSEN, S.; PARRISH, L.; TIMMONS,

R. H.; FIRE, P.; FIRE, A.. **On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered**

gene silencing. Cell. 2001,107:465.

STAESSEN, J. A.; KUZNETSOVA, T.; WANG, J. G.; EMELIANOV, D.; VLIETINCK,

R.; FAGARD, R.. **M235T angiotensinogen gene polymorphism and**

cardiovascular renal risk. J. Hypertens.. 1999;17:9-17.

SVOBODA, P.; STEIN, P.; HAYASHI, H.; SCHULTZ, R. M.. **Selective reduction of**

dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development.

2000, 127:4147.

TAYLOR, J.A.; CARR, D.L.; MYERS, C.W.; ECKBERG, D.L. **Mechanisms underlying very-low-frequency RR-interval oscillations in humans.** Circulation. 1998 Aug 11;98(6):547-55.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L.. **Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension.** Histochem Cell Biol. 2004 Oct;122(4):339-52. Epub 2004 Aug 26.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D.. **Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat.** Circ Res. 1981 Mar;48(3):309-19.

TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D.; LEHMANN, R.; BARTEL, D. P.; SHARP, P. A.. **Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro.** Genes Dev.. 1999. 13:3191.

VÁZQUEZ, J.; CORREA DE ADJOUNIAN, M. F.; SUMNERS, C.; GONZÁLEZ, A.; DIEZ-FREIRE, C.; MOHAN K.. **Raizada Selective Silencing of Angiotensin Receptor Subtype 1a (AT_{1a}R) by RNA Interference.** Hypertension. Jan 2005; 45: 115 - 119.

WIANNY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M.. **Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development.** Nat. Cell Biol.. 2000. 2:70.

WONG, P. C.; HART, S. D.; ZASPEL, A. M.; CHIU, A. T.; ARDECKY, R. J.; SMITH, R. D.; TIMMERMANS, P. B.. **Functional studies of nonpeptide angiotensin II**

receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (All-1) and PD123177 (All-2).J

Pharmacol. Exp. Ther.. 1990 Nov; 255(2):584-92.

YAMADA, T.; MORISHITA, S.. **Accelerated off-target search algorithm for siRNA.**

Bioinformatics. 2005 Apr 15;21(8):1316-24.

YAMORI, Y.. **Animal models for hypertension.** Nippon Rinsho. 1984

Feb;42(2):258-70.

YIU, S. M.; WONG, P. W.; LAM, T. W.; MUI, Y. C.; KUNG, H. F.; LIN, M.; CHEUNG,

Y. T.. **Filtering of ineffective siRNAs and improved siRNA design tool.**

Bioinformatics. 2005 Jan 15;21(2):144-51. Epub 2004 Aug 27.

YUAN, B.; LATEK, R.; HOSSBACH, M.; TUSCHL, T.; LEWITTER, F.. **siRNA**

Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server.

Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32.

ZAMORE, P. D.. **RNA interference : listening to the sound of silence.** Nat Struct.

Biol.. 2001. 8:746.

ZHANG, Y. C.; BUI, J. D.; SHEN, L. P.; PHILLIPS, M. I.. **Antisense inhibition of β_1 -**

adrenoceptor mRNA in a single dose produces and profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats.

Circulation. 2000; 101: 682–688.