



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102017006904-4 A2

(22) Data do Depósito: 04/04/2017

(43) Data da Publicação: 30/10/2018



(54) Título: AUMENTO DA EFICÁCIA DE SUPRESSÃO DE EXPRESSÃO DE GENES POR MEIO DO USO DE MOLÉCULAS DE RNA COM ESTRUTURA ESTABILIZADA

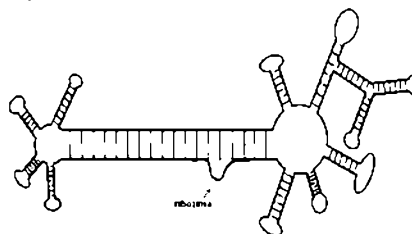
(51) Int. Cl.: C12N 15/113; C12N 15/63; C12N 15/82; C12N 1/21; A01P 7/04; (...)

(73) Titular(es): EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

(72) Inventor(es): LEONARDO LIMA PEPINO DE MACEDO; MARIA FÁTIMA GROSSI DE SÁ; MARIA CRISTINA MATTAR DA SILVA; RAYSSA ALMEIDA GARCIA; RENEIDA APARECIDA GODINHO MENDES; ÉRIKA VALÉRIA SALIBA ALBUQUERQUE FREIRE

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/04/2017

(57) Resumo: A presente invenção descreve um novo e inventivo método de construção de moléculas de ácido nucléico estruturadas com o objetivo de aumentar sua estabilidade e sua eficiência na supressão da expressão de genes alvo em diferentes organismos, provendo detalhes que direcionam sua execução. A invenção ainda provê moléculas de ácido nucléico e outros elementos, assim como plantas que incorporem tais elementos, demonstrando sua efetividade no controle de diferentes espécies de pragas agrícolas e ilustrando uma das diversas possibilidades de aplicação.



RELATÓRIO DESCRITIVO DE PATENTE DE INVENÇÃO

AUMENTO DA EFICÁCIA DE SUPRESSÃO DE EXPRESSÃO DE GENES POR MEIO DO USO DE MOLÉCULAS DE RNA COM ESTRUTURA ESTABILIZADA

CAMPO DA INVENÇÃO

[1] A presente invenção trata de tecnologia no campo da Biologia Molecular e da manipulação de genes, abordando uma estratégia de construção de moléculas de ácido nucléico com o objetivo de aumentar sua eficiência na supressão da expressão de genes alvo. Também são apresentadas construções e outros agentes associados à manipulação de genes. Em particular, os elementos da presente invenção estão relacionados ao silenciamento de genes. Também são abordadas possíveis aplicações da presente invenção em sistemas de manejo de populações de insetos e no combate a pragas agrícolas.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

[2] RNA interferente (RNAi) é um mecanismo de regulação gênica pós transcricional altamente conservado em eucariotos, participando de vários processos biológicos do desenvolvimento e do metabolismo (Zhang, S.; Liu, Y.; Yu, B. PRL1, an RNA-binding protein, positively regulates the accumulation of miRNAs and siRNAs in Arabidopsis. Plos Genetics. Volume 10, número 12, 1-9, 2014.), em que um dsRNA (double stranded RNA, em português, RNA dupla fita) aciona a inibição do seu RNA mensageiro (mRNA) homólogo (Ongvarrasopone, C.; Roshorn, Y.; Panyim, S. A Simple and Cost Effective Method to Generate dsRNA for RNAi Studies in Invertebrates. Science Asia. Volume 33, 35 - 39, 2006.). Além de fazer parte da regulação gênica, este mecanismo funciona como uma defesa contra ácidos nucléicos externos, como retroelementos e transposons, e também está envolvido na acurácia da segregação da cromatina durante a divisão celular (Wassenegger, M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. Cell. Volume 122, 13-16, 2005.).

Desde a sua descoberta, a estratégia de RNAi tem sido bastante aplicada em genética reversa para promover a supressão de certos genes, visando, principalmente, a descoberta de suas funções (Ramaswamy, G.; Slack, F. J. siRNA: a guide for RNA silencing. *Chemistry & Biology*. Volume 9, 1053-1057, 2002.). O RNAi pode ser usado para a identificação de genes, no combate de patógenos, para gerar plantas e animais transgênicos e para o controle de tumores e doenças genéticas (DOGINI, D. B. *et al.* The new world of RNAs. *Genetics and Molecular Biology*. Volume 37, número 1, 285-293, 2014.). Sendo assim, o possível uso do bloqueio da expressão de genes específicos por esse mecanismo é uma estratégia em potencial para o controle de insetos-praga (Burand, J. P.; Hunter, W. B. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*. Volume 12, 68 - 74, 2013).

[3] Há duas vias de silenciamento por RNAi em eucariotos: a de microRNA (mirNAs) e a de siRNA (small interfering RNA, em português, RNA pequeno de interferência) (Bansal, R.; Michel, A. P. Core machinery and Sid1, a component for systemic RNAi in the Hemipteran insect, *Aphis glycines*. *International Journal of Molecular Sciences*. Volume 14, 3786-3801, 2013.). miRNAs são produtos de um gene não codante (Chen, X. MicroRNA biogenesis and function in plants. *Federation of European Biochemical Societies*. Volume 579, 5923-5931, 2005) e possuem entre 20 a 25 nucleotídeos, sendo produzidos em duplex a partir de pri-miRNAs, que são transcritos primários (Zhang, S.; Liu, Y.; Yu, B. PRL1, an RNA-binding protein, positively regulates the accumulation of miRNAs and siRNAs in *Arabidopsis*. *Plos Genetics*. Volume 10, número 12, 1-9, 2014). A via de miRNA utiliza produtos endógenos transcritos do genoma celular, com estrutura de dsRNA, a fim de regular processos biológicos (Katoch, R.; Sethi, A.; Thakur, N.; Murdock, L. L. RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 171, 847 - 873, 2013.). Já para o siRNA, o dsRNA é clivado pela Dicer-2 (Nishida, K. M. *et al.* Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Molecular Cell*. Volume 49, 680-691, 2013.) e é constituído de duas fitas de RNA hibridizadas, cada uma com 21 nucleotídeos, com cada fita contendo dois nucleotídeos sobressalentes na região 3' (Snead, N. M *et al.* Molecular basis for improved gene silencing by Dicer substrate

interfering RNA compared with other siRNA variants. *Nucleic Acid Research*. Volume 41, número 12, 6209-6221, 2013.). A via de siRNA está envolvida na defesa contra dsRNA exógeno e transposons (Koch, A.; Kogel, K.-H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal*. Volume 12, 821-831, 2014.) e a especificidade do RNAi está relacionada com a sequência de bases, em que uma das fitas do dsRNA é específica ao gene transcrito (Katoch R. *et al*, RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 171, 847 - 873, 2013.).

[4] O dsRNA, uma vez no citoplasma da célula, é clivado pela enzima Dicer em fragmentos que possuem entre 20 e 25 pares de base, com dois pares de base livres na extremidade 3' (Scott J. G. *et al*, Towards the Elements of Successful Insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*. Volume 59, 1212 - 1221, 2013.). A enzima Dicer é capaz de reconhecer e clivar moléculas longas de dsRNA e gerar pequenos fragmentos de RNA (Buchon, N.; Vaury, C. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*. Volume 96, 195 - 202, 2006.). A Dicer-1 processa pre-miRNAs em miRNAs, enquanto a Dicer-2 processa longos dsRNAs em siRNAs, respectivamente (Hutvagner, G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *Federation of European Biochemical Societies*. Volume 579, 5850-5857, 2005.). Esses fragmentos de RNA são incorporados em um complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA chamado RISC (RNA-induced silencing complex), em que uma das fitas, a fita passageira, é eliminada, e a outra fita, a fita guia, é retida. Uma proteína Argonauta com domínio RNase H cliva o RNA mensageiro (mRNA) com sequência complementar à fita guia, que serve de template (Scott, J. G. *et al*. Towards the Elements of Successful Insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*. Volume 59, 1212 - 1221, 2013). Um dos passos mais importantes para o silenciamento por RNAi é a clivagem dos mRNA transcritos guiada pelo siRNA, realizada pela proteína Argonauta (Faehnle, C. R.; Joshua-Tor, L. Argonautes confront new small RNAs. *Current Opinion in Chemical Biology*. Volume 11, número 5, 569-577, 2007.). Os miRNAs são incorporados à Ago1, enquanto siRNAs são incorporados à Ago2 (Nishida, K. M. *et al*. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the

endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Molecular Cell*. Volume 49, 680-691, 2013). O nível de complementaridade entre a molécula a ser silenciada (mRNA) e a molécula silenciadora (siRNA/miRNA) determina o destino do mRNA, que pode ou ser degradado imediatamente, ou ter sua tradução interrompida (Tijsterman, M.; Plasterk, R. H. A. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. *Cell*. Volume 117, 1-4, 2004.), causando a perda de sua função gênica (Miller, S. C *et al.* Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. *Plos One*. Volume 7, 1 - 14, 2012.). O RNAi possui efeito sistêmico e este pode ser dividido em dois passos: captação do RNA pelas células e propagação sistêmica de seu efeito (Kobayashi, I *et al.* SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 42, 148 - 154, 2012.).

[5] Em experimentos em insetos, há várias maneiras de absorção do dsRNA:

- a) Microinjeção: o dsRNA é sintetizado *in vitro* e injetado na hemolinfa do inseto, ocasionando altos níveis de inibição da expressão gênica.
- b) Ingestão: o inseto pode ser alimentado com dsRNA sintetizado *in vitro* ou com bactérias que expressem a molécula de dsRNA. Este método é mais natural e menos invasivo que a microinjeção, causando menos danos ao inseto. Entretanto, alguns estudos de RNAi em insetos por alimentação não obtiveram os resultados desejados, não causando o silenciamento esperado; todavia, muitos insetos foram suscetíveis aos efeitos do RNAi pela ministração oral.
- c) Soaking: nesta técnica, o inseto ou células do inseto são embebidas em uma solução que contenha dsRNA, não sendo muito eficiente para o inseto todo, devido a barreiras de seu corpo, como a cutícula. Este método é aconselhável apenas para certos tipo celulares de insetos específicos e em estágios de desenvolvimento que absorvam dsRNA do meio (Katoch, R.; Sethi, A.; Thakur, N.; Murdock, L. L. RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 171, 847 - 873, 2013).

[6] Em 2007, Baum e colaboradores demonstraram ser possível o uso do RNAi em plantas transgênicas para controlar o coleoptero *Diabrotica virgifera virgifera*. Neste estudo, os insetos foram alimentados com dsRNA relativo ao gene *V-ATPase*, tanto em dieta artificial quando em planta transgênica. Em ambos os casos houve a mortalidade dos insetos e, na planta, transgênica, houve a diminuição do dano causado nas raízes das plantas. Em 2007 e 2011, Mao e colaboradores fizeram estudos com *H. armigera*, em que o inseto foi alimentado com planta transgênica, expressando dsRNA de *CYP6AE14*; neste caso, o crescimento da larva foi atrasado e as plantas transgênicas foram menos danificadas que as plantas controle.

[7] A maioria dos trabalhos realizados com insetos e RNAi foi através de microinjeção na hemocele do inseto. Este método é muito eficiente para estudos de validação de genes, já que são necessárias pequenas quantidades de dsRNA. Entretanto, a microinjeção não é viável para a defesa dos cultivares contra insetos-praga. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas para que o inseto entre em contato com o dsRNA através da alimentação (Burand, J. P.; Hunter, W. B. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology*. Volume 12, 68 - 74, 2013). Uma dessas técnicas é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (GM) que expressem o dsRNA para o gene alvo, para que seja uma fonte autônoma e regular de dsRNA para o inseto (Katoch, R.; Sethi, A.; Thakur, N.; Murdock, L. L. RNAi for Insect Control: Current Perspective and Future Challenges. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 171, 847 - 873, 2013). Nesses casos, o primeiro local que o dsRNA entrará em contato no inseto será o intestino (Price, R. G.; Gatehouse, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Cell*. Volume 26, número 7, 393-400, 2008.).

[8] O efeito do RNAi em insetos ocorre como resultado de sua alimentação, que é mediada pela exposição do alimento ao intestino médio (Price, R. G.; Gatehouse, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. *Cell*. Volume 26, número 7, 393-400, 2008.). Entretanto, a ação de nucleases presentes no intestino do inseto é um problema a ser solucionado para que o RNAi tenha aplicabilidade em campo para o controle de insetos (Katoch, R.; Thakur, N. Insect Gut Nucleases: a Challenge for RNA interference

mediated insect control strategies. International Journal of Biochemistry and Biotechnology. Volume 1, 198 - 203, 2012.).

[9] Em 2007, Arimatsu e colaboradores identificaram no suco gástrico do bicho da seda, *Bombyx mori*, uma nuclease alcalina, capaz de digerir dsRNA e em 2014, Wynant e colaboradores demonstraram que há atividade de degradação de dsRNA no intestino de *Schistocerca gregaria* e que, quando inibida essa atividade, o dsRNA não sofre degradação. Sendo assim, a inibição das nucleases presentes nos intestinos de insetos-praga é um obstáculo a ser enfrentado para que a tecnologia do RNAi seja eficaz para o combate deste mal.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO:

[10] Na presente invenção são apresentados polinucleotídeos estruturados de forma a melhorar sua estabilidade com o objetivo de aumentar sua efetividade da supressão da expressão de genes alvo. Tal característica pode ser usada como estratégia no controle de pragas agrícolas, por exemplo.

[11] Nesse sentido, a invenção se refere a um polinucleotídeo sintético que apresenta uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos, uma segunda região com o complemento da primeira sequência e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima.

[12] A invenção ainda se refere a gene quimérico contendo tal polinucleotídeo e promotor ativo, operacionalmente ligado ao mesmo. Também é previsto um vetor que compreenda o polinucleotídeo.

[13] A presente invenção ainda prevê uma sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida à partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico que compreenda o referido polinucleotídeo.

[14] Outro objeto da invenção é um método de aumentar estabilidade de molécula de um ribonucleotídeo caracterizado por incluir na construção da molécula regiões de

travas de incompatibilidade que conferem forma específica à molécula, possibilitando que suas extremidades se liguem.

[15] Também é previsto um método de supressão de expressão gênica caracterizado por utilizar molécula nucleotídica que compreenda o referido polinucleotídeo, assim como um método de transformação de organismo no qual se insere, no dito organismo, uma molécula de ácido nucléico que compreenda o dito polinucleotídeo. Dessa forma, a invenção aborda a planta e/ou o microorganismo transformado compreendendo uma molécula de ácido nucléico que compreenda o dito polinucleotídeo, assim como uma semente transgênica ou parte propagativa de tal planta.

[16] Também é objeto da invenção um método de controle de pragas caracterizado por expor a dita praga a molécula de ácido nucléico que compreenda o dito polinucleotídeo.

[17] O referido polinucleotídeo pode apresentar a seguinte configuração:

- a) Uma primeira região com sequência de ácidos nucléicos conforme sequência descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13;
- b) Uma segunda região com o complemento da sequência de (a);
- c) Uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17.

[18] Dessa forma, a invenção também prevê gene quimérico que contenha o polinucleotídeo na configuração acima descrita e um promotor gênico ativo operacionalmente ligado a ele, assim como um vetor que compreenda o mesmo polinucleotídeo, a sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida à partir da expressão de qualquer dessas moléculas e um método de supressão de expressão gênica que utilize o polinucleotídeo descrito no parágrafo anterior.

[19] Outro objeto da invenção é um método de aumentar estabilidade de molécula de um ribonucleotídeo caracterizado por incluir na construção da molécula regiões nucléicas de travas de incompatibilidade conforme as sequências SEQ ID No 4, SEQ ID No 6, SEQ ID No 8, SEQ ID No 14, SEQ ID No 16 e/ou SEQ ID No 18.

[20] A invenção ainda prevê um método de transformação de organismo no qual se insere no dito organismo uma molécula de ácido nucléico compreendendo o

polinucleotídeo contendo na primeira região com sequência de ácidos nucleicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No3 ou em SEQ ID No 11; uma segunda região com o complemento da sequência anterior e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17. Ainda é previsto o microorganismo ou a planta transformada contendo a molécula de ácido nucleico, assim como uma semente transgênica ou parte propagativa desta planta.

[21] Outro aspecto da invenção é um método de controle de pragas no qual a praga é exposta a molécula de ácido nucleico compreendendo o polinucleotídeo contendo uma primeira região com sequência de ácidos nucleicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13; uma segunda região com o complemento da sequência anterior e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[22] Figura 1: Esquema do cassete de expressão do dsRNA estruturado. O cassete gênico para transcrição contém promotor, terminador e ribozimas Rib5', Rib3' flanqueando as extremidades 5' e 3' das sequências do dsRNA, respectivamente, além da ribozima Rib4, que ativa o dsRNA estruturado. A região da sequencia senso e antisense contém a sequencia alvo.

[23] Figura 2: Mortalidade de fêmeas de *A. grandis* silenciadas com o dsRNA linear e o dsRNA estruturado de AntgCHS2.

[24] Figura 3: Efeito do silenciamento de AntgCHS2 com o dsRNA linear e o dsRNA estruturado sobre oviposição de fêmeas de *A. grandis*.

[25] Figura 4: Efeito do dsRNA de AntgCHS2 com o dsRNA linear e o dsRNA estruturado sobre a viabilidade de ovos de *A. grandis*.

[26] Figura 5: Contabilização do número total de galhas em todas as raízes de plântulas de soja; transformadas com o dsRNA-estruturado-Minc; dsRNA Minc-não estruturado e planta controle (não transformada). Os dados obtidos foram

estatisticamente analisados pelo sistema Sirvar 5.6 aplicando o teste Tukey e Scott-Knott.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS ANEXO:

[27] Figura 1A: Localização subcelular do dsRNA estabilizado. O dsRNA marcado com Cy3, segundo o protocolo do fabricante, foi localizado no cloroplasto de células de folhas de *A. thaliana*, região que foi desenhado para ser endereçado (a). O corante Cy3 e o dsRNA linear marcado com Cy3 não ficaram localizados em nenhum local específico da planta (b) e (c). Em (d) e (e) encontram-se os controles negativos com água, em raiz e em folha, respectivamente.

[28] Figura 2A: Seleção de raízes de plântulas de soja transformadas com o dsRNA do gene efetor, por meio da expressão de GFP, detectada pela coloração verde sob luz ultravioleta (488 nm excitação e 505–530 nm de emissão).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[29] A presente invenção descreve um novo e inventivo método de aumento de estabilidade de molécula de RNA com o objetivo de também melhorar sua eficiência na supressão da expressão de genes. No contexto dessa descrição, inúmeros termos serão utilizados e por isso serão melhor detalhados a seguir.

[30] O termo “ácido nucleico” refere-se a uma molécula a qual pode ser fita simples ou fita dupla, composta de monômeros (nucleotídeos) contendo um açúcar, um fosfato e uma base purina ou pirimidina. Um “fragmento de ácido nucleico” é uma fração de uma dada molécula de ácido nucleico. “Complementariedade” refere-se ao pareamento específico de bases purinas e pirimidinas que consistem de ácidos nucleicos: pares de adenina com timina e pares de guanina com citosina. Então, o “complemento” de um primeiro fragmento de ácido nucleico refere-se ao segundo fragmento de ácido nucleico cuja sequência de nucleotídeos é complementar à primeira sequência de nucleotídeos.

[31] Em organismos mais complexos, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é um ácido nucléico que contém a informação do material genético de um dado organismo, enquanto o ácido ribonucleico (RNA) é um ácido nucléico que está envolvido na transferência da informação do DNA em proteínas. Um “genoma” é toda parte principal do material genético contida em cada célula de um organismo. O termo “sequência de nucleotídeo” refere-se às sequências de polímeros de nucleotídeos, formando uma fita de DNA ou RNA, as quais podem ser simples ou dupla-fita, opcionalmente sintéticas, não naturais ou com bases de nucleotídeos alteradas capazes de incorporação dentro de polímeros de DNA ou RNA. O termo “oligômero” refere-se a sequências curtas de nucleotídeos, usualmente até 100 bases de comprimento. O termo “homólogo” faz referência à ligação ancestral entre as sequências de nucleotídeos de duas moléculas de ácido nucleico ou entre as sequências de aminoácidos de duas moléculas de proteínas. A estimativa de tal homologia é provida através da hibridização de DNA-DNA ou RNA-RNA sob condições de estringência como definido no estado da técnica (como mencionado no documento US20030074685, Hames, B. D. and Higgins, S. J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, IRL Press Oxford, U.K); ou pela comparação de similaridade de sequência entre duas moléculas de ácido nucleico ou proteína (como mencionado no documento US20030074685, Needleman et al., *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453).

[32] “Gene” refere-se ao fragmento de nucleotídeo que expressa uma proteína específica, incluindo sequências regulatórias precedentes (região 5’ não traduzida) e posteriores (região 3’ não traduzida) à região codificadora. “Gene nativo” refere-se a um gene isolado com sua própria sequência reguladora encontrada na natureza. “Gene quimérico” refere-se ao gene que compreende combinações de sequências codificadoras, regulatórias e heterogêneas não encontradas na natureza. O gene quimérico da presente invenção compreende moléculas isoladas de ácido nucleicos, na orientação sense ou antisense, ligadas operacionalmente a promotores ativos. Construções gênicas da presente invenção podem conter um ou mais genes quiméricos e podem ou não apresentar íntrons.

[33] “Sequência codificadora” refere-se à sequência de DNA que codifica uma proteína específica e exclui a sequência não codificadora. Um “intron” é uma sequência de nucleotídeo que é transcrita e está presente no pré mRNA, mas é removida através de clivagem e re-ligação do mRNA dentro da célula gerando um mRNA maduro que pode ser traduzido em uma proteína ou não. Exemplos de íntrons incluem, mas não são limitados a intron pdk, intron pdk2, intron catalase da mamona, intron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de *Arabidopsis thaliana*, intron ubiquitina de milho, intron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.

[34] “Transcrito de RNA” refere-se ao produto resultante da transcrição catalisada pela RNA polimerase de uma sequência de DNA. Quando o transcrito de RNA é uma cópia perfeita da sequência de DNA, ele é referido com transcrito primário ou ele pode ser uma sequência de RNA derivada de um processo pós-transcricional do transcrito primário e é então referido como transcrito maduro. “RNA mensageiro (mRNA)” refere-se ao RNA sem íntrons. “RNA sense” refere-se a um transcrito de RNA que inclui o mRNA. “RNA antisense” refere-se a um transcrito de RNA que é complementar a todas as partes de um transcrito primário ou mRNA e que pode bloquear a expressão de um gene alvo através da interferência no processamento, transporte e/ou tradução do seu transcrito primário ou mRNA. A complementaridade de um RNA antisense pode ser com qualquer parte do transcrito gênico específico, isto é, sequência 5’ não traduzida, sequência 3’ não traduzida, íntrons ou sequência codificadora. Além disso, o RNA antisense pode conter regiões de sequências ribozima que aumentam a eficácia do RNA antisense para bloquear a expressão gênica.

[35] “Ribozima” refere-se ao RNA catalítico e inclui sequências específicas de endoribonucleases.

[36] “dsRNA” ou “*double-strand* RNA” refere-se a estrutura formada entre a sequência do mRNA ou RNA sense, a sequência de uma região espaçadora e a sequência do RNA antisense, sendo que “região espaçadora” refere-se à sequência de nucleotídeo que não está relacionada com a sequência do gene alvo como, por exemplo, a sequência de um intron.

[37] O termo “vetor” diz respeito a um replicon, como plasmídeo, fago ou vírus, no qual outras sequências genéticas ou elementos (sejam eles de DNA ou RNA) podem ser ligados. Desta forma, os genes podem ser replicados juntamente com o vetor. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, sendo apresentados a seguir alguns exemplos de vetores, mas não limitados: pKannibal (Wesley SV *et al.* Construct design for efficient, effective and highthroughput Gene silencing in plants. Plant J. 27:581590. 2011) pGLYP, pAC321, série pCambia (BioForge Co.), pBI121 (Chen, Po-Yen *et al.* Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. . *Molecular Breeding* vol. 11 issue 4 May 2003. p. 287-293), pBSK (Addgene Co.), pGEM-T easy (Promega Corporation), pET101/ D-TOPO (Invitrogen). A obtenção de vetores recombinantes compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook et al. (Sambrook, J., Russell, D. W., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

[38] Uma forma de produzir o dsRNA é através da inserção, na molécula de DNA, de sequência de nucleotídeos do gene alvo na orientação sense, e uma sequência de nucleotídeos na orientação antisense, podendo haver ou não uma região espaçadora entre as sequências de nucleotídeos sense e antisense. As sequências de nucleotídeos mencionadas podem ser constituídas de cerca de 19nt a 2000nt ou ainda cerca de 5000 nucleotídeos ou mais.

[39] Convenientemente, o dsRNA (RNA de dupla fita) como descrito pode ser introduzido dentro de células hospedeiras pela introdução e possível integração de uma construção gênica contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção, transcrição das mesmas para produção do dsRNA. Portanto, em uma concretização, a invenção é suportada por possuir uma construção gênica que é capaz de ser expressa em células de organismos eucariotos de interesse, operacionalmente ligada a uma molécula de DNA que quando transcrita produz uma molécula de dsRNA.

[40] “Promotor” refere-se à sequência de DNA em um gene, usualmente localizada a montante da sequência codificadora, a qual controla a expressão da sequência codificadora promovendo o reconhecimento pela RNA polimerase e outros fatores

requeridos para a própria transcrição. Em uma construção de DNA artificial, promotores podem também ser utilizados para transcrever dsRNA. Promotores podem também conter sequências de DNA que estão envolvidas na ligação de fatores de proteínas as quais controlam o efeito do início da transcrição em resposta a condições fisiológicas ou de desenvolvimento. “Promotores constitutivos” referem-se àqueles que dirigem a expressão gênica em todos os tecidos do organismo e durante todo tempo. Promotores “tecido-específicos” ou “desenvolvimento-específicos” são aqueles que dirigem a expressão gênica quase que exclusivamente em tecidos específicos, tais como folhas, raízes, caules, flores, frutos ou sementes, ou em estágios do desenvolvimento específicos em um tecido, como no início ou final da embriogênese.

[41] O promotor pode conter elementos “*enhancers*”. Um *enhancer* é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade do promotor. Ela pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível e/ou a tecido-especificidade de um promotor.

[42] O termo “expressão” refere-se à transcrição de uma dada sequência de DNA. Mais especificamente nessa invenção, refere-se à transcrição e acumulação estável do dsRNA derivado dos fragmentos de ácidos nucleicos da invenção.

[43] “Inibição ou supressão por interferência” refere-se à produção de transcritos de dsRNA capazes de prevenir a expressão da proteína alvo.

[44] “Transformação” refere-se a transferência do gene exógeno para dentro do genoma de um organismo hospedeiro e sua consequente inclusão na herança geneticamente estável.

[45] “Plantas” referem-se a organismos pluricelulares, eucariotos, autotróficos e fotossintéticos, pertencentes ao Reino Plantae.

[46] Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor expresso em plantas. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em plantas” significa uma sequência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de planta. Isso inclui qualquer promotor de origem vegetal; qualquer promotor de origem não vegetal o qual seja capaz de direcionar a expressão em uma célula vegetal, por

exemplo, promotores de origem viral ou bacteriana tais como CaMV35S (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hapster *et al.*, 1988 Mol. Gen. Genet. 212, 182-190) e promotores do gene presentes no T-DNA de *Agrobacterium*; promotores tecido-específicos ou órgão-específicos, incluindo mas não limitados a promotores semente-específicos (WO8903887), promotores específicos de órgãos primordiais (como mencionado no pedido de patente US20030175783, An *et al.*, 1996 The Plant Cell 8, 15-30), promotores específicos de caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller *et al.*, 1988 EMBO J. 7: 3625-3633), promotores específicos de folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth *et al.*, 1989 Plant Mol Biol 12:579-589), promotores específicos de mesófilo, promotores específicos de raiz (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller *et al.*, 1989 Genes Devel. 3:1639-1646), promotores específicos de tubérculos (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil *et al.*, 1989 EMBO J. 8: 1323:1330), promotores específicos de tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman *et al.*, 1989 Gene 84: 359-369), promotores específicos de estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865); e semelhantes.

[47] O terminador ou sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens*, sinal de terminação do gene RNA 35S do CaMV, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, e outros semelhantes.

[48] A presente invenção também inclui prover moléculas de dsRNA, as quais podem ser obtidas por transcrição das moléculas contidas nas construções gênicas, e que são úteis para os métodos de acordo com a invenção.

[49] Um outro objeto da presente invenção é prover células eucariotas e organismos eucariotas contendo moléculas de dsRNA, ou contendo os gene quiméricos ou as construções gênicas capazes de produzir moléculas de dsRNA da invenção. As

construções gênicas podem estar estavelmente integradas no genoma das células de organismos eucariotas.

[50] As construções gênicas ou genes quiméricos da invenção podem ser introduzidos dentro do genoma da planta hospedeira desejada através de uma variedade de técnicas convencionais. Por exemplo, a construção pode ser introduzida diretamente no tecido vegetal utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com DNA, como descrito em Rech EL, Vianna GR, Aragão FJL (2007) High transformation efficiency by biolistics of soybean, bean and cotton transgenic plants, *Nature Protocols*, 3 (3): 410-418. Também podem ser introduzidos diretamente dentro do DNA genômico da célula vegetal utilizando técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de células de plantas.

[51] As construções gênicas podem conter regiões de travas de incompatibilidade, que seriam regiões nucleicas que conferem formato curvo à molécula, possibilitando gerar uma estrutura não linear (Chang J *et al.* Resistance of Human Hepatitis Delta Virus RNAs to Dicer Activity. *Journal of Virology*, 77 (22): 11910–11917. 2003).

[52] Células de plantas transformadas que são derivadas de qualquer uma das técnicas de transformação descritas acima podem ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e, conseqüentemente, o fenótipo esperado. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a sequência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans *et al.*, *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee *et al.*, *Ann. Ver. of Plant Phys.* 38:467-486, 1987 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

[53] A presente invenção se refere a um polinucleotídeo sintético caracterizado por conter:

- a) Uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos;
- b) Uma segunda região com o complemento da sequência de (a);
- c) Uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima.

[54] Numa concretização preferencial, as regiões (a) e (b) do polinucleotídeo são sequências de ribonucleotídeo.

[55] Em outra concretização preferencial, a primeira região descrita em (a) apresenta um percentual de guanina e citosina entre 45 e 65%. Em uma concretização mais preferencial, a primeira região descrita em (a) apresenta um percentual de guanina e citosina de 50%.

[56] Adicionalmente, é apresentada outra concretização preferencial na qual o polinucleotídeo apresenta regiões de ribozima em suas extremidades. Numa concretização mais preferencial, as referidas ribozimas são ativadas em faixa de pH entre 6,5 e 7,5. E em uma concretização mais preferencial ainda as referidas ribozimas são ativadas quando em pH 7,0.

[57] Tal polinucleotídeo pode apresentar uma região espaçadora entre (a) e (b), preferencialmente uma região de trava de incompatibilidade. O polinucleotídeo também pode apresentar uma região de trava de incompatibilidade entre (b) e (c). Além disso, em outra concretização, o referido polinucleotídeo também pode apresentar uma trava de incompatibilidade entre (c) e a ribozima da extremidade 3'.

[58] Em uma concretização preferencial, a ribozima prevista em (c) é ativada quando em pH abaixo de 6,0. Já em uma concretização mais preferencial, a ribozima prevista em (c) é ativada na faixa de pH entre 4,0 e 4,5.

[59] A presente invenção também se refere a um gene quimérico caracterizado por compreender:

- I. um polinucleotídeo de acordo com as concretizações descritas anteriormente, e

II. uma região de promotor ativo, operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (I).

[60] Tal gene quimérico pode compreender uma sequência adicional de promotor ativo operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (I).

[61] Outro objeto da invenção é um vetor contendo polinucleotídeo de acordo com as concretizações descritas anteriormente. Também é prevista a sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida a partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico que compreenda um polinucleotídeo sintético com uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos, uma segunda região com o complemento da primeira e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima.

[62] Também é previsto um método de aumentar estabilidade de molécula de um ribonucleotídeo através da inclusão na construção da molécula regiões de travas de incompatibilidade que conferem forma específica à molécula, possibilitando que suas extremidades se liguem. Tal método pode também incluir na construção da molécula regiões de ribozima que sejam ativadas de acordo com o pH da organela alvo do ribonucleotídeo.

[63] Outro objeto da invenção é um método de supressão de expressão gênica utilizando uma molécula de ácido nucleico que compreenda um polinucleotídeo sintético com uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos, uma segunda região com o complemento da primeira e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima. Tal molécula pode ser sintetizada quimicamente ou produzida por expressão em microorganismo ou por expressão em célula vegetal.

[64] Outra concretização da presente invenção refere-se a um método de transformação de organismo através da inserção no dito organismo uma molécula de ácido nucleico que compreenda um polinucleotídeo sintético com uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos, uma segunda região com o complemento da primeira e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima. O método caracterizado por resultar na expressão de molécula de ribonucleotídeo no dito organismo que possa causar morte ou prejudicar o desenvolvimento da praga que a

ingerir. Tal método pode ser aplicado a um microorganismo ou uma planta, de forma que é prevista a planta transformada compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreenda um polinucleotídeo sintético com uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos, uma segunda região com o complemento da primeira e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima, assim como sua semente transgênica ou parte propagativa.

[65] A presente invenção também prevê um método de controle de pragas caracterizado por expor a dita praga uma molécula de ácido nucleico que compreenda um polinucleotídeo sintético com uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos, uma segunda região com o complemento da primeira e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima.

[66] Em outra concretização, a invenção prevê um polinucleotídeo sintético caracterizado por conter:

- A. Uma primeira região com sequência de ácidos nucleicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13;
- B. Uma segunda região com o complemento da sequência de (A);
- C. Uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17.

[67] Tal polinucleotídeo pode apresentar em suas extremidades regiões de ribozima conforme sequências descritas em SEQ ID No 2 ou SEQ ID No 12 e SEQ ID No 9 ou SEQ ID No 19. O referido polinucleotídeo também pode apresentar uma região espaçadora, sendo que tal região preferencialmente pode ser uma região de trava de incompatibilidade conforme sequência descrita em SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 14.

[68] O referido polinucleotídeo sintético também pode apresentar uma região de trava de incompatibilidade entre (B) e (C) conforme sequência descrita em SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 16. O mesmo polinucleotídeo também pode apresentar uma trava de incompatibilidade entre (C) e a ribozima da extremidade 3' conforme sequência descrita em SEQ ID No 8 ou SEQ ID No 18.

[69] Outra concretização da invenção em questão é um gene quimérico que compreenda:

- i. um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucleicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequênçia descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17, e
- ii. região de promotor ativo, operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (i).

[70] O referido gene quimérico pode compreender uma sequência adicional de promotor ativo operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (i).

[71] Também é previsto na invenção um vetor que compreenda um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucleicos conforme sequência descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17. Outra concretização prevê um vetor que compreenda um polinucleotídeo de acordo com SEQ ID N° 1 ou SEQD ID N° 11

[72] Outra concretização da presente invenção refere-se a uma sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo produzida a partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico que compreenda um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucleicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequênçia descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17.

[73] Em outra concretização é descrito um método de aumentar estabilidade de molécula de um ribonucleotídeo caracterizado por incluir na construção da molécula regiões nucleicas de travas de incompatibilidade conforme sequências descritas em SEQ ID No 4, SEQ ID No 6, SEQ ID No 8, SEQ ID No 14, SEQ ID No 16 e/ou SEQ ID No

18. Tal método também pode incluir na construção da molécula regiões de ribozima conforme sequências descritas em SEQ ID No 2, SEQ ID No 7, SEQ ID No 9, SEQ ID No 12, SEQ ID No 17 e/ou SEQ ID No 19.

[74] A presente invenção também aborda um método de supressão de expressão gênica caracterizado por utilizar molécula nucleotídica que compreenda um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucléicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17. A molécula de ribonucleotídeo do referido método pode ser sintetizada quimicamente ou produzida por expressão em microorganismo ou por expressão em célula vegetal.

[75] Dessa forma, também é previsto um método de transformação de organismo no qual se insere no dito organismo uma molécula de ácido nucléico que compreenda um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucléicos conforme sequência descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17. Em uma concretização preferencial, o referido método resulta na expressão de molécula de ribonucleotídeo no dito organismo que possa causar morte ou prejudicar o desenvolvimento da praga que a ingerir. O método pode ser aplicado a um microorganismo ou planta, de forma que a invenção prevê o microorganismo e/ou a planta transformada compreendendo uma molécula de ácido nucléico que compreenda um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucléicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17. Tal planta pode ser uma planta de *Gossypium sp*, *Glycine max*, *Coffea sp.*, *Musa sp.*, *Phaseolus sp.*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Hevea sp.*, *Passiflora sp.* ou *Psidium guajava*, Também é prevista a semente transgênica ou parte propagativa da referida planta.

[76] E, finalmente, a presente invenção também aborda um método de controle de pragas caracterizado por expor a dita praga a molécula de ácido nucléico que compreenda um polinucleotídeo com uma primeira região com sequência de ácidos nucléicos conforme sequência descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13, uma segunda região com o complemento da sequência de (A) e uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17.

[77] Experimentos realizados e resultados obtidos:

[78] **Construção e síntese de cassete de DNA para expressão de dsRNA estabilizado de gene de *Anthonomus grandis*:**

[79] A sequência no sentido 5' - 3' do cassete de DNA (Figura 1) para a expressão de dsRNA estruturado é descrita a seguir. Por apresentar autocomplementariedade nas suas sequências nucleotídicas, o dsRNA proposto é automontável em sistema *in vivo* (SEQ ID N° 1), e também pode ser utilizado em sistemas de transcrição *in vitro*. A sequência em questão possui o promotor UCEA 1.7 (patente n° BRPI0701230-6) seguido do promotor da T7 RNA polimerase. Também compõem a construção a Ribozima de *Selaginella moellendorffii*, denominada aqui Rib5' (SEQ ID N° 2), que se autocliva em faixa de pH > 7, flanqueando a extremidade 5' do dsRNA, e a Ribozima de *Vitis vinifera*, flanqueando a extremidade 3' do dsRNA (SEQ ID N° 9), que se autocliva em faixa de pH > 7. Também compõem a construção sequências senso (SEQ ID N° 3) e antisense (SEQ ID N° 5) de região do gene da quitina sintase 2 de *Anthonomus grandis*. As sequências gênicas são seguidas de ribozima com atividade autocatalítica em pH 4,0 (Jayasena, V. K.; Gold, L. In vitro selection of self-cleaving RNAs with a low pH optimum. Proceedings of the National Academy of Sciences. Volume 94, 10612-10617, 1997), aqui denominada Rib4 (SEQ ID N° 7). A construção também possui regiões de travas de incompatibilidade, descritas em SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 6 e SEQ ID N° 8 (Jinhong C *et al.* Resistance of Human Hepatitis Delta Virus RNAs to Dicer Activity. Journal of Virology 77 (22): 11910–11917. 2003). Na extremidade 3' do cassete de DNA foi disposta a sequência do terminador T-Nos (SEQ ID N° 10). A construção

contendo a sequência transcrita em um RNA dupla fita estabilizado foi obtida por meio de síntese química e adquirido de empresa especializada.

[80] Para os experimentos de silenciamento gênico via RNA, o dsRNA na forma linear e na forma estruturada foram sintetizados utilizando o Kit de transcrição *in vitro* MEGAscript® T7 (AM1333), seguindo o manual do fabricante. Para a transcrição do dsRNA, foi utilizado como molde o DNA, amplificado por PCR, contendo a sequência do dsRNA flanqueado com a sequência mínima do promotor da T7 RNA polimerase (5'TAATACGACTCACTATAGGG3'). A reação contendo 1µg de DNA molde, um mix 8 mM de cada nucleotídeo ATP, CTP, TTP e UTP tampão de reação 1x foi mantida a 37°C por 16 horas. Para o anelamento do dsRNA, os produtos de reação de transcrição foram incubadas a 65°C durante 5 min e, após resfriamento à temperatura ambiente, os dsRNAs foram purificados por extração com fenol / clorofórmio (1:1) seguido de precipitação de isopropanol (1:1), e lavagem com etanol 70%. O precipitado de dsRNA de quitina sintase 2 de *A. grandis* (AgraCHS2) foi solubilizado em água com DEPC e depois quantificado através de espectroscopia e examinados por eletroforese em gel de agarose a 1% para assegurar a sua integridade. A concentração final de dsRNA foi ajustada para 100 ng / µL.

[81] Determinação da mortalidade de *A. grandis* após microinjeção com dsRNA linear e dsRNA estruturado:

[82] As fêmeas foram coletadas após 72, 120, 168 e 240 horas da microinjeção. Ao final do experimento a mortalidade foi contabilizada. O experimento foi realizado em três replicatas biológicas para cada tratamento, a unidade experimental consistiu de 16 fêmeas microinjetadas com água (tratamento controle) e com 100 ng de dsRNA nas formas linear e estruturada (essa dose é subletal para a forma linear do dsRNA de AgraCHS2). O silenciamento da expressão AgraCHS2 causou um aumento da mortalidade de fêmeas de *A. grandis* com o decorrer do período experimental (Figura 2). O tratamento com o dsRNA estruturado causou uma mortalidade de 83%, já o dsRNA a mortalidade foi de 56%. Assim, o tratamento com dsRNA estruturado além de

causar uma maior supressão do número de transcritos do gene alvo, também resultou em um maior efeito de mortalidade.

[83] Determinação da oviposição de fêmeas de *A. grandis* microinjetadas com dsRNA linear e dsRNA estruturado:

[84] O efeito da microinjeção dos dsRNAs sobre a oviposição de fêmeas de *A. grandis* foi analisado por meio de bioensaio e monitoramento do número de ovos (Figura 3). Foi observada uma redução drástica na oviposição de fêmeas tratadas com 100ng de dsRNA estruturado de AntgCHS2. Enquanto, a média de oviposição no tratamento controle foi de 9,7 ovos/fêmea. Como ilustrado na Figura 3, o efeito do silenciamento AntgCHS2 pelo dsRNA linear sobre a oviposição causou uma redução de 41% do número de ovos, entretanto o efeito do dsRNA estruturado foi de uma redução de 78% na oviposição.

[85] Efeito do silenciamento de AntgCHS2 sobre a viabilidade da prole:

[86] Com o objetivo de avaliar o efeito do silenciamento de AntgCHS2 sobre a viabilidade da prole, o dsRNA AntgCHS2 linear e o dsRNA AntgCHS2 estruturado foram aplicados em fêmeas adultas de *A. grandis*. A microinjeção de dsRNA linear e o dsRNA estruturado de AntgCHS2 não causaram efeitos sobre a viabilidade dos ovos de *A. grandis* (Figura 4).

[87] Ensaio de localização celular do dsRNA estruturado, marcados por Cy3, em *Arabidopsis thaliana*:

[88] O dsRNA estruturado foi marcado com o kit Silencer siRNA Labeling kit – Cy3, segundo o protocolo do fabricante, com adaptações: em microtubo, adicionou-se 25 µg de dsRNA, 5.0 µL tampão 10X, 7.5 µL Cy3, completando a reação para 50 µL com água milliQ. A reação foi incubada overnight, a 37°C. Em seguida, adicionou-se 0.1 volume de NaCl 5M, 2.5 volumes de etanol 100%, misturando bem. A reação foi

incubada por 30 a 60 minutos a -20°C, seguida de centrifugação por 20 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o pellet foi lavado com 175 µL de etanol 70%, seguindo por centrifugação por 5 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o pellet foi seco e resuspendido em água milliQ ou tampão na concentração desejada.

[89] Plantas de *Arabidopsis thaliana* foram cultivadas em meio MS e suas raízes foram colocadas em contato com o dsRNA estruturado marcado durante 16 horas, em meio MS. O resultado foi analisado por microscopia confocal (Figura 1A). As imagens foram capturadas usando laser de excitação de 552nm (Cy3) e laser de captação de 552 - 609nm. Foram usadas plantas de *A. thaliana* para realizar o experimento porque essa espécie não possui auto fluorescência, além de possuir desenvolvimento rápido, quando comparada a outras plantas. Como controles, foram utilizados dsRNA estabilizado não marcado com Cy3, dsRNA não estabilizado marcado com Cy3, Cy3 e água.

[90] **Efeito de dsRNA de genes de *Meloidogyne incognita* sobre galhas em raízes de plantas de soja geneticamente transformadas:**

[91] A sequência do gene da proteína de avirulência MAP-1 de *Meloidogyne incognita* foi selecionada como alvo para esse experimento. Foram desenhadas as sequências de dsRNA no formato estruturado e inseridas no vetor pzp201_EGFP na posição 11935-11936, onde há um sítio de restrição Xho I (C[^]TCGAG). Sementes de soja var. Williams 82 (suscetível a *M. incognita*) foram germinadas e transformadas com *Agrobacterium rhizogenes*, cepa K599 (Kereszt, A *et al*, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols*. 2:949-951. 2007.). As sementes foram colocadas para germinar durante 4 dias, a 24°C em placa de Petri forrada com papel de germinação tipo ‘Germitest’ previamente umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel não hidratado (Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p.).

[92] Foram utilizadas 12 sementes para cada tratamento, plantas transformadas com o vetor vazio (controle da infecção do nematoide nas raízes geradas a partir de *A. rhizophages*) e plantas não transformadas (controle negativo).

[93] Paralelamente a etapa de germinação das sementes, células competentes de *A. rhizophages*, cepa K599, foram transformadas por eletroporação com o DNA da proteína efetora. Após 2 dias, algumas colônias isoladas foram coletadas para análise e seleção de transformantes, aplicando-se PCR e oligonucleotídeos para o gene eGDF, marcador comum à todas as construções gênicas. As bactérias recombinantes positivas foram utilizadas na transformação genética das plantas, por meio de ferimento nas plântulas, provocado por agulha na região do hipocótilo e, em seguida, aplicada a “pasta” de *A. rhizophages*. Após 4 dias de co-cultivo a 22°C, as plântulas foram avaliadas utilizando técnicas de microscopia e observando-se a presença de raízes transformadas, por meio da expressão de GFP (detectada pela coloração verde) (Figura 2A). As raízes não transformadas foram eliminadas e as plântulas contendo apenas as raízes selecionadas como “transformadas” foram transplantadas para vasos de plástico, contendo areia estéril e gel hidrorretentor previamente hidratado com água destilada (na proporção de 3g de gel: 1L de água e 3L de areia). O cultivo das plantas foi realizado em casa de vegetação. Após 15 dias, da data de transformação, cada planta foi inoculada com 1000 indivíduos na fase juvenil (J2) de *M. incognita* (raça 1). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação durante 35 dias. Para avaliação do efeito da inoculação e fenótipo, as raízes foram previamente lavadas e incubadas com corante Floxina durante 20 minutos (Dickson, D.W., Struble, F.B.A. Sieving-staining technique for extraction of egg mass of *Meloidogyne incognita* from soil. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 55, p. 497, 1965). Então o número de galhas foi avaliado por meio de contagem em todas as raízes. A Figura 5 ilustra o efeito de redução no número de galhas, após o tratamento utilizando o dsRNA estruturado da sequência Minc04584.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo sintético caracterizado por conter:
 - a. Uma primeira região contendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos;
 - b. Uma segunda região com o complemento da sequência de (a);
 - c. Uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima.
2. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por (a) e (b) serem sequências de ribonucleotídeo.
3. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a primeira região descrita em (a) apresentar conteúdo de guanina e citosina entre 45 e 65%
4. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por o conteúdo de guanina e citosina ser 50%.
5. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por apresentar regiões de ribozima em suas extremidades.
6. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por as referidas ribozimas serem ativadas em faixa de pH entre 6,5 e 7,5.
7. Polinucleotídeo sintético da reivindicação 4 caracterizado por as referidas ribozimas serem ativadas em pH 7,0.
8. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por apresentar uma região espaçadora entre (a) e (b).
9. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 6 caracterizado por a região espaçadora ser uma região de trava de incompatibilidade.

10. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por apresentar uma região de trava de incompatibilidade entre (b) e (c).
11. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 3 caracterizado por apresentar uma trava de incompatibilidade entre (c) e a ribozima da extremidade 3'.
12. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por (c) ser ativada quando em pH abaixo de 6,0.
13. Polinucleotídeo sintético da reivindicação 10 caracterizado por (c) ser ativada na faixa de pH entre 4,0 e 4,5.
14. Gene quimérico caracterizado por compreender:
 - I. um polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e
 - II. região de promotor ativo, operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (I).
15. Gene quimérico da reivindicação 14 caracterizado por compreender uma sequência adicional de promotor ativo operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (I).
16. Vetor caracterizado por compreender polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 a 15.
17. Sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo caracterizada por ser produzida a partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 16.
18. Método de aumentar estabilidade de molécula de um ribonucleotídeo caracterizado por incluir na construção da molécula regiões de travas de incompatibilidade que conferem forma específica à molécula, possibilitando que suas extremidades se liguem.

19. Método de acordo com a reivindicação 18 caracterizado por também incluir na construção da molécula regiões de ribozima que sejam ativadas de acordo com o pH da organela alvo do ribonucleotídeo.
20. Método de supressão de expressão gênica caracterizado por utilizar molécula nucleotídica de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 16.
21. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pela molécula de ribonucleotídeo ser sintetizada quimicamente ou produzida por expressão em microorganismo ou por expressão em célula vegetal.
22. Método de transformação de organismo caracterizado por inserir no dito organismo uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 16.
23. Método de acordo com a reivindicação 22 caracterizado por resultar na expressão de molécula de ribonucleotídeo no dito organismo que possa causar morte ou prejudicar o desenvolvimento da praga que a ingerir.
24. Método de acordo com a reivindicação 22 caracterizado por o dito organismo ser uma planta.
25. Planta transformada caracterizada por compreender uma molécula de ácido nucléico definida em qualquer das reivindicações 1 a 16.
26. Semente transgênica ou parte propagativa caracterizada por ser de planta da reivindicação 25.
27. Método de acordo com a reivindicação 22 caracterizado por o dito organismo ser um microorganismo.
28. Microorganismo transformado caracterizada por compreender uma molécula de ácido nucléico definida em qualquer das reivindicações 1 a 16.

29. Método de controle de pragas caracterizado por expor a dita praga a molécula de ácido nucléico de qualquer das reivindicações 1 a 11.

30. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por conter:

- A. Uma primeira região com sequência de ácidos nucléicos conforme sequencia descrita em SEQ ID No 3 ou em SEQ ID No 13;
- B. Uma segunda região com o complemento da sequência de (A);
- C. Uma terceira região contendo a sequência de uma ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 7 ou em SEQ ID No 17.

31. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por apresentar em suas extremidades regiões de ribozima conforme sequência descrita em SEQ ID No 2 ou SEQ ID No 12 e SEQ ID No 9 ou SEQ ID No 19.

32. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 30 caracterizado por apresentar uma região espaçadora entre (A) e (B).

33. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 32 caracterizado por a região espaçadora ser uma região de trava de incompatibilidade conforme sequência descrita em SEQ ID No 4 ou SEQ ID No 14.

34. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 30 caracterizado por apresentar uma região de trava de incompatibilidade entre (B) e (C) conforme sequência descrita em SEQ ID No 6 ou SEQ ID No 16.

35. Polinucleotídeo sintético de acordo com a reivindicação 31 caracterizado por apresentar uma trava de incompatibilidade entre (C) e a ribozima da extremidade 3' conforme sequência descrita em SEQ ID No 8 ou SEQ ID No 18.

36. Gene quimérico caracterizado por compreender:

- i. um polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, e
- ii. região de promotor ativo, operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (i).

37. Gene quimérico de acordo com a reivindicação 36 caracterizado por compreender uma sequência adicional de promotor ativo operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (i).

38. Vetor caracterizado por compreender polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 30 a 37.

39. Vetor caracterizado por compreender polinucleotídeo de acordo com SEQ ID N° 1 ou SEQD ID N° 11.

40. Sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo caracterizada por ser produzida a partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer das reivindicações 36 a 39.

41. Método de aumentar estabilidade de molécula de um ribonucleotídeo caracterizado por incluir na construção da molécula regiões nucleicas de travas de incompatibilidade conforme sequências descritas em SEQ ID No 4, SEQ ID No 6, SEQ ID No 8, SEQ ID No 14, SEQ ID No 16 e/ou SEQ ID No 18.

42. Método de acordo com a reivindicação 41 caracterizado por também incluir na construção da molécula regiões de ribozima conforme sequências descritas em SEQ ID No 2, SEQ ID No 7, SEQ ID No 9, SEQ ID No 12, SEQ ID No 17 e/ou SEQ ID No 19.

43. Método de supressão de expressão gênica caracterizado por utilizar molécula nucleotídica de acordo com qualquer das reivindicações 30 a 39.

44. Método de acordo com a reivindicação 43 caracterizado pela molécula de ribonucleotídeo ser sintetizada quimicamente ou produzida por expressão em microorganismo ou por expressão em célula vegetal.
45. Método de transformação de organismo caracterizado por inserir no dito organismo uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer das reivindicações 30 a 39.
46. Método de acordo com a reivindicação 45 caracterizado por resultar na expressão de molécula de ribonucleotídeo no dito organismo que possa causar morte ou prejudicar o desenvolvimento da praga que a ingerir.
47. Método de acordo com a reivindicação 46 caracterizado por o dito organismo ser uma planta.
48. Planta transformada caracterizada por compreender uma molécula de ácido nucléico definida em qualquer das reivindicações 30 a 39.
49. Planta de acordo com a reivindicação 48 caracterizada por ser uma planta de *Gossypium sp*, *Glycine max*, *Coffea sp.*, *Musa sp.*, *Phaseolus sp.*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Hevea sp.*, *Passiflora sp.* ou *Psidium guajava*.
50. Semente transgênica ou parte propagativa caracterizada por ser de planta de acordo com a reivindicação 48.
51. Método de acordo com a reivindicação 46 caracterizado por o dito organismo ser um microorganismo.
52. Microorganismo transformado caracterizada por compreender uma molécula de ácido nucléico definida em qualquer das reivindicações 30 a 39.
53. Método de controle de pragas caracterizado por expor a dita praga a molécula de ácido nucléico de qualquer das reivindicações 30 a 39.

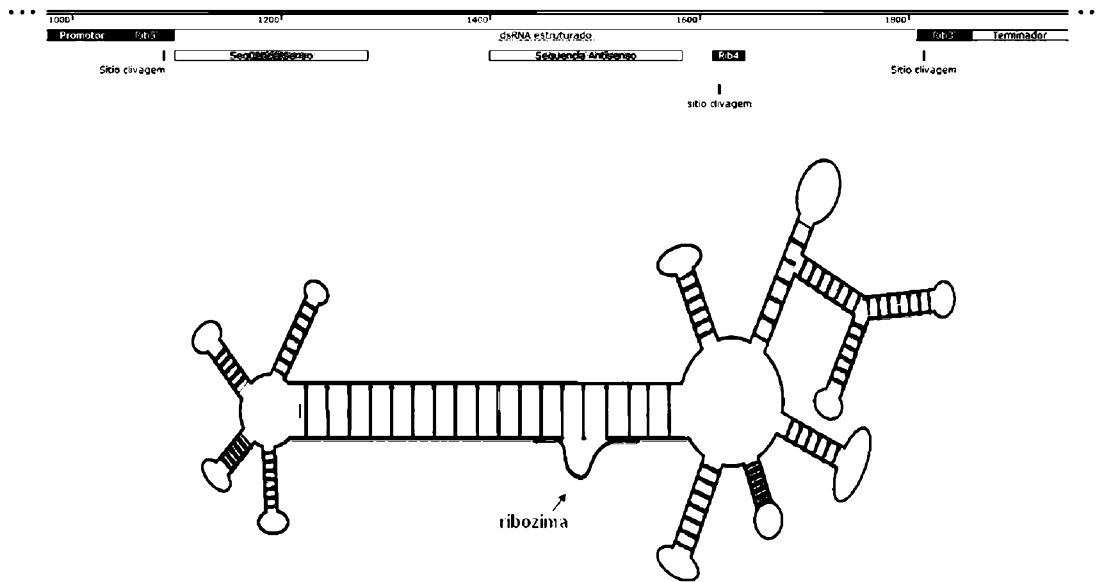


FIGURA 1

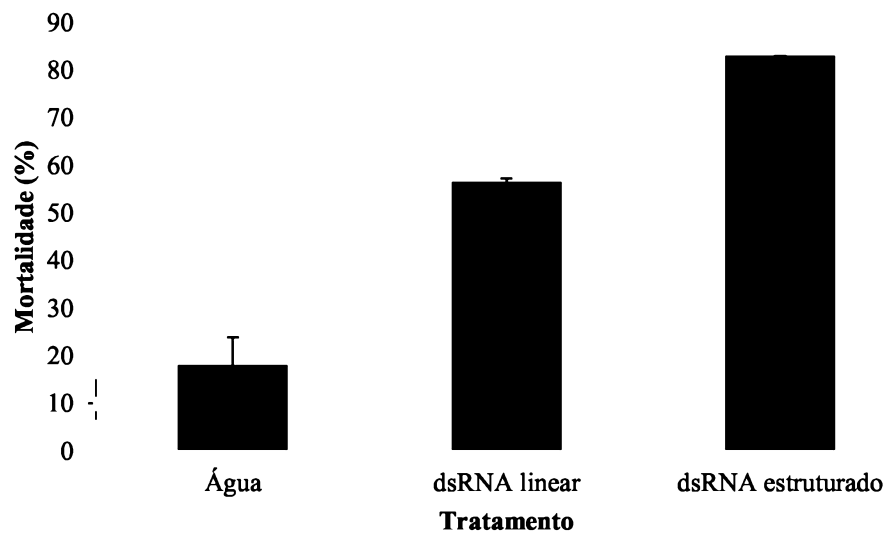


FIGURA 2

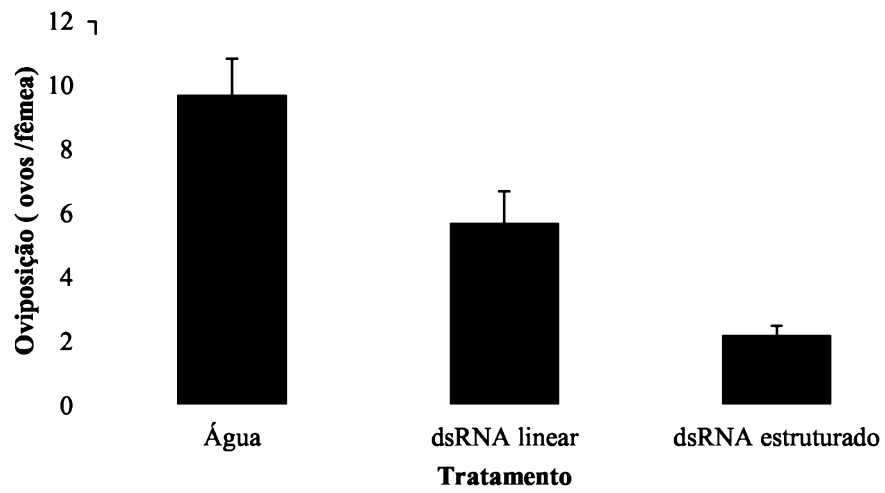


FIGURA 3

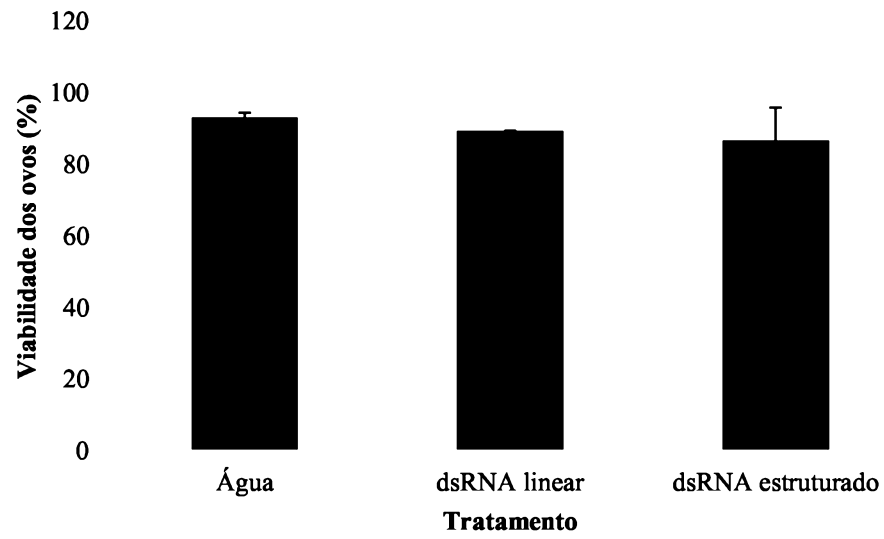


FIGURA 4

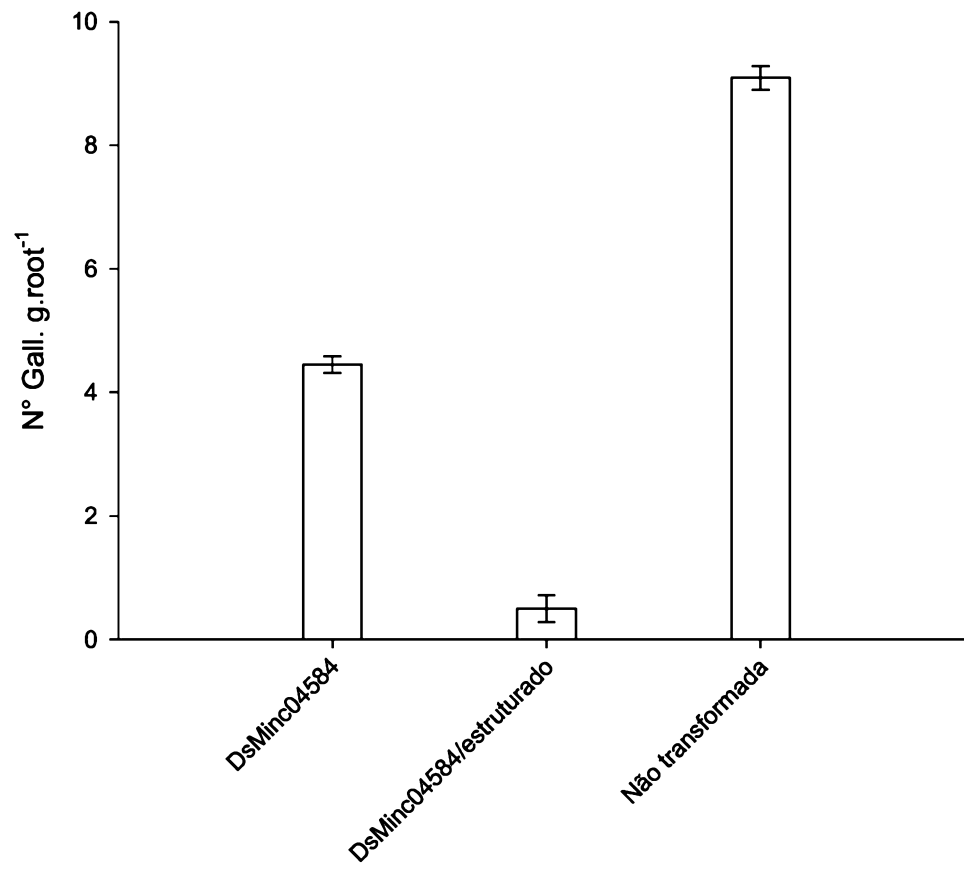


FIGURA 5

RESUMO**AUMENTO DA EFICÁCIA DE SUPRESSÃO DE EXPRESSÃO DE GENES POR MEIO DO USO DE MOLÉCULAS DE RNA COM ESTRUTURA ESTABILIZADA**

A presente invenção descreve um novo e inventivo método de construção de moléculas de ácido nucléico estruturadas com o objetivo de aumentar sua estabilidade e sua eficiência na supressão da expressão de genes alvo em diferentes organismos, provendo detalhes que direcionam sua execução. A invenção ainda provê moléculas de ácido nucléico e outros elementos, assim como plantas que incorporem tais elementos, demonstrando sua efetividade no controle de diferentes espécies de pragas agrícolas e ilustrando uma das diversas possibilidades de aplicação.