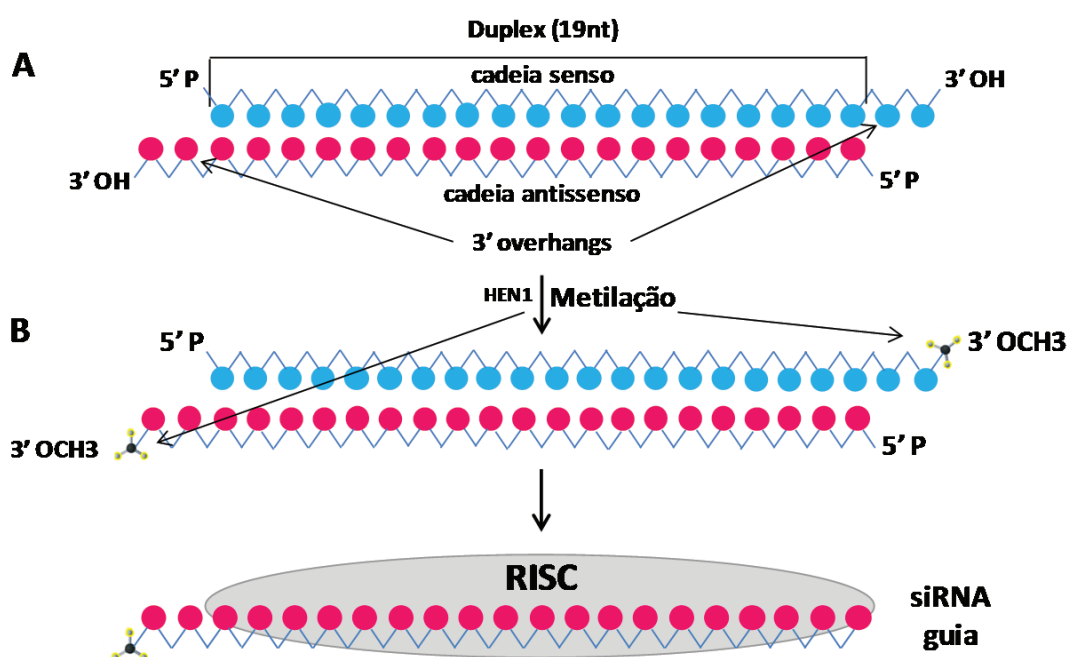


## Regulação Gênica por Metilação de DNA Dependente de RNA (RdDM - RNA-dependent DNA methylation)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**DOCUMENTOS 246**

**Regulação Gênica por Metilação de DNA Dependente de RNA  
(RdDM - RNA-dependent DNA methylation)**

Maria José Vilaça de Vasconcelos  
José Edson Fontes Figueiredo

**Esta publicação está disponível no endereço:**  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**  
Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Maria Marta Pastina*

Secretário-Executivo  
*Elena Charlotte Landau*

Membros  
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria  
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone,  
Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda  
de Castro*

Revisão de texto  
*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica  
*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações  
*Mônica Aparecida de Castro*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Mônica Aparecida de Castro*

Figura da capa  
José Edson Fontes Figueiredo

**1ª edição**  
*Publicação digitalizada (2019)*

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Milho e Sorgo

---

Vasconcelos, Maria José Vilaça de.

Regulação gênica por metilação de DNA dependente de RNA (RdDM -  
RNA-dependent NA methylation) / Maria José Vilaça de Vasconcelos, José  
Edson Fontes Figueiredo. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.  
43 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 246).

1. Genética. 2. Cromossoma. 3. Expressão gênica. 4. Reação química. I.  
Figueiredo, José Edson Fontes. II. Título. III. Série.

## Autores

**Maria José Vilaça de Vasconcelos**

Farmacêutica/Bioquímica, PhD e Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo

**José Edson Fontes Figueiredo**

Biólogo/Bioquímico, PhD e Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo

## Apresentação

Durante toda a vida de um organismo eucarioto, da fecundação até a sua morte, uma miríade de genes é ativada e desativada em momentos específicos durante o desenvolvimento e a diferenciação celular e em determinadas situações de estresse ambiental e biótico. Na segunda metade do século XX, os estudos de Jacob & Monod revelaram a natureza da regulação da expressão gênica baseada na presença ou ausência de moléculas indutoras e repressoras que se ligavam aos promotores dos genes ativando ou silenciando a transcrição. Contudo, esse modelo mostrou-se insuficiente para explicar a natureza da maioria dos fenômenos envolvendo a expressão gênica observada em diferentes grupos de organismos. No início do século XXI, com a descoberta das moléculas pequenas de RNAs não codantes, os ncRNAs, verificou-se uma corrida em vários laboratórios do planeta para tentar entender a função dessas moléculas nos sistemas biológicos. Logo foi constatada a grande diversidade de ncRNAs em diferentes organismos e que uma classe especial de ncRNA participa ativamente da regulação gênica, tornando os promotores inacessíveis aos fatores de transcrição e à RNA polimerase. Essas pequenas moléculas alteram a natureza física da cromatina por meio da metilação de histonas e bases nitrogenadas (silenciamento gênico transcricional). Outro grupo, os miRNA, liga-se aos mRNAs, degradando, inibindo ou reduzindo a velocidade de tradução (silenciamento gênico pós-transcricional). Atualmente, sabe-se que os ncRNAs desempenham um papel central na regulação gênica e que eles participam direta ou indiretamente de todos os processos celulares. Esse mecanismo de regulação da expressão gênica não altera a composição de bases do DNA, portanto é de natureza epigenética, e pode ser transiente ou definitivo. Neste último caso, as modificações na estrutura da cromatina são transmitidas às próximas gerações. Neste documento, abordaremos o complexo mecanismo de controle transcricional da expressão gênica que envolve a metilação de histonas e DNA da cromatina.

*Frederico Ozanan Machado Durães*  
Chefe-geral

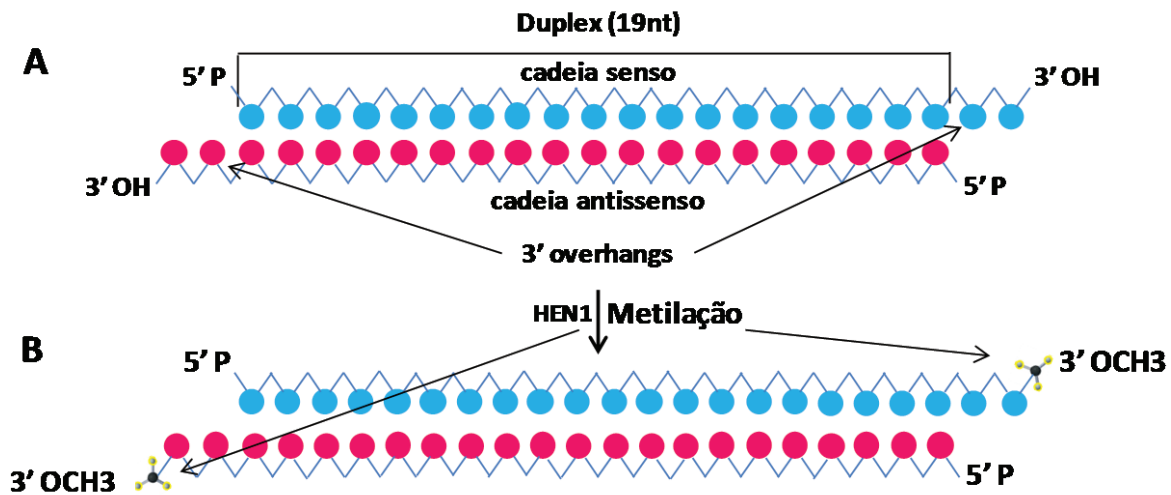
## Sumário

Introdução .....	07
Metilação de DNA Dependente de RNA (RNA-dependent DNA methylation, RdDM) .....	09
Biogênese da Metilação de Histonas e Remodelagem da Cromatina.....	09
Biogênese da Metilação do DNA .....	11
Modelo de Metilação de DNA Dependente de RNA em Plantas. ....	13
Componentes do Sistema de Silenciamento Gênico .....	14
RNA Polimerase IV (Pol IV) e RNA Polimerase V (Pol V) .....	17
Endonuclease Dicer (Dicer-like).....	18
HUA ENHENCER.....	19
Família de Proteínas Argonautas (AGO) e PIWI.....	19
Complexo Indutor do Silenciamento Gênico (RISC).....	21
Descrição de RdDM em Plantas.....	22
Aplicações do Silenciamento Gênico.....	24
Alterações introduzidas no genoma.....	26
Deteccção e identificação do evento .....	26
Conclusões.....	27
Referências.....	27

## Introdução

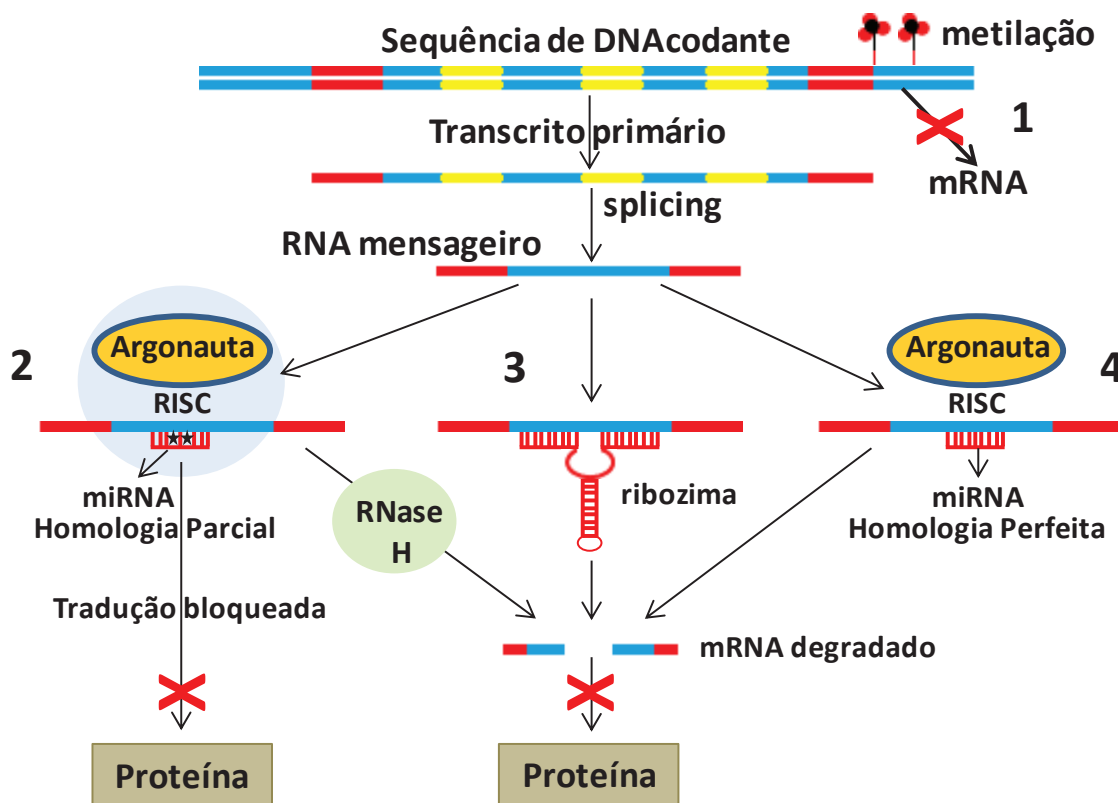
Ao longo da vida de um organismo, a transcrição do DNA e a tradução do mRNA são processos seletivos muitas vezes determinados por condições externas. A supressão da transcrição de um gene decorrente da metilação de histonas (Jeddeloh et al., 1999) e/ou de nucleotídeos do DNA (Finnegan et al., 1996) e o impedimento da tradução do mRNA são mecanismos universais entre os eucariotos, denominado silenciamento epigenético (Chen et al., 2008). A metilação do DNA envolve modificações das ligações covalentes dos nucleotídeos e histonas que alteram a estrutura da cromatina do loci homólogo ao RNA-alvo afetando a expressão dos genes de modo reversível ou permanente (Morel et al., 2000). Quando essas mudanças no padrão da expressão gênica são estáveis, elas passam a ser transmitidas às gerações seguintes, e uma vez que não alteram a sequência do DNA, representam um exemplo de mecanismo epigenético, o qual constitui uma adaptação dos organismos às variações das condições ambientais ou internas das células. Entre os fatores internos e externos que desencadeiam esse processo celular, podemos destacar o material genético viral, transgenes, elementos transponíveis (transposons) e microRNAs (Lu; Yang, 2010; Ouyang et al., 2014; Bologna; Voinnet, 2014; Wang et al., 2019). Além disso, outros fatores internos também determinam o silenciamento gênico, tais como o *imprinting* genômico em que apenas os genes de um dos parentais são expressos e, portanto, atua de maneira independente do padrão de herança mendeliana; o “efeito de posição” em que a expressão do gene é alterada por causa da mudança de sua posição no genoma, geralmente decorrente de translocação (McClintock, 1942); e por último, a paramutação que resulta da interação entre os dois alelos de um determinado locus gênico, em que se observa a mudança no padrão hereditário de um dos alelos em razão da interferência do seu alelo correspondente. Nesse último caso, o alelo paramutado apresenta níveis alterados de expressão gênica, e essa alteração poderá ser mantida nas gerações seguintes, mesmo na ausência do alelo paramutagênico (Hollick, 2017). Todos os casos mencionados representam alterações epigenéticas (Felsenfeld, 2014).

O silenciamento mediado por RNA pode ser iniciado pela entrada de DNA exógeno nas células (transgene, por exemplo) ou RNA (vírus) e envolve um ou mais loci gênicos que na maioria das vezes apresentam repetições invertidas (Pyott; Molnar, 2015; Guo et al., 2019). Os mecanismos envolvidos na supressão da expressão gênica transcricional e pós-transcricional são controlados por famílias de moléculas de RNA pequenos (RNAi ou siRNA, do inglês, small interfering RNAs), cujos tamanhos variam predominantemente entre 21 e 25 nucleotídeos e que atuam como mediadores da regulação gênica (Kamthan et al., 2015) (Figura 1). Os siRNAs são classificados em três tipos principais, com base nas diferenças entre seus precursores, biogênese, e proteínas que se associam a eles. Assim, temos os microRNAs (miRNAs), RNAs interferentes pequenos (siRNAs) e RNAs que interagem com proteínas Piwi (piRNAs) (Ambros; Chen, 2007; Kim et al., 2009). Em plantas, siRNAs pertencem a duas classes de tamanhos diferentes. Os siRNA com 21-22nt participam da clivagem do RNA e a classe com 24nt estão envolvidos nas modificações da cromatina (Hamilton et al., 2002). Alguns autores relacionam também uma terceira classe de moléculas pequenas de RNA, cujos tamanhos podem variar entre 25 e 30 nucleotídeos e são denominados de RNAs pequenos não codificantes (sncRNAs, small non-coding RNAs) que desempenham funções importantes nos processos de desenvolvimento e resposta aos estresses bióticos (Guo et al., 2016; Brant; Budak, 2018).



**Figura 1. Estrutura geral do siRNA.** Cada uma das cadeias de siRNA apresenta dois nucleotídeos livres na extremidade 3' OH. Em (A), está sendo mostrado o siRNA gerado pela atividade da RNase III Dicer. Em (B), temos a representação do siRNA metilato na posição 2'-OCH<sub>3</sub> pela atividade da enzima RNA metil transferase HEN1 (HUA ENHENCER). Nas etapas seguintes do silenciamento gênico, uma das cadeias é selecionada para compor o complexo de silenciamento RISC, enquanto a outra cadeia é degradada.

A trajetória da informação genética do DNA cromossômico até a sua conversão em polipeptídeos ocorre em quatro etapas distintas: 1 - transcrição do DNA presente no núcleo originando moléculas de pré-RNA, 2 - processamento nuclear do RNA, 3 - transporte do RNA maduro (mRNA) para o citoplasma e, 4 - tradução do mRNA, dando origem a polipeptídeos. Portanto, a regulação da expressão gênica pode ocorrer nos níveis transcricional (TGS = transcricional gene silencing), pós-transcricional (PTGS = Post-transcricional gene silencing) e traducional (Hammond, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. Diferentes tipos de silenciamento gênico endógeno em plantas.** Silenciamento transcricional por metilação de DNA e histonas (1) e silenciamento pós-transcricional por microRNA (2 e 4), e ribozima (3).



## Metilação de DNA Dependente de RNA (RNA-dependent DNA methylation, RdDM)

Os pequenos RNAs não codificadores (do inglês non-coding RNA, ncRNA) regulam a expressão gênica, tanto no nível transcricional, como pós-transcricional e desempenham papel crucial durante o desenvolvimento, *imprinting* e manutenção da integridade dos genomas de todos os organismos eucariotos (Wierzbicki, 2012; Fatica; Bozzoni, 2014; Holoch; Moazed, 2015).

O processo de inibição da expressão gênica denominado “metilação de DNA dependente de RNA” (RNA-dependent DNA methylation, RdDM) representa um caso de alteração epigenética em que moléculas pequenas de siRNA (ncRNA) são formadas para guiar a metilação de histonas do promotor do *locus* complementar ao siRNA e pode ocorrer no nível transcricional ou pós-transcricional, conforme foi mencionado anteriormente.

O deslocamento (jumping) de transposons de um locus para outro, altera a janela aberta de leitura do gene (ORF = Open Reading Frame), podendo gerar instabilidade genômica e mutações deletérias para o organismo (Pray, 2008). O silenciamento de transposons é um exemplo de silenciamento gênico transcricional que resulta na alteração de histonas, tornando o DNA nessa região inacessível para a transcrição (Fultz et al., 2015; Gross, 2006; Halic; Moazed, 2009). Em *Arabidopsis*, siRNAs de 24nt são endereçados para a via RdDM e desempenham papel central na repressão de elementos transponíveis, portanto, mantendo a integridade e estabilidade genômica (Law; Jacobsen, 2010).

## Biogênese da Metilação de Histonas e Remodelagem da Cromatina

Enquanto o silenciamento pós-transcricional ocorre pelo bloqueio da tradução ou degradação de RNA mensageiro específico, o silenciamento transcricional se dá pela metilação de histonas do promotor do gene-alvo e remodelagem da cromatina, tornando-a inacessível aos fatores de transcrição e à RNA polimerase (Figura 2). No silenciamento transcricional, a região promotora do gene é hipermetilada, enquanto no silenciamento pós-transcricional o promotor está ativo. Em ambos os casos, o silenciamento gênico confere às células imunidade genômica contra vírus e transgenes.

As modificações epigenéticas que podem ser observadas em histonas são alterações pós-traducionais (PTM = post-translational modification), ou seja, após a sua síntese, e envolve a metilação, fosforilação acetilação, ubiquitinação e SUMOilação (Small Ubiquitin-like Modifier = SUMO) (Wood; Shilatifard, 2004). Essas modificações podem alterar a expressão gênica por causa das modificações que elas provocam na estrutura da cromatina conhecidas por remodelagem de cromatina, tornando-a inacessível às RNA polimerases (Kuo; Allis, 1998; Dokmanovic et al., 2007; Miura; Hasegawa, 2010; Wilkinson; Henley, 2010; Greer; Shi, 2012). Nos últimos anos, um conjunto de evidências experimentais revelou o impacto da metilação de histonas e dos nucleotídeos citosina e adenina do DNA, para a manipulação genômica, regulação da transcrição gênica e controle do desenvolvimento de plantas. A metilação de histonas desempenha um papel central na regulação de diversos processos durante o desenvolvimento de organismos eucariotos, tais como ativação e inativação da transcrição, alteração da estrutura da cromatina, por condensação durante a divisão celular, reparo de danos no DNA e manutenção da estabilidade genômica por meio do silenciamento da expressão de sequências repetitivas no DNA, ou seja, Sequências Repetidas Intercaladas (IRS = Interspersed repeat sequences) ou elementos transponíveis (ETs), Sequências Repetitivas Simples

(SSRs = simple sequence repeats) que consistem de repetições em tandem de tamanhos exatos ou próximo disso  $k$  ( $k$ -mers) com  $k = 1-13$ , correspondendo aos microssatélites, e  $k = 1-500$ , para minisatélites (Huda et al., 2009).

A metilação de histonas ocorre pela transferência de 1, 2 ou 3 grupos metil da S-adenosil-L-metionina para os resíduos de lisina (Lis/K) e arginina (Arg/R) das histonas H3 e H4. Essa reação é feita por uma grande família de distintas enzimas histonas metil-transferases (HMTs): as histona-lisina metiltransferases (histone lysine methyltransferases = HKMTs) e proteína-arginina metiltransferases (protein arginine methyltransferases = PRMTs) que ligam grupos metil covalentemente às histonas, e dessa forma controlam a atividade gênica por meio da sua repressão ou ativação dependente da cromatina (Liu et al., 2010).

Longe de ser um processo simples e aleatório, as alterações epigenéticas no DNA envolvem grande número de enzimas coadjuvantes, e no caso das histonas, ocorre em resíduos de aminoácidos específicos. Apesar da universalidade desse processo, variações e particularidades têm sido descritas em todos os organismos estudados. Por exemplo, na maioria das espécies, a histona H3 é acetilada nas lisinas 9, 14, 18, 23, e 56, metilada na arginina 2 e lisinas 4, 9, 27, 36, e 79, e fosforilada na serina 10 e 28, treonina 3 e Thr11, enquanto que a histona H4 é acetilada principalmente nas lisinas 5, 8, 12 e 16, metilada na arginina 3 e lisina 20, e fosforilada na serina 1 (Kuo; Allis, 1998; Greer; Shi, 2012). Portanto, a detecção dos pontos exatos onde ocorrem essas complexas modificações em proteínas histônicas é crucial para o entendimento da regulação epigenética dos processos de diferenciação celular e do desenvolvimento, bem como para o planejamento de estratégias de silenciamento ou indução da expressão gênica (Bannister; Kouzarides, 2001).

Existem várias enzimas histona-metiltransferases específicas para os resíduos de lisina ou arginina presentes nas histonas e o número de tipos diferentes varia de um organismo para o outro (Black et al., 2012). Em mamíferos, por exemplo, SET1A, SET1B, SET7/9, KMT2F, KMT2G, Ash1, ALL-1, MLL, ALR, Trx, e SMYD3 são metiltransferases de histona H3 que catalizam a metilação de H3 na lisina 4 (H3K4) enquanto KMTase ESET (SetDB1, ou KMT1E), G9a, SUV39-h1, SUV39-h2, SETDB1, Dim-5, e Eu-HMTase são histonas metiltransferases que catalizam a metilação da lisina 9 (H3K9) da histona H3 (Dodge et al., 2004; Hyun et al., 2017). Enzimas dos grupos G9a e polycomb EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) são histonas metiltransferases que catalizam a metilação de H3 no resíduo de lisina da posição 27 (H3K27) promovendo a remodelagem da cromatina (Hennig; Derkacheva, 2009; Morey; Helin, 2010; Li et al., 2018; Yan et al., 2018). EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) presente em animais, e suas homólogas CLF, SWN e Mea em plantas, são enzimas histona-lisina N-metiltransferases que participam da metilação de histona catalisando a adição de grupos metil à lisina 27 da histona H3. Essas enzimas são genericamente designadas como Componentes Enzimáticos do Complexo Repressivo Polycomb 2 (PRC2), o qual é responsável pelo desenvolvimento embrionário normal mantendo as alterações epigenéticas dos genes envolvidos na regulação do desenvolvimento e diferenciação celular em animais e plantas (Hennig; Derkacheva, 2009; Morey; Helin, 2010). Ambas as metilações nas posições H3K9 e H3K27 determinam a remodelagem de heterocromatina e dessa forma participam do silenciamento gênico. Em animais, por exemplo, o aumento global de metilação H3K27 está relacionada com processos patológicos como o câncer (Greer; Shi, 2012). Contudo, cabe ressaltar que, dependendo do local do DNA, HMTs podem tanto suprimir quanto ativar genes. Isso depende do resíduo de aminoácido onde ocorre a metilação e o efeito pode ser um ou outro. Por exemplo, metilação dos resíduos de lisina (K) da histona H3 nas posições 9 (H3K9) ou 27 (H3K27), bem como do resíduo K20 da histona H4 (H4k20), causa a desativação gênica, enquanto a metilação dos resíduos 4, 36 ou 79 de lisina

de H3 (H3K4, H3K36 e H3K79) ativa a expressão gênica (Moore et al., 2013; Guerrero-Bosagna, 2013).

Enzimas remodeladoras de cromatina e enzimas modificadoras de histonas também participam da metilação, e provavelmente da desmetilação do DNA. A desmetilação do DNA é mediada pela enzima ROS1 (repressor of silencing 1) da subfamília de proteínas 5-metil-citosina DNA glycosilases que atuam por meio da ejeção de bases metiladas do DNA seguido por reparo, ou seja, substituindo a base metilada por outra equivalente não metilada. Dessa forma essas proteínas previnem o silenciamento gênico ao nível da transcrição. Outra proteína pequena (Small RNA binding proteins), ROS3, é essencial para regular a desmetilação do DNA. Essa proteína possui motivos específicos de reconhecimento de RNA e o produto ROS3/RNA direciona a ligação de ROS1 aos sítios-alvos do DNA evitando a hipermetilação do DNA (Zheng et al., 2008; Li et al., 2018).

SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) é um complexo proteico remodelador de nucleossomos encontrado em eucariotos. Este grupo de proteínas se associa para remodelar a forma de empacotamento da cromatina, sendo composto por várias proteínas codificadas pelos genes *SWI* e *SNF* (*SWI1*, *SWI2/SNF2*, *SWI3*, *SWI5*, *SWI6*) e outros polipeptídeos. O complexo possui atividade ATPase induzida pelo DNA e pode desestabilizar as interações histona/DNA e reconstituir os nucleossomos (Mani et al., 2017). A adição de grupos metil nos resíduos de citosina do DNA requer a assistência do complexo SWI/SNF (Zhu et al., 2013) que é acompanhado por modificações das histonas H3 e H4, tanto por desacetilação, quanto por metilação do tipo H3K9 (H3K9me) e desmetilação de H3K4 (Matzke; Mosher, 2014). Assim, os complexos SWI/SNF de remodelagem da cromatina dependentes de ATP são importantes reguladores da expressão gênica em eucariotos, e, em plantas, eles exercem papel crítico nos processos de desenvolvimento, crescimento e resposta aos diferentes tipos de estresse (Archacki et al., 2017).

## Biogênese da Metilação do DNA

Em 1975, foi proposto o primeiro mecanismo epigenético, a metilação do DNA que ocorria na inativação de um dos cromossomos X no sexo feminino, influenciando a expressão gênica e que possuía um padrão herdável (Holliday; Pugh, 1975; Riggs, 1975; Kubota et al., 1999). Esse mecanismo explica, em parte, as mudanças nos padrões de expressão gênica e a diferenciação celular ao longo do desenvolvimento.

A metilação do DNA no nível dos nucleotídeos ou histonas envolve o recrutamento de proteínas que causam a compactação da cromatina, impedindo que a enzima RNA-polimerase se ligue à molécula. Dessa forma não ocorre a expressão gênica, uma vez que a RNA-polimerase é a enzima responsável pela transcrição, ou seja, pela síntese de RNA a partir da informação contida na fita do DNA.

A biogênese da metilação do DNA-alvo de um siRNA é iniciada com um RNA transcrito pela enzima Pol IV, que em seguida é processado pela atividade das enzimas RDR2 (RNA polimerase 2 dependente de RNA), endonuclease DCL3 (helicase com um motivo RNase) e HEN1 (Hua enhancer = Small RNA 2'-O-methyltransferase), originando um siRNA de tamanho entre 21 e 24 nucleotídeos, que em seguida é carregado na proteína efetora Argonauta (AGO). Independentemente dessas reações, a enzima Pol V gera longos transcritos intergênicos não codantes (Pol V-dependent intergenic noncoding RNAs, IGN) (Wierzbicki et al., 2008), e ambos, a enzima Pol V e o seu longo transcrito, facilitam o recrutamento do complexo siRNA/AGO e dos componentes adicionais (RISC) para a cromatina (RdDM). Essa atividade por sua vez desencadeia o recrutamento e a atividade *de novo*

da enzima DNA metiltransferase (DRM2). Além disso, várias outras proteínas, complexos proteicos, DNA livre e alças entre DNA e histonas são necessários para consolidar o processo de recrutamento de Pol IV e Pol V para o alvo RdDM e a ocorrência da metilação. A associação de Pol IV em vários loci gênicos é dependente da atividade de SHH1 (Protein SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1) e sua ligação à histona H3 metilada na lisina 9 (H3K9me). A metilação H3K9, por sua vez, requer a presença de uma família de histonas metiltransferases que apresentam o domínio SET (130 a 140 resíduos de aminoácidos que interagem com a cromatina), entre elas: SUVH4, SUVH5, e SUVH6, que também funcionam como proteínas que se ligam ao DNA metilado. Esse conjunto de fatores gera alças de DNA e histonas metiladas promovendo a associação de SUVH4/5/6 com a cromatina. Isso possibilita a metilação de H3K9 ligada a SHH1, facilitando o recrutamento de Pol IV, a produção de siRNA e a metilação do DNA, completando e reforçando a formação da alça de DNA/histonas. Por sua vez, a associação da Pol V com a cromatina é dependente da presença do complexo DDR (DNA damage repair) que é composto por DMS3, DRD1, e RDM1, e duas proteínas associadas (SUVH9 e SUVH2) com afinidade por DNA metilado (He et al., 2014). Isso gera alças reforçadas nas quais a metilação do DNA promovida pela via RdDM é necessária para o posicionamento correto da Pol V e a ocorrência de metilações adicionais no DNA.

A metilação da citosina desempenha papel crucial no silenciamento gênico. A metilação no DNA consiste na adição de um radical metil (CH<sub>3</sub>) no carbono 5 da base nitrogenada citosina (C5me), quando esta é seguida por uma base guanina. Após a adição do radical metil, a base nitrogenada metilada passa a se chamar 5-metil-citosina. Essa adição é feita por enzimas DNA-metil-transferases (DNMTs) que podem ser de 3 tipos: DNMT3A e DNMT3B, responsáveis por fazer novas metilações (metilação *de novo*), e a DNMT1 que mantém o DNA metilado. A manutenção da metilação feita pela enzima DNMT1 é importante, uma vez que a desmetilação do DNA pode ocorrer de forma passiva, ou seja, naturalmente, ao longo das várias etapas da replicação. Se não houver a atividade da DNMT1, a citosina será desmetilada. Além do processo passivo, a desmetilação também pode ocorrer pela atividade enzimática. Nesses casos, a Methyl-CpG-binding domain (MBD), que possui atividade desmetilase, liga-se a regiões do DNA que contenha uma ou mais citosina/guanina simetricamente metiladas (CpGs = 5'—C—phosphate—G—3' em uma dupla fita de DNA) e transforma bases de citosina metilada em citosina (Zhang; Zhu, 2012).

A metilação da citosina tem dois padrões distintos: simétrico, quando ocorre em CG e CNG, em que N é qualquer base, exceto G, e assimétrico se ocorre em CNN. A metilação simétrica é mantida mesmo após a replicação do DNA, enquanto a metilação assimétrica deve ser refeita após a replicação. A cada nova cópia do DNA, a metilação deve ser mantida pela *methiltransferase 1 (MET1)* e requer a presença da RNA polimerase 6 dependente de RNA (RDR6) (Eamens et al., 2009; Brocklehurst et al., 2018). A metilação de sequência não-CG é mantida pela Chromomethylase3 (CMT3), que é mais ativa na metilação de transposons ou sequências similares, reduzindo a sua motilidade. Em *Arabidopsis*, CMT3 interage com a proteína homóloga de HP1 (heterochromatin protein 1) e esse dímero por sua vez interage com histonas metiladas (Tompa et al., 2002; Deng et al., 2016). A metilação da sequência CHH persiste pela atividade *de novo* da enzima Domains Rearrange Methyltransferase2 (DRM2) (Johnson et al., 2014). Ao longo do genoma somente sequências CG, CHG e CHH podem ser metiladas. O pareamento homólogo entre o siRNA e sequências de DNA, particularmente em regiões promotoras do gene, induzem a metilação de citosina, promovendo o silenciamento da transcrição.

## Modelo de Metilação de DNA Dependente de RNA em Plantas.

A RNA polymerase IV transcreve o DNA ou dsRNA (viral, por exemplo) para produzir ssRNA (pequeno RNA interferente) que é copiado a dsRNA pela RDR2 (RNA-dependent RNA polymerase II), que por sua vez é processado pelo complexo DCL3 (DICER-LIKE 3) com participação da DRB (DOUBLE-STRANDED RNA-BINDING PROTEIN), as sequências siRNAs com 24 nucleotídeos que são metilados na porção 2'-hidroxil pela RNA metilase HEN1 (HUA ENHANCER1), e ligado no AGO4 (Argonauta4). A remodelação da cromatina pela DRD1 é essencial para iniciar a transcrição pela Pol V, que também envolve o fator de alongação SPT-5 (SPT5L, supressor de inserção de Ty) e AGO4, o qual interage fisicamente com Pol V e SPT5L no terminal carboxi-WG/WG (vizinhança de resíduos de triptofano-glicina/glicina-triptofano). Os siRNA ligados a AGO4 interagem com o transcrito nascente da Pol V por pareamento de bases, ativando as enzimas modificadoras da cromatina, incluindo a metiltransferase DRM2 (DOMAIN REARRANGED METHYLASE 2) ao DNA adjacente (Moore et al., 2013). A cromatina pode agir como molde da Pol IV aumentando a produção de siRNA gerando assim um feedback positivo para aumentar o silenciamento (Wang; Dennis, 2009).

Em plantas, a desmetilação do DNA é iniciada por uma família de proteínas com atividade de DNA glicosilases, incluindo Demeter (DME), Repressor de Silenciamento 1 (ROS1), Demeter-like 2 (DML2), e Demeter-like 3 (DML3). ROS1 e DME são DNA glicosilases bifuncionais que removem 5-metilcitosina (mC) e cliva a cadeia de DNA (Li et al., 2018). Em seguida, o mecanismo de reparo dependente da existência de regiões do DNA apresentando bases excisadas [base excision repair (BER)-dependent mechanism] completa o processo de desmetilação por meio do reparo do DNA com uma citosina não metilada (Penterman et al., 2007; Zhu, 2009). Contudo, a desmetilação do DNA não é apenas um fenômeno crucial para a reprogramação genômica, mas controla a ativação gênica loc-específica durante o desenvolvimento de plantas (Hsieh et al., 2009; Li et al., 2018). Outro mecanismo de ativação gênica consiste da acetilação de histonas, em que ocorre a adição de um radical acetil (COCH<sub>3</sub>) nos resíduos de lisina das histonas em uma reação mediada por enzimas Histona Acetil-Transferases (HATs). A acetilação das histonas resulta na descompactação da cromatina, consequentemente ativando a expressão gênica. Por outro lado, enzimas Histonas Desacetilases (HDACs) retiram o radical acetil, promovendo a compactação da cromatina e inibindo a transcrição gênica.

Uma das características gerais do processo de metilação de DNA dependente de RNA (RdDM) é o fato de o sítio de ação da metilação estar em *cis*, isto é, na sequência de homologia reconhecida pelo siRNA que iniciou o processo. Isso garante que regiões próximas à região-alvo não sejam metiladas e, portanto, não sejam afetadas. No entanto, existem evidências que indicam que em *loci* intergênicos a RDR2 (RNA polimerase II dependente de Pol IV) pode induzir metilação em *trans* em alvos não específicos (You et al., 2013).

O silenciamento de transposons, consequentemente a manutenção da estabilidade genômica, é umas das funções mais bem estudadas da RdDM (Sigman; Slotkin, 2016; Nosaka et al., 2012). Por outro lado, a metilação e desmetilação locus-específico do DNA e a ativação de transposons nas condições de estresses abióticos indicam uma importante função da RdDM na resposta de plantas ao estresse (Negi et al., 2016; Joly-Lopez et al., 2017).



## Componentes do Sistema de Silenciamento Gênico

A via de silenciamento gênico em plantas envolve cinco classes principais de proteínas e grande número de proteínas coadjuvantes essenciais para o funcionamento do sistema de regulação endógena da expressão de genes específicos, e defesa contra DNA exógeno (vírus e transgenes) introduzido na célula (Figura 3; Tabela 1). As quatro classes são: RNA polimerases (Pol IV e Pol V) dependentes de RNA (RNA-dependent ribonucleases, RDRs), Ribonucleases Dicer-like (DCLs), HUA ENHENCER (HEN1), proteínas Argonautas (AGOs) e proteínas ligadoras de dsRNAs (dsRNA-binding proteins, DRBs) (Qu et al., 2008).

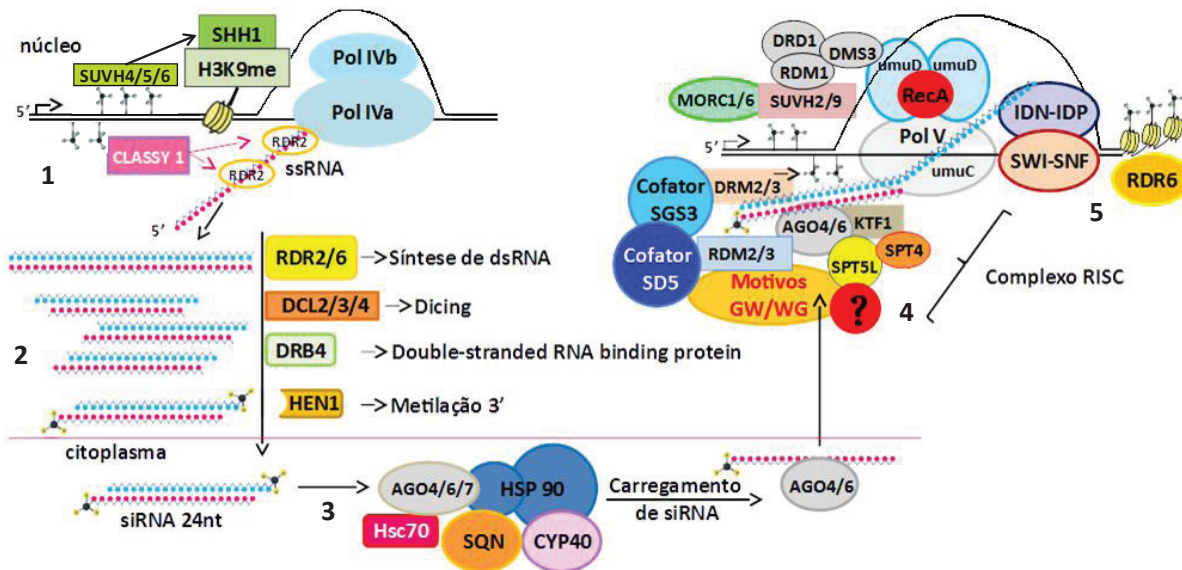


Figura 3. Esquema das diferentes etapas do processo de silenciamento gênico transcricional (TGS) por metilação do DNA dependente de siRNA (RdDM) e algumas moléculas protagonistas nesse processo.

No diagrama estão representadas as etapas do silenciamento gênico. Em (1) está sendo mostrado o modelo aceito atualmente para a biogênese do siRNA (21 nucleotídeos representados em esferas azuis). Pol IV reconhece regiões heterocromáticas no DNA onde existem ligações de SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1 (SHH1) (Law et al., 2013), e transcreve moléculas de precursoras de RNA que em seguida são processadas pela RNA polimerase II dependente de RNA (RDR2) originando RNAs dupla fita (dsRNAs). Em (2), as moléculas de dsRNAs são posteriormente clivadas pela enzima DCL2/3/4 (dicer-like) para produzir siRNAs com 21-25nt contendo um nucleotídeo livre em cada extremidade 3' (Matzke; Mosher, 2014). Proteínas ligadoras de RNA (DRB4) estabilizam o dsRNA (RNA duplex) que em seguida é metilado por HEN1. Em (3), o citoplasma AGO4 (6,7) se liga ao dsRNA em uma reação mediada por chaperonas moleculares (HSP70 e HSP90) e outras RNP (RiboNucleoproteínas) (Earley; Poethig, 2011). Em seguida, apenas uma das duas cadeias do dsRNA, complementar ao RNA ou DNA-alvo, é selecionada e permanece ligada ao RISC. A outra cadeia, denominada de "passenger" é provavelmente degradada. O mecanismo pelo qual uma das cadeias é retida no RISC ainda é desconhecido. Evidências indicam que o domínio MID de AGO4 reconhece e seleciona uma das cadeias do dsRNA com instabilidade termodinâmica (Nakanishi, 2016). Em (4), no núcleo, o complexo RISC reconhece a sequência do RNA-alvo sintetizado pela POL V que é complementar ao siRNA. A associação de POL V com a cromatina requer a presença do complexo DDR (SUVH2/9, RDM1, DMS3 e DRD1) e de duas proteínas (SUVH9 e SUVH2) que se ligam ao DNA metilado. Em (5) estão sendo representadas as proteínas envolvidas na remodelação da cromatina por meio da metilação do DNA e histonas

**Tabela 1. Principais componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional de eucariotos. (Continua)**

Gene	Função	Descrição
<b>SUVH4, SUVH5 e SUVH6</b> <b>Histonas metiltransferase</b>	- Família de proteínas com domínio SET e atividade de Histona metiltransferases. - Necessárias para a metilação H3K9 e também funcionam como proteína ligadora ao DNA metilado.	Zhou e Law (2015)
<b>SHH1</b> - SAWADEE HO-MEODOMAIN HOMO-LOG 1	- Interage com Pol IV e determina a sua ligação com o <i>locus</i> que deverá ser transcrito.	Ja et al. (2013) Law et al. (2013)
<b>*H3K9me</b> - Histona H3 metilada na lisina 9; <b>H3K-9me2</b> - Histona H3 dimetilada na lisina 9	- Presentes no sítio de início da transcrição de genes ativos. - Necessárias para ligação de Pol IV na região de promotor. - Recrutam RNAi para a cromatina e promove a amplificação de sRNA.	Barski et al. (2007) Zong et al. (2009)
<b>RDR2</b> - RNA-dependent RNA polymerase II	- Síntese da cadeia complementar de RNA transcrito por Pol IV.	Makeyev e Bamford (2002)
<b>CLASSY 1</b> <b>Família de proteínas remodeladoras de cromatina</b>	- Proteína remodeladora de cromatina que se liga à RDR2.	Smith et al. (2007)
<b>DCL2; Dicer-like 2</b>	- Cliva moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) produzindo moléculas pequenas de RNA duplex (siRNA).	Matzke e Mosher (2014)
<b>DRB4</b> - Double-stranded RNA Binding protein	- Associa com a proteína Dicer-like (DCLs) e está envolvida na biogênese de miRNA ou trans-acting-siRNA (tasiRNA) em plantas.	Han et al. (2004) Adenot et al. (2006) Manavella et al. (2012)
<b>HEN1</b> - sRNA 2'-O-metil transferase	- Biogênese de miRNA. - Metilação da extremidade 3' de siRNA duplex.	Li et al. (2005)
<b>AGO</b> - Argonauta	- Componente essencial de RISC. - Se liga ao siRNA duplex, seleciona uma das fitas e degrada a outra (passenger). - Cliva o mRNA na região complementar ao siRNA ligado a ela.	Hutvagner e Simard (2008)
<b>Hsc70 proteína 8</b> (HSPA8) - HSP71 cognata <b>HSP90</b> – Heat shock protein	- Hsc70 e Hsp 90 promovem a ligação de dsRNA no complexo RISC em uma reação dependente de ATP.	Iwasaki et al. (2010)
<b>CYP40/SQN</b> - complexo Cyclophilin 40 e SQUINT (SQN)	- Interage com SQN e Hsp90 citoplasmática ativando AGO. - Facilita a montagem do complexo RISC, promovendo o silenciamento gênico mediado por miRNA.	Earley e Poethig (2011) Fang e Qi (2016)
<b>*WG/GW</b> - Motivos repetidos (Triptofano- Glicina/ Glicina-Triptofano) em proteínas	- Repetições encontradas em várias proteínas envolvidas em silenciamento gênico (Argonauta), e também na subunidade maior (NRPE1) da RNA Pol V de Arabidopsis. - Recruta proteínas ARGONAUTE (AGO) para o silenciamento.	El-Shami et al. (2007) Karlowsk (2011) Zielezinski e Karlowski (2017)
<b>SD5</b> <b>SGS3</b> (suppressor of gene silencing 3)	- Cofatores de RDRs (RNA-dependent RNA polymerases). - Amplificam o sinal de silenciamento gênico, gerando siRNAs secundários e dispersando o silenciamento para outros órgãos da planta.	Jauvion et al. (2010)
<b>RDR/RdRP</b> - RNA polymerase dependente de RNA (RDR)	- O domínio RdRP cataliza a formação de dsRNA a partir de ssRNA. - São mediadoras de reações primer-dependente e primer-independente no mecanismo de silenciamento por RNA.	Wassenegger e Krczal (2006)

**Tabela 1. Principais componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional de eucariotos. (Continua)**

Gene	Função	Descrição
<b>proteína multidomínio SPT5L/KTF1</b> (KOW domain-containing Transcription Factor 1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SPT5L, também denominada como KTF1 é similar ao fator SPT5 de alongação da transcrição.</li> <li>- Associa-se com as RNA polimerases IV (RNAPIV) e V (RNAPV) facilitando a alongação.</li> <li>- Constitui um fator acessório da RdDM.</li> <li>- SPT5L interage com AGO4 e com a proteína “dedo de zinco” SPT4, modulando TGS em <i>Arabidopsis</i>.</li> </ul>	Huang et al. (2009) Sussman (2015)
<b>SPT4 (Zinc finger protein)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interage com SPT5L/KTF1 para modular o silenciamento gênico.</li> <li>- SPT4/SPT5 são fatores de alongação da transcrição (TEF) que interagem diretamente com a RNA polimerase II (RNAPII) para regular a síntese do RNA.</li> <li>- Em <i>Arabidopsis</i>, SPT4 interage com SPT5L/KTF1 modulando o silenciamento gênico transcricional.</li> </ul>	Dürr et al. (2014) Qi et al. (2019) Köllen et al. (2015)
<b>DRM2</b> - Domains Rearranged Methyltransferase 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DRM2 é a principal <i>de novo</i> DNA metiltransferase na rota do RdDM.</li> <li>- Desempenha papel catalítico.</li> </ul>	Cao et al. (2003) Naumann et al. (2011)
<b>RDM2</b> - RNA-directed DNA methylation 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RDM2, juntamente com NRPD1, NRPE1, - NRPD2a, HEN1, e DRD1 são componentes do RdDM e funcionam somente na via siRNA-dependente no silenciamento transcricional.</li> </ul>	He et al. (2009)
<b>RDR6</b> - RNA polimerase 6 dependente de RNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Envolvida na biogênese do siRNA.</li> <li>- Desempenha papel crucial no PTGS e resistência natural aos vírus.</li> </ul>	Peragine et al. (2004)
<b>SWI/SNF</b> - SWItch/Sucrose Non-Fermentable	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SWI/SNF é um complexo de remodelação de nucleossomos encontrado em eucariotos.</li> <li>- Apresenta atividade ATPase dependente de DNA.</li> <li>- As interações do complexo SWI/SNF com a cromatina possibilita a ligação dos fatores de transcrição, consequentemente aumentando a transcrição.</li> </ul>	Neigeborn e Carlson (1984) Decristofaro et al. (2001)
<b>IDN/IDP</b> - INVOLVED IN DE NOVO 2 (IDN2)–IDN2 PARALOGUE (IDP) complex	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Complexo parálogo IDN2–IDN2 (IDP) estabiliza o pareamento do arcabolo de siRNA (siRNA–scaffold), o qual liga RNA e interage com o complexo remodelador de cromatina SWI/SNF que contém a subunidade SWI3B do complexo SWI/SNF, e dessa forma participa do silenciamento transcricional mediado pela POL V alterando o posicionamento dos nucleossomos.</li> </ul>	Ausin et al. (2009)
<b>UmuD/ UmuC</b> Subunidades de POL V	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O homodímero UmuD e o monômero UmuC da Pol V formam o complexo proteico.</li> <li>- UmuD’2C que previne danos ao DNA ao retardar as reações de reparo de erros da molécula.</li> </ul>	Sutton e Walker (2001)
<b>RecA</b> – Enzima de recombinação homologa A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A família de proteínas RecA reconhece sequências homólogas no DNA genômico.</li> <li>- Domínio helicase com atividade de ATPase presente em proteínas com atividade de desenovelamento de DNA e montagem do complexo de spliceossomo.</li> <li>- Fator obrigatório para induzir a atividade de reparo de pol V para mutagênese SOS.</li> </ul>	Kowalczykowski (2000) Akay et al. (2017)
<b>SUVH2/SUVH9</b> - SET domain-containing SU(VAR)3–9 homologs SUVH2 and SUVH9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cataliza a metilação do resíduo de lisina da histona H3 (H3K9).</li> <li>- Interage com o complexo DDR (DMS3, DRD1, RDM1) remodelador de cromatina e com o complexo composto pela proteína da família Microorchidia (MORC) MORC1 e MORC6.</li> <li>- SUVH2 e SUVH9 se ligam ao DNA metilado no locus RdDM e interagem com o complexo DDR recrutando a Pol V no locus RdDM para produzir RNAs não codantes.</li> </ul>	Law e Jacobsen (2010) Liu et al. (2014)



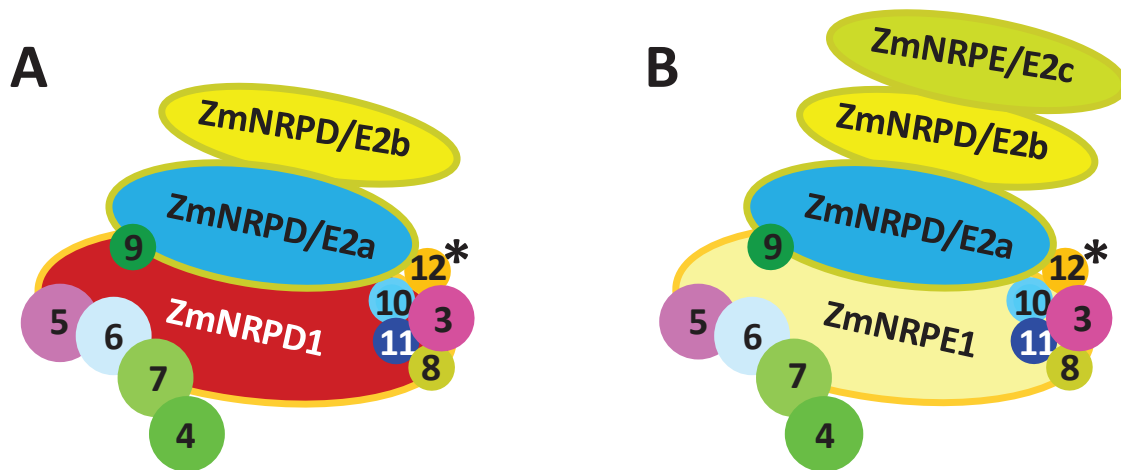
**Tabela 1. Principais componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional de eucariotos. (Continua)**

Gene	Função	Descrição
<b>RDM1</b> - RNA-Directed DNA Methylation 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liga-se à cadeia simples de DNA metilado</li> <li>- É componente do complexo DDR.</li> <li>- É necessária para o recrutamento da Pol V para o locus RdDM.</li> <li>- Responsável pelo acúmulo de RNAs não codantes produzidos pela Pol V.</li> <li>- Envolvida na via de reparo de DNA.</li> </ul>	Law et al. (2010)
<b>DRD1</b> - defective in RNA-directed DNA methylation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pertence a subfamília SWI2/SNF2 de remodeladores de cromatina.</li> <li>- Facilita a dinâmica da regulação da metilação do DNA.</li> <li>- Membro do complexo de remodelagem da cromatina.</li> </ul>	Wierzbicki et al. (2008) Zhong et al. (2012)
<b>DMS3</b> - MERISTEM SILENCING 3 (DMS3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Componente do complex RdDM provavelmente facilitando modificações epigenéticas mediadas por RNAi envolvendo siRNAs secundários e ampliando a metilação do DNA.</li> <li>- Envolvida na montagem do complexo de início da transcrição pela RNA polimerase V (Pol V) e complexos de elongação na cromatina.</li> <li>- Necessária para a metilação <i>de novo</i> do DNA.</li> </ul>	Kanno et al. (2008)
<b>MORC1/6</b> (Microrchidia)-ATPase da família da adenosina trifosfatase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Associa-se com SUVH2 e SUVH9 promovendo a ligação de Pol V ao loco RdDM.</li> <li>- Participa do silenciamento gênico transcricional.</li> <li>- Confere resistência basal, non-host resistance e resistência sistêmica adquirida (SAR).</li> <li>- Liga DNA/RNA de modo não específico e exibe atividade exonuclease.</li> <li>- Está provavelmente envolvida no reparo de DNA.</li> <li>- Importante repressor de transposons.</li> </ul>	Liu et al. (2014) Moissiard et al. (2014)

\* Componente não enzimático do silenciamento gênico.

## RNA Polimerase IV (Pol IV) e RNA Polimerase V (Pol V)

RNA polimerases são holoenzimas de elevado peso molecular que apresentam subunidades catalíticas e regulatórias (Zhou; Law, 2015). Entre o conjunto de RNA polimerases existentes em organismos eucariotos, a enzima RNA polimerase II (Pol II) é a mais bem caracterizada, mas o mesmo não é verdadeiro para as enzimas Pol IV e Pol V. Sabe-se, por exemplo, que a primeira e a segunda subunidades de Pol II formam o centro catalítico e várias subunidades menores controlam aspectos importantes do funcionamento da enzima (Wierzbicki et al., 2012). Contudo, em Pol IV e Pol V, a função das subunidades menores permanece desconhecida, e isso inclui a seleção do molde para reconhecimento da enzima, o fator de iniciação, elongação, fidelidade transcricional, terminação e processamento do RNA (Pikaard; Tucker, 2009; Ream et al., 2009). A estrutura de Pol IV e Pol V de milho com suas subunidades associadas pode ser observada na Figura 4.



**Figura 4. Esquema da estrutura das enzimas Pol IV (A) e Pol V (B) do milho.** As cores iguais indicam as subunidades conservadas nas duas enzimas e a cor diferente mostra a subunidade diferente em ambas as enzimas (ZmNRPD1 e ZmNRPE1). O asterisco indica a subunidade 12 que está presente na Pol I, II e III e nas enzimas Pol IV e Pol V de *Arabidopsis*, mas que não foi identificada em Pol IV e Pol V de milho após purificação por cromatografia de afinidade (Haag et al., 2014).

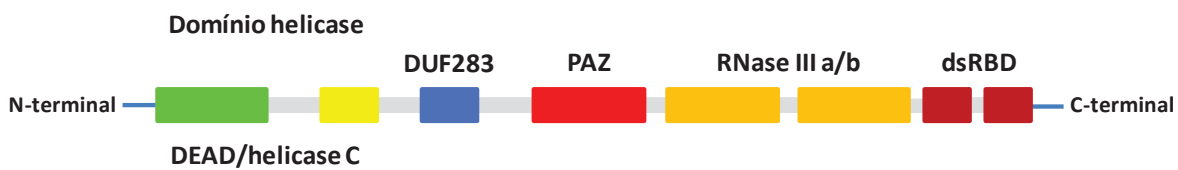
## Endonuclease Dicer (Dicer-like)

Dicer é uma família de enzimas com atividade de endonuclease (RNase III-like) que cliva especificamente moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) ou RNA de fita simples apresentando estruturas em alça (loop) como pode ser observado nos precursores dos microRNAs. Após a clivagem são originadas moléculas pequenas de RNA contendo entre 20 e 30 nucleotídeos, denominados por miRNAs e siRNA, que estão envolvidos no silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional.

As endonucleases Dicer dependentes de RNA (type III RNA endonuclease DICER) desempenham papel importante fornecendo o RNA inicial, ou substrato, para ativação do complexo RISC. Quando Dicer cliva o pre-miRNA na conformação de alça, ou o dsRNA, são formados fragmentos de RNA dupla fita com 20 a 25 nucleotídeos que apresentam dois nucleotídeos livres nas duas extremidades 3' de cada molécula formada. Apenas uma das cadeias do RNA dupla fita é incorporada ao complexo RISC. Essa cadeia simples, ou fita guia, é selecionada por proteínas da subfamília Argonata com atividade de RNase e que constituem a unidade catalítica do complexo RISC (Preall et al., 2006).

As proteínas Dicer são altamente conservadas em todos os organismos eucariotos até agora estudados. Em plantas, essas proteínas são denominadas por Dicer-like (DCL) e apesar de apresentarem algumas diferenças em relação ao grupo dos animais, todas possuem os mesmos domínios funcionais (Fukudome; Fukuhara, 2017). Dicer apresenta quatro domínios distintos: 1 - domínio helicase aminoterminal; 2 - motivo duplo de RNase III na extremidade carboxiterminal, cuja atividade origina miRNA, siRNA (small interfering RNAs), tRF (transfer RNA-related fragments), sdRNA (stable derived small non-coding nucleolar RNA (snoRNA), rasiRNA (repeat-associated siRNAs), riRNA (repeat-induced small RNAs) e sCNG (small CNG-repeated RNAs); 3 - domínio de ligação de dsRNA; 4 - domínio PAZ com aproximadamente 110-130 resíduos de aminoácidos, presente em proteínas que se ligam ao RNA tais como Ago e Piwi, cuja função parece ser a de facilitar a interação proteína/proteína que participa do complexo de formação dos sRNAs (Song; Rossi, 2017) (Figura 5). A ativação de Dicer é dependente de ATP, e a perda da função de Dicer inibe o processo de silenciamento gênico *in vitro* (Fukudome; Fukuhara, 2017; Song; Rossi, 2017). Em *Arabidopsis thaliana*, essa família está representada por cinco proteínas (DCL1 a DCL5) que apresentam atividades distintas. DCL1 determina a produção de miRNA e sRNA contra sequências

de DNA apresentando repetições invertidas. DCL2 gera siRNA de cadeias antissenso em relação aos transcritos (atua em *cis*) com 22 nucleotídeos que estão envolvidos na imunidade e defesa viral, DCL3 gera siRNAs com 24 nucleotídeos que participam de modificações estruturais da cromatina (metilação de DNA e histonas e rearranjo estrutural de cromatina), e DCL4, responsável pelo metabolismo de siRNA, gerando moléculas com 21 nucleotídeos que atuam em *trans* no silenciamento gênico pós-transcricional (Xie et al., 2004; Liu et al., 2009; Xie; Yu, 2015; Roy; Datta, 2017). DCL5 (previamente designada por DCL3b) processa moléculas longas de RNA não codificantes, os lncRNAs (Long non-coding RNAs), gerando miRNAs (microRNAs primários) que por sua vez originam siRNAs secundários conhecidos como phased siRNAs (phasiRNAs = tasiRNA-like siRNAs) e tasiRNAs (phased trans-acting siRNA) de 24-nucleotídeos (Nagano et al., 2013; Böhmendorfer et al., 2014; Jarroux et al., 2017; Kakrana et al., 2018; Zhang et al., 2018).



**Figura 5. Representação esquemática da proteína DICER/DCL.** A extremidade N-terminal da proteína possui atividade de helicase, necessária para o relaxamento da dupla cadeia de ácidos nucleicos. Os domínios DUF283 (aminoterminal) presentes apenas em proteínas DICER, e dsRBD (carboxiterminal) são os domínios de ligação de RNAs dupla fita, sendo fundamentais para o posicionamento correto do dsRNA e, consequentemente, para o funcionamento correto de DICER. Em plantas, o domínio dsRBD está duplicado, conforme representado, e também está envolvido no controle da especificidade dos produtos sRNA. O domínio PAZ reconhece dsRNA que apresentem dois nucleotídeos livres nas extremidades 3', possibilitando sua interação com DICER. Os domínios catalíticos com atividade de RNaseIII formam um pseudo dímero em torno do dsRNA para iniciar a clivagem das cadeias de RNA.

## HUA ENHENCER

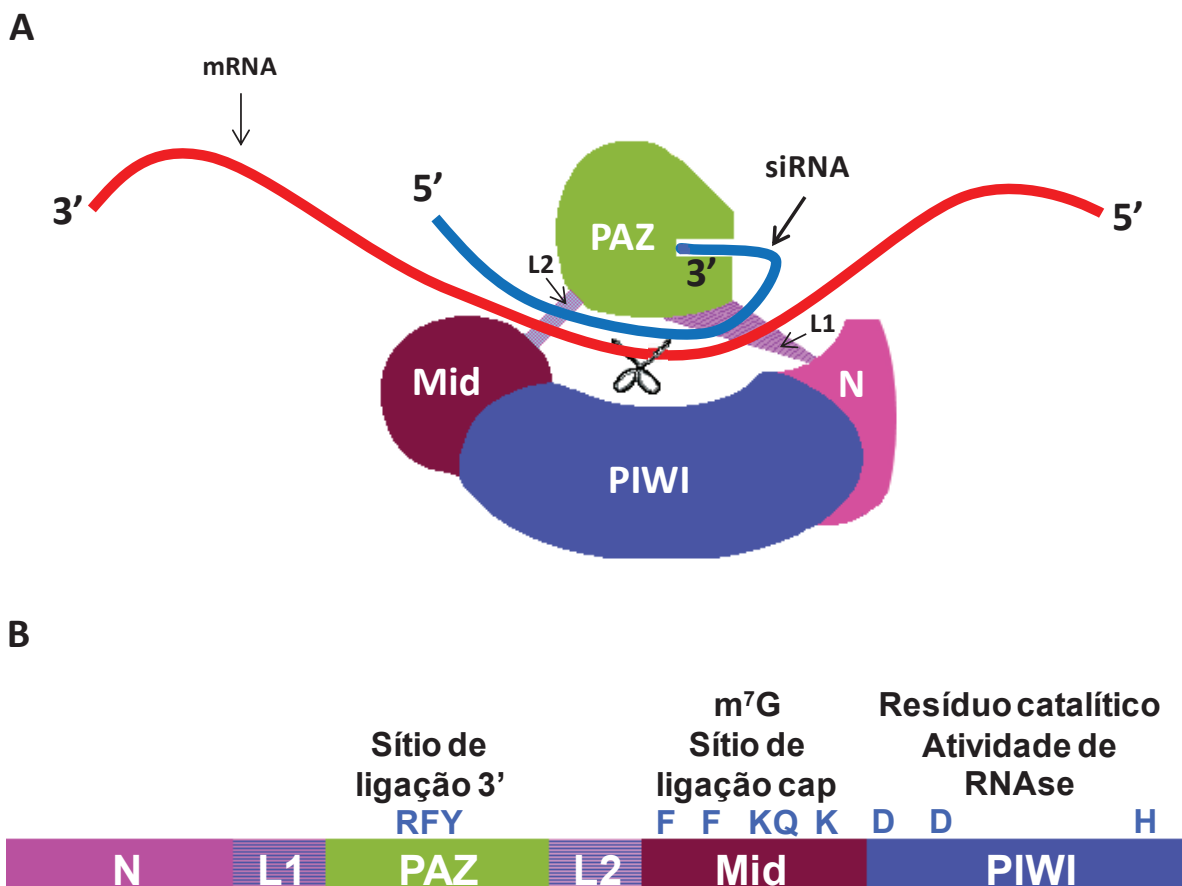
HUA ENHENCER (HEN1) e suas homólogas são RNA metiltransferases que modificam as extremidades 3' de duplex siRNA/siRNA e miRNA/Mirna, preferencialmente contendo 21-24 nucleotídeos e 2 nucleotídeos livres nas extremidades 3'. Em seguida HEN1 metila o grupo 2'OH do nucleotídeo terminal (2'OMe), e essa metilação funciona como um ativador dessas moléculas pequenas de RNA que passam a funcionar como iniciadores (primers) para extensão da cadeia de RNA via RdRP. Essa etapa é imprescindível para o ciclo seguinte do silenciamento gênico (Yang et al., 2006; Huang et al., 2009). HEN desempenha papel crucial no desenvolvimento de plantas (Chen et al., 2010) e na resistência aos vírus (Mourrain et al., 2000). HEN1 foi caracterizada bioquimicamente, sendo possível verificar que ela metila miRNAs dupla fita e siRNAs para atuarem como iniciadores (primers) para que RdRPs gerem mais siRNAs (Yang et al., 2006). Segundo Yang et al. (2006), a presença de 2'OMe em siRNAs de plantas pode influenciar, positivamente ou negativamente, a habilidade de RdRPs usarem os siRNAs como iniciadores.

## Família de Proteínas Argonautas (AGO) e PIWI

As proteínas da família Argonauta (AGO) desempenha papel-chave na via de RNA interferência (RNAi) e estão envolvidas na regulação da expressão gênica transcricional e pós-transcricional, além de desempenhar a função de manter a integridade genômica (Bajczyk et al., 2019). As primeiras proteínas da família Argonauta (AGO) foram descritas em plantas (Höck; Meister, 2008), e posteriormente, foram também identificadas em diferentes grupos de organismos eucariotos. Inicialmente elas foram referidas pelo nome de proteínas PAZ em razão da existência de um domínio único na parte central da proteína presente em três membros dessa família: *Drosophila* P

ELEMENT-INDUCED WIMPY TESTIS (PIWI), “*Arabidopsis* ARGONAUTE1”, (AGO1) e “*Arabidopsis* ZWILLE”, (ZLL) (Vaucheret, 2008; Fang; Qi, 2016). Todos os membros dessa família compartilham quatro domínios estruturais: o domínio amino-terminal, pouco conservado; PAZ (Piwi-Argonauta-Zwille); Mid (do inglês, middle) e PIWI (Figura 6). O domínio PAZ possui uma conformação OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding fold, OB fold) que possibilita a ligação de proteínas AGO aos ácidos nucleicos de cadeia simples (ssDNA) (Flynn; Zou, 2010).

As proteínas da família AGO são classificadas em duas subfamílias: AGO e Piwi (Tolia; Joshua-Tor, 2007; Rodríguez-Leal et al., 2016). As proteínas PIWI (*Drosophila* P ELEMENT-INDUCED WIMPY TESTIS) foram inicialmente identificadas em *Drosophila*, e posteriormente em vários grupos de organismos (Lin; Spradling, 1997; Ku; Lin, 2014). Esse grupo de proteínas regulatórias é responsável pela manutenção das células germinativas (self-renewal) ou gonadais, inibindo a atividade de elementos transponíveis e determinando o destino das linhagens celulares durante o desenvolvimento e gametogênese (Cox et al., 1998). Na maioria dos organismos, a expressão das proteínas PIWI está restrita às linhagens de células germinativas, onde se ligam às proteínas que interagem com PIWI (Piwi-interacting proteins (piRNAs), regulando principalmente a atividade de transposons e outros alvos para manter a integridade genômica (Höck; Meister, 2008; Suzuki et al., 2012).



**Figura 6. Esquema mostrando a estrutura da proteína Argonauta (AGO).** Em (A) está sendo representada a estrutura da proteína Argonauta e sua interação com o substrato siRNA/mRNA. O domínio N-terminal de reconhecimento da extremidade 5' do mRNA é ligado ao domínio PAZ pelo linker L1. O linker L2 conecta PAZ e o domínio Mid, seguido do domínio catalítico PIWI, situado na região carboxiterminal da proteína. Em (B), no domínio PAZ, os resíduos R (arginina), F (fenilalanina) e, Y (triptofano) são responsáveis pela ligação do terminal 3' do siRNA ou miRNA à proteína. No domínio Mid, os resíduos K (lisina) e Q (glutamina) são necessários para a ligação da extremidade 5' do siRNA e pela ligação ao cap 7-metilguanina (m<sup>7</sup>G) do mRNA-alvo. O domínio PIWI apresenta a atividade catalítica de AGO, mostrando os resíduos da tríade catalítica Asp-Asp-His/Asp (DDH/D), sendo D (ácido aspártico) e H (histidina).

As proteínas Piwi que se ligam ao RNA (RNA-binding proteins) são altamente conservadas entre os diferentes grupos de organismos. Na literatura, vários autores consideram que todas as proteínas que apresentam o domínio PIWI devem ser definidas como proteínas PIWI, enquanto outros diferenciam esse grupo entre Argonautas, que possuem o domínio piwi, e proteínas estritamente PIWI, ou seja, devem ser consideradas como PIWI somente aquelas proteínas restritas à linhagem germinativa e que desempenham o papel de silenciamento de elementos móveis, impedindo a ocorrência de variações somáticas epigenéticas nas células que originam os gametas masculino e feminino.

Em leveduras e plantas, que não apresentam proteínas da subfamília Piwi, uma estratégia evolutiva diferente possibilitou a adaptação desses organismos para executarem mecanismo de silenciamento gênico envolvendo sRNAs. Nesses casos, o silenciamento gênico é operado inteiramente por várias proteínas da subclasse Argonauta (Bohmert et al., 1998; Carmell et al., 2002; Llave et al., 2002; Hutvagner; Simard, 2008; Peters; Meister, 2007).

Vários estudos demonstraram que as proteínas da subfamília PIWI, mas não as proteínas AGO, apresentam metilação no resíduo arginina e que ela é feita pela metiltransferase 5 (dPRMT5, PRMT5-mediated arginine methylation), conhecida também como “Capsuleen/Dart5”, gerando argininas simetricamente dimetiladas (sDMAs) na região N-terminal de PIWI (Kirino et al., 2009; Reuter et al., 2009; Vagin et al., 2009). As argininas dimetiladas de PIWI funcionam como motivos de ligação para TDRDs e desempenham papel crucial para o funcionamento de PIWI. Contudo, em plantas foi observado que algumas proteínas AGO (AGO2, AGO3, e AGO1 de *Arabidopsis*) apresentam um grande número de repetições RG/GR, que possibilitam a atividade de metilação pela PRMT5 e a subsequente ligação de AGO às proteínas Tudor (Zaratiegui et al., 2007; Hu et al., 2019). Recentemente, em *Arabidopsis* foram identificados dois genes *piwi*-like imprescindíveis para a manutenção das células meristemáticas (Rojas-Ríos; Simonelig, 2018). Em plantas, a proteína AGO1 está claramente envolvida na degradação de RNA mediada por miRNA e desempenha papel central na morfogênese e sua atividade é regulada por miRNA. Em algumas espécies ela é fundamental para o silenciamento epigenético. A proteína AGO4 não está envolvida na degradação de RNA mediada por RNAi, mas participa da metilação de DNA e outras formas de regulação epigenética da via que envolve smRNA (small RNA). Em *A. thaliana* também ficou demonstrado que AGO4, guiada por siRNAs heterocromáticos, está envolvida no silenciamento de repetições invertidas distribuídas ao longo do genoma por meio de metilação do DNA. Assim, siRNAs heterocromáticos se ligam a AGO4 e em seguida esse complexo associa-se com H3K9-Me promovendo a metilação do DNA, silenciando regiões repetitivas no genoma (Heilersig et al., 2006b). Outras proteínas da família AGO, tais como AGO7 e AGO10 atuam em diferentes etapas dos processos de desenvolvimento de plantas. Contudo, a proteína AGO7 não participa do silenciamento gênico de transgenes (Meins et al., 2005).

## Complexo Indutor do Silenciamento Gênico (RISC)

RISC (RNA inducing silencing complex) é um complexo multiproteico de aproximadamente 500 kDa formado por proteínas e uma das cadeias de RNA interferente (siRNA) ou microRNA. Contudo, a estrutura completa de RISC ainda não foi completamente resolvida. Diferentes estudos relatam variações no tamanho e no número de componentes de RISC e isso pode ser atribuído à existência de diferentes tipos de complexo RISC ou decorrente das diferentes fontes e técnicas empregadas para o isolamento de RISC (Hu et al., 2018). Sabe-se que o componente ativo de RISC são endonucleases denominadas por ARGONAUTAS (AGO) que utilizam siRNA ou microRNA como



molde para reconhecimento do RNA-alvo e promover a sua clivagem e degradação. O complexo RISC também apresenta atividade RNA helicase responsável por desfazer as hélices de RNAs dupla fita. AGO incorpora o dsRNA no complexo RISC em uma reação dependente de ATP e chaperones moleculares (HSP70 e HSP90) (Earley; Poethig, 2011). E, em seu interior, os dsRNA (siRNA ou miRNA) de dupla fita gerados por Dicer são desenrolados e apenas uma das cadeias é utilizada como molde para encontrar a fita de RNA-alvo que será degradado. Após o pareamento de siRNA com a sequência complementar do RNA, a atividade de RNase de RISC é ativada e o RNA-alvo é clivado. Esse processo é importante para a regulação gênica mediada por microRNAs e para a defesa contra infecções virais, os quais utilizam RNA dupla fita como vetor infectivo.

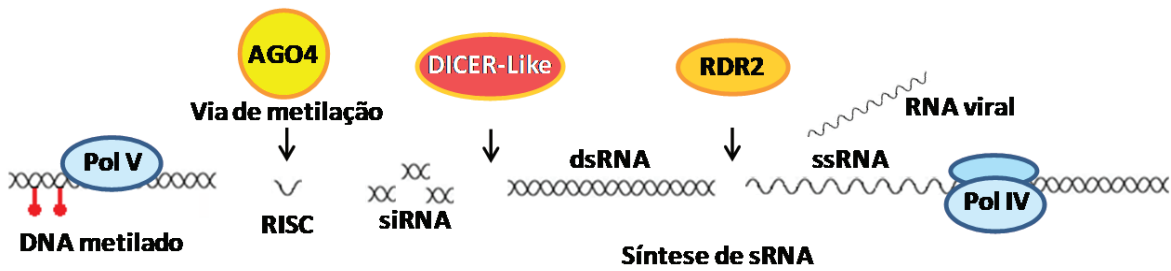
Em plantas, a proteína HLY1 (HYPONASTIC LEAVES 1) que se liga a RNA dupla fita é importante para selecionar uma das cadeias de dsRNA que será usada como molde para o silenciamento gênico (Vazquez et al., 2004; Eamens et al., 2009). Além de HLY1, a proteína dedo de zinco C2H2 (Zinc finger, SERRATE, SE) é necessária para regulação gênica e desenvolvimento normal do caule (Lobbes et al., 2006; Jia et al., 2017). Em animais existem evidências de que a fita do dsRNA usada como guia é sempre aquela que apresenta a menor estabilidade termodinâmica no penúltimo e antipenúltimo nucleotídeos na extremidade 5' (Prigge; Wagner, 2001; Matranga et al., 2005; Rand et al., 2004). Lisowiec-Wąchnicka et al. (2019) encontraram que ambas as fitas do dsRNA são usadas como antisenso e que a presença de um nucleotídeo modificado em uma das cadeias determinava a escolha de apenas uma das fitas do dsRNA como guia para o silenciamento gênico.

Todos os RNA virais formam dsRNA em uma das etapas de replicação e o reconhecimento dessas moléculas pelo sistema silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) da planta é essencial para impedir a multiplicação viral. siRNAs resultantes da degradação do dsRNA viral são usados para endereçar novas partículas virais e por isso o processo também é reconhecido como sistema de silenciamento em *cis* (Robalino et al., 2005; Sasaki et al., 2005; Escobar; Dandekar, 2013; Weinheimer et al., 2015).

## Descrição de RdDM em Plantas

O fenômeno RdDM foi descrito inicialmente em plantas por Wassenegger et al. (1994) que observaram que o cDNA do potato spindle tuber viroid (PSTVd) introduzido em tabaco foi metilado após a integração no genoma e que a região flanqueadora do T-DNA e o DNA genômico da planta permaneceram desmetiladas. Atualmente é conhecido que durante o processo de metilação, moléculas de RNA dupla fita (dsRNAs) são processadas, gerando pequenos nucleotídeos de RNA interferentes (siRNAs), cujos tamanhos variam entre 21 e 25 nucleotídeos e esses siRNA guiam a metilação de *locis* homólogos. Em plantas, dsRNAs podem ser gerados em quatro situações distintas: presença de produtos intermediários da replicação viral; produtos endógenos de RNA gerados pela RNA polimerase; transcritos de repetições invertidas; e elementos transponíveis (Zhang et al., 2007; Bender, 2012; Dalakouras; Wassenegger, 2013).

Além das moléculas de siRNA, existe grande número de proteínas envolvidas no processo de RdDM, tais como Argonautas, DNA metiltransferases (DNMTs), complexos proteicos de remodelagem de cromatina, e as enzimas Polimerase IV e Polimerase II e V. Esse complexo proteico atua nas diferentes fases do processo de metilação do DNA por meio da adição de um grupo metil na posição 5' da citosina. Em plantas, diferente do que ocorre nos animais, todas as sequências (CG, CHG, CHH) podem ser metiladas (Law et al., 2010; Haag; Pikaard, 2011). As proteínas da via RdDM atuam em uma ordem hierárquica (Pol IV, RDR2, DCL3, AGO4, Pol V), alterações em qualquer uma dessas etapas inviabilizam o silenciamento gênico (Pontes et al., 2006) (Figura 7).



**Figura 7. Esquema das etapas do silenciamento gênico transcricional.** O processo inicia-se com um RNA endógeno (transposons, repetições invertidas) ou exógeno (RNA viral) de cadeia simples. Em seguida, ocorre a duplicação da fita, originando o dsRNA que é clivado por DICER, formando pequenos dsRNA de aproximadamente 21 nucleotídeos.

Em plantas, o sistema AGO/RISC seleciona a fita complementar que será recrutada pelo RNA nascente não codante, sintetizado pela Pol V. Após o pareamento RNA nascente/siRNA outras enzimas (não representadas) metilam o DNA-alvo em uma reação conhecida como “processo de metilação do DNA acoplado à transcrição gênica. Na planta modelo *Arabidopsis*, a polimerase IV interage com a RNA polimerase RNA-dependente (RDR2) e essa atividade conjunta da Pol IV-RDR2 origina dsRNAs que em seguida são reduzidos a 24nt (siRNAs) pela enzima DICER, DCL3 (Herr et al., 2005; Haag et al., 2012). Diferentemente em milho, Pol IV/Pol V associam-se com MOP1, RMR1, AGO121, Zm\_DRD1/CHR127, SHH2a, e SHH2b gerando paramutações (Haag et al., 2014).

Nos vegetais, a via RdDM pode levar ao silenciamento transcricional de transposons e regiões repetidas endógenas (Köllén et al., 2015). Nessa rota ocorre a geração de RNAs pequenos e longos que são sintetizados por duas RNA polymerases (RNAPs): RNAPIV and RNAPV (Onodera et al., 2005; Ream et al., 2009; Haag; Pikaard, 2011). RNAPIV produz precursors de siRNAs de 24-nt que se ligam a ARGONAUTE4 (AGO4) e interage com os RNAs não codantes transcritos pela RNAPV. Isso resulta na metilação *de novo* do DNA no locus homólogo. Em seguida, os ativadores pós-traducionais de histonas que estão ligados a elas são removidos e substituídos por novos marcadores repressivos levando à modificação do DNA do estado de eucromatina para heterocromatina inacessível à transcrição (Wyrick et al., 1999; Köllén et al., 2015; Hesson et al., 2014).

A metilação de DNA dependente de RNA (RdDM) em plantas é direcionada por pequenos RNAs interferentes (siRNAs) que iniciam as reações que levam à metilação de regiões promotoras homólogas às suas sequências. Esse processo ocorre em três fases distintas: síntese de siRNAs, produção do arcabouço de RNA (scaffold) e reconhecimento e ligação do siRNA no complexo Argonauta (AGO/RDM2/KTF1/SPT5L/SPT4) que direciona a metil transferase RDM2 (Domain Rearranged Methyl Transferase 2) ao sítio de metilação do DNA (Zhang; Zhu, 2011, 2012). Tanto Pol IV quanto Pol II podem gerar RNA arcabouço no processo de metilação de DNA dependente de RNA. No entanto, a grande subunidade de Pol IV (NRPE1, Nuclear RNA Polymerase E1) parece ter maior participação nesse processo. Pol II geraria arcabouços de RNA em regiões intergênicas com poucas sequências repetitivas (Zheng et al., 2009). De qualquer modo, parece evidente que o processo final de metilação do DNA dependente de RNA envolve a ação de Pol II, Pol IV e Pol V de modo cooperativo para a síntese do arcabouço de RNA. A atividade de Pol II e Pol V é dependente de DRD1 (Defective in RNA-directed DNA methylation 1), o *hinge domain* da proteína DMS3 (Defective meristem silencing3) e RDM1 (Kanno et al., 2004; Zheng et al., 2009; You et al., 2013; Zhou; Law, 2015; Wendte et al., 2019).

Além das RNA polimerases I, II e III dependentes de DNA, responsáveis pela transcrição de RNA mensageiros (mRNA) e RNA transportadores (tRNA), as plantas têm duas outras RNA polimerases (Pol IV e Pol V), que transcrevem RNAs não codantes e, portanto, estão envolvidas no silenciamento transcricional, através da rota de metilação de DNA dependente de RNA (RdDM) (Zhou; Law, 2015). A Pol IV produz um RNA usando como molde sequências repetitivas, transposons contendo histonas ou DNA metilados. Em seguida, os transcritos produzidos pela Pol IV são utilizados pela RNA polimerase dependente de RNA (RDR2) para a síntese de dupla fita de RNA (dsRNA). Em plantas, o dsRNA é clivado pelo complexo de endonucleases DICER-like/DCL3 originando os pequenos siRNAs de 24 nucleotídeos (Figura 2). Em *Arabidopsis*, várias evidências indicaram que sítios de ligação de Pol II e Pol V são muito próximos um do outro (Wierzbicki *et al.*, 2012). Assim, é razoável supor que na ausência da Pol V, Pol II possa se posicionar nesses sítios e compensar a ausência de Pol V (Sloan *et al.*, 2014).

## Aplicações do Silenciamento Gênico

RdDM (RNA-dependent DNA methylation) é um mecanismo epigenético conservado entre os organismos cujas funções podem ser assim relacionadas: bloquear a invasão dos genomas por sequências estranhas (vírus), inibir a expressão de elementos móveis, degradar transcritos aberrantes de genes e transgenes e promover regulação da expressão de genes. As regiões do genoma apresentando transposons ou sequências gênicas dispersas são as mais sujeitas a metilação (Pattanayak *et al.*, 2013). A metilação do DNA regula a transcrição gênica, principalmente na região promotora do gene pelo bloqueio de sítios de ligação dos fatores de transcrição.

A metilação do DNA usada como uma técnica de controle da expressão gênica tem sido empregada em diversas espécies de plantas para estudos de função gênica e para o melhoramento de espécies agrônomicas (Sasaki *et al.*, 2005; Eamens *et al.*, 2008). Essa técnica apresenta a vantagem de não manipular a sequência gênica diretamente (Eamens *et al.*, 2008). A alteração que resulta em silenciamento do gene-alvo é decorrente da metilação de bases ou histonas na região do promotor do gene de interesse (Tariq; Paszkowski, 2004). Dessa forma, sequências homólogas ao promotor do gene-alvo são introduzidas nas células usando alguma metodologia de transformação disponível, por exemplo, eletroporação ou bombardeamento. Essas sequências originam fitas duplas de RNA (dsRNA) que após processamento irão induzir a metilação de citosinas no DNA da região promotora do gene-alvo, silenciando a sua expressão (Souza *et al.*, 2007; Alba *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2016). Essas regiões metiladas são herdadas na progênie (herança epigenética), com a consequente manutenção da característica ligada ao gene silenciado. Como a sequência que foi introduzida na célula não é incorporada ao genoma, essa técnica permite produzir plantas que não contêm DNA exógeno, portanto, sem alteração no genoma, somente com o gene-alvo silenciado (Filipowicz; Paszkowski, 2001; Guo *et al.*, 2016).

A regulação negativa da expressão de um gene (knockout) simplifica a análise da sua função. Portanto, constitui uma ferramenta poderosa para análise de genes candidatos gerados pelo sequenciamento genômico e cujas funções sejam desconhecidas (Kasai; Kanazawa, 2012; Guidarelli; Baraldi, 2015; Dana *et al.*, 2017). Seu uso é mais simples do que o emprego de oligonucleotídeos. O siRNA é mais sensível e efetivo, apresenta menor custo, alta especificidade e pode ser marcado pelo uso de vetor. Com essa tecnologia, vários experimentos podem ser feitos simultaneamente em qualquer tipo celular de interesse para bloquear a expressão de genes indesejáveis, ou para induzir a resistência de plantas a vírus (Takahashi *et al.*, 2018).



A técnica de manipulação gênica por metilação de DNA dependente de RNA objetiva a expressão de dsRNA em plantas geneticamente modificadas (GM) para induzir o silenciamento de alvos endógenos (promotores) ou exógenos (transgenes e vírus) (Pyott; Molnar, 2015). Em função do grau de especificidade, durabilidade dos efeitos e da ausência de efeitos secundários, a técnica tem grande potencial para o controle de patógenos e pragas, tanto induzindo genes associados a tolerância quanto inibindo genes de suscetibilidade. O silenciamento gênico no hospedeiro, induzido por patógenos (HIGS, host-induced gene silencing) é uma tecnologia que tem sido usada no controle de nematoides e viroses de plantas (Wang et al., 2000; Chitwood, 2003; Fairbairn et al., 2007; Nowara et al., 2010; Lam et al., 2015).

Na área da horticultura, o uso de RdDM tem sido empregado no silenciamento de genes envolvidos em processos metabólicos visando a redução de amilose em grãos de amido de batata (Heilersig et al., 2006a; Kasai; Kanazawa, 2012; Kasai et al., 2016), aumento da resistência a doenças e pragas, arquitetura das plantas tempo de florescimento e cor das flores da petunia, melhoramento da qualidade nutricional, remoção de compostos tóxicos e alergênicos, entre outros (Kapoor et al., 2002; Guo et al., 2016; Tirnaz; Batley, 2019). Potencialmente, RdDM pode ser aplicado na produção de frutos sem sementes, redução de enzimas de degradação de frutos, inibição de produção de compostos tóxicos, melhoria de qualidade nutricional, na expressão de genes de resistência ou suscetibilidade a pragas, indução de resistência a vírus e bactérias e fungos, ou na tolerância a estresses abióticos (Tirnaz; Batley, 2019). Contudo, a manipulação dos siRNAs para o melhoramento de cereais ainda é pouco explorada. Isso provavelmente decorre da complexidade envolvida na manipulação dessas moléculas e de seus genes codificantes, a curta duração dos RNAi e a dificuldade de transformação de várias espécies (Lusser et al., 2011).

Embora a introdução do dsRNA na célula possa ser feita por métodos usuais de transformação genética ou transfecção, o organismo resultante não será necessariamente geneticamente modificado, mas produzirá dsRNA para desencadear o processo que conduzirá ao silenciamento do gene-alvo pela metilação de seu promotor. Mesmo que o vetor ou genes de seleção sejam inseridos no evento inicial de transformação, o efeito principal será no silenciamento, por metilação das citosinas nas sequências do promotor do gene-alvo. A metilação será herdada na progênie e os genes estranhos (vetor, gene de seleção) poderão ser segregados nas gerações seguintes (Martienssen; Colot, 2001; Holliday; Ho, 2002; Illum et al., 2018; Pang et al., 2019).

O método mais eficiente para introdução da sequência-alvo nas células consiste em apresentá-la na forma de sequência invertida repetida (IR). Os promotores de transgenes são metilados com maior eficiência que promotores endógenos. Tanto promotores constitutivos como promotores órgãos ou tecido específicos são igualmente eficientes na indução de silenciamento por metilação de promotores dos genes-alvo (Kawasaki; Taira, 2004; Kon; Yoshikawa, 2014; Wang et al., 2015; Kang et al., 2019).

Por ser um processo geral de regulação da transcrição gênica no organismo, a metilação de DNA dependente de RNA pode ser revertida ao longo nas gerações seguintes, caso o estímulo da apresentação do dsRNA seja interrompido (Bird, 2002; Tompkins et al., 2012; Pikaard; Scheid, 2014; Alonso et al., 2019). Desse modo, não é possível garantir a estabilidade do processo para ser utilizado no melhoramento. Além disso, a molécula pode se mover sistemicamente na planta. A metilação pode persistir nas células por pouco tempo (transiente) ou pode ser herdada por algumas gerações. Somente se a expressão do dsRNA exógeno for permanente, detectável e herdável, o organismo pode ser considerado geneticamente modificado (Pikaard; Scheid, 2014). Embora seja possível com tecnologia de sequenciamento detectar metilação do DNA, não é possível diferenciá-

la da metilação natural (Yu et al., 2011; Gao et al., 2014; Rigal et al., 2016; Qiu et al., 2017; Feng et al., 2019).

De acordo com Saurabh et al. (2014), a técnica de RNAi representa maior potencial do que o simples uso de sequência anti-sense, seja na inibição da transcrição (TGS ou RdMD) ou no silenciamento pós-transcricional (PTGS), em função de sua mais alta eficiência, estabilidade, flexibilidade, precisão e desempenho (high-throughput). RNAi tem sido empregado no melhoramento para alterar qualidades nutricionais, reduzir compostos tóxicos e alergênicos, para aumentar a defesa contra fatores bióticos e abióticos, aumentar ou reduzir síntese de metabolismo secundários e até mesmo para inibir a formação de sementes pelas plantas (Tang; Galili, 2004; Tang et al., 2007; Angaji et al., 2010; Carneiro; Carneiro, 2011; Younis et al., 2014; Yogindran; Rajam, 2015; Pathak; Gogoi, 2016). A utilização dessa técnica na geração de organismos geneticamente modificados implica a execução das seguintes etapas essenciais, que foram compiladas de vários estudos, entre eles: Hannon (2003), Carneiro e Carneiro (2011), Guo et al. (2016), McLoughlin et al. (2018), entre outros:

**Etapa 1:** Identificação do gene-alvo e suas vias relacionadas. Para tanto é essencial ter informações sobre o genoma do organismo, aplicar ferramentas de bioinformática, analisar transcriptoma, proteoma e metaboloma. Essas informações integradas permitem decidir com maior segurança a natureza do gene-alvo que se deseja silenciar.

**Etapa 2:** Desenvolvimento do vetor para inserção da construção do RNAi e seleção dos recombinantes usando o próprio RNAi. Nessa fase é importante a adequada seleção do vetor, do promotor e dos marcadores de seleção.

**Etapa 3:** Transformação e seleção da planta. Essa etapa é crítica. O método mais adequado de transformação é a cultura de tecidos. Em seguida procede-se à seleção das plantas transformadas.

**Etapa 4:** Avaliação das linhagens geneticamente modificadas, seja com marcadores fenotípicos (morfologia, marcadores bioquímicos) ou genotípicos (transcriptoma).

## Alterações introduzidas no genoma

A supressão da transcrição de um gene por metilação do DNA do seu promotor não introduz nenhuma alteração de sequência no genoma (Fakhr et al., 2013). O processo de metilação insere-se no mecanismo geral de silenciamento gênico induzido por pequenas moléculas interferentes de RNAs (iRNAs) (Scherr et al., 2003; Cigan et al., 2005; Guo et al., 2019). A introdução da sequência-alvo a ser silenciada pode ser feita por transfecção ou transformação genética levando à produção de dsRNA que iniciará o processo via Dicer-like até a metilação do DNA pelas enzimas metil transferases, complexo RISC e enzimas modificadoras de histonas e DNA (March; Bentley, 2007; Tang et al., 2007). Esse mecanismo epigenético é relativamente estável, podendo ser herdado pelas gerações seguintes. Parte do sistema inicial de transformação (vetores, genes de seleção ou outras sequências) será segregada na F2, de modo que esses descendentes, mesmo mantendo as alterações por causa das metilações, não poderão ser considerados como plantas geneticamente modificadas (Kapusi et al., 2013; Yau; Stewart, 2013).

## Detecção e identificação do evento

A metilação resultante no processo de modificação do DNA dependente de RNA é um processo natural e não pode ser detectado ou identificado por técnicas usuais, como PCR, detecção de proteínas ou de metabólitos. Sem o conhecimento prévio da sequência do gene-alvo é praticamente

impossível detectar as modificações induzidas por RdDM empregando as técnicas moleculares e bioquímicas atuais. Espera-se que o uso de técnicas de sequenciamento de epigenomas, tal como a MethylC-Seq, venham a comprovar o fenômeno de metilação que ocorre durante o silenciamento gênico (Schmitz; Zhang, 2011).

No caso de o evento ser previamente identificado é possível utilizar a técnica de RT-qPCR para avaliar o nível de expressão dos transcritos do gene-alvo. De acordo com Zhang et al. (2014), a metilação no DNA pode ser demonstrada através de Chop-PCR que utiliza a digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis a metilação, seguido de PCR. Nesse caso, a sequência-alvo deve ser previamente conhecida (Zhang et al., 2014; Dasgupta; Chaudhuri, 2019).

## Conclusões

O mecanismo de silenciamento epigenético é um fenômeno biológico universal.

Vimos nesse documento que, embora grande parte das etapas envolvidas no silenciamento gênico via metilação do DNA dependente de RNA tenha sido demonstrada, alguns passos ainda não foram completamente esclarecidos.

Apesar do importante papel dos RNAs pequenos no silenciamento gênico, o seu emprego como rotina no melhoramento de plantas ainda é restrito a algumas espécies, em razão das dificuldades para estabelecer protocolos de transformação e/ou regeneração em várias espécies agrícolas importantes.

## Referências

- ADENOT, X.; ELMAYAN, T.; LAURESSERGUES, D.; BOUTET, S.; BOUCHE, N.; GASCIOL, L. I. V.; VAUCHERET, H. DRB4-dependent *TAS3* trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. **Current Biology**, v. 16, n. 9, p. 927-932, 2006.
- AKAY, A.; DOMENICO, T.; SUEN, K. M.; NABIH, A.; PARADA, G. E.; LARANCE, M.; MEDHI, R.; BERKYUREK, A. C.; ZHANG, X.; WEDELES, C. J.; RUDOLPH, K. L. M.; ENGELHARDT, J.; HEMBERG, M.; MA, P.; LAMOND, A. I.; CLAYCOMB, J. M.; MISKA, E. A. The helicase Aquarius/EMB-4 is required to overcome intronic barriers to allow nuclear RNAi pathways to heritably silence transcription. **Developmental Cell**, v. 42, n. 3, p. 241-255, 2017.
- ALBA, A. E. M.; ELVIRA-MATELOT, E.; VAUCHERET, H. Gene silencing in plants: a diversity of pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, n. 12, p. 1300-1308, 2013.
- ALONSO, C.; RAMOS-CRUZ, D.; BECKER, C. The role of plant epigenetics in biotic interactions. **New Phytologist**, v. 221, n. 2, p. 731-737, 2019.
- AMBROS, V.; CHEN, X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. **Development**, v. 134, n. 9, p. 1635-1641, 2007.
- ANGAJI, S. A.; HEDAYATI, S. S.; HOSEIN, R.; SAMAD, S.; SHIRAVI, S.; MADAN, S. Application of RNA interference in plants. **Plant Omics**, v. 3, n. 3, p. 77-84, 2010.
- ARCHACKI, R.; YATUSEVICH, R.; BUSZEWICZ, D.; KRZYCZMONIK, K.; PATRYN, J.; IWANICKA-NOWICKA, R.; BIECEK, P.; WILCZYNSKI, B.; KOBLOWSKA, M.; JERZMANOWSKI, A.;

- SWIEZEWSKI, S. Arabidopsis SWI/SNF chromatin remodeling complex binds both promoters and terminators to regulate gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 6, p. 3116-3129, 2017.
- AUSIN, I.; MOCKLER, T. C.; CHORY, J.; JACOBSEN, S. E. IDN1 and IDN2 are required for de novo DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 12, p. 1325-1327, 2009.
- BAJCZYK, M.; BHAT, S. S.; SZEWC, L.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z.; JARMOLOWSKI, A.; DOLATA, J. Novel nuclear functions of Arabidopsis ARGONAUTE1: beyond RNA interference. **Plant Physiology**, v. 179, n. 3, p. 1030-1039, 2019.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.
- BARSKI, A.; CUDDAPAH, S.; CUI, K.; ROH, T. Y.; SCHONES, D. E.; WANG, Z.; WEI, G.; CHEPELEV, I.; ZHAO, K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 823-837, 2007.
- BENDER, J. RNA-directed DNA methylation: getting a grip on mechanism. Current Biology*, v. 22, n. 10, article R400-1, 2012.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.
- BLACK, J. C.; VAN RECHEM, C.; WHETSTINE, J. R. *Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. Molecular Cell*, v. 48, n. 4, p. 491-507, 2012.
- BÖHMDORFER, G.; ROWLEY, M. J.; KUCIŃSKI, J.; ZHU, Y.; AMIES, I.; WIERZBICKI, A. T. RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA. **Plant Journal**, v. 79, n. 2, p. 181-191, 2014.
- BOHMERT, K.; CAMUS, I.; BELLINI, C.; BOUCHEZ, D.; CABOCHE, M.; BENNING, C. AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. **EMBO Journal**, v. 17, n. 1, p. 170-180, 1998.
- BOLOGNA, N. G.; VOINNET, O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 473-503, 2014.
- BRANT, E. J.; BUDAK, H. Plant small non-coding RNAs and their roles in biotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, article 1038, 2018.
- BROCKLEHURST, S.; WATSON, M.; CARR, I. M.; OUT, S.; HEIDMANN, I.; MEYER, P. Induction of epigenetic variation in Arabidopsis by over-expression of DNA methyltransferase1 (MET1). **PLoS One**, v. 13, n. 2, e0192170, 2018.
- CAO, X.; AUFSATZ, W.; ZILBERMAN, D.; METTE, M. F.; HUANG, M. Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation. **Current Biology**, v. 13, n. 24, p. 2212-2217, 2003.
- CARMELL, M. A.; XUAN, Z.; ZHANG, M. Q.; HANNON, G. J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 16, n. 21, p. 2733-2742, 2002.

CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Maize transformation to obtain plants tolerant to viruses by RNAi technology. In: ÁLVAREZ, M. (Ed.). **Genetic transformation**. Rijeka: InTech, 2011. cap. 8, p. 151-170.

CHEN, M.; SHAOLEI, L. V.; MENG, Y. Epigenetic performers in plants. **Development, Growth & Differentiation**, v. 52, n. 6, p. 555-566, 2010.

CHEN, P. Y.; WEINMANN, L.; GAIDATZIS, D.; PEI, Y.; ZAVOLAN, M.; TUSCHL, T.; MEISTER, G. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. **RNA**, v. 14, n. 2, p. 263-274, 2008.

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service. **Pest Management Science**, v 59, n. 6/7, p. 748-753, 2003.

CIGAN, A. M.; UNGER-WALLACE, E.; HAUG-COLLET, K. Transcriptional gene silencing as a tool for uncovering gene function in maize. **Plant Journal**, v. 43, n. 6, p. 929-940, 2005.

COX, D. N.; CHAO, A.; BAKER, J.; CHANG, L.; QIAO, D.; LIN, H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi is essential for stem cell self-renewal. **Genes & Development**, v. 12, n. 23, p. 3715-3727, 1998.

DALAKOURAS, A.; WASSENEGGER, M. Revisiting RNA-directed DNA methylation. **RNA Biology**, v. 10, n. 3, p. 453-455, 2013.

DANA, H.; CHALBATANI, G. M.; MAHMOODZADEH, H.; KARIMLOO, R.; REZAIEAN, O.; MORADZADEH, A.; MEHMANDOOST, N.; MOAZZEN, F.; MAZRAEH, A.; MARMARI, V.; EBRAHIMI, M.; RASHNO, M. M.; ABADI, S. J.; GHARAGOUZLO, E. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. **International Journal of Biomedical Science**, v 13, n. 2, p. 48-57, 2017.

DASGUPTA, P.; CHAUDHURI, S. Analysis of DNA methylation profile in plants by Chop-PCR. **Methods in Molecular Biology**, v. 1991, p. 79-90, 2019.

DECRISTOFARO, M. F.; BETZ, B. L.; RORIE, C. J.; REISMAN, D. N.; WANG, W.; WEISSMAN, B. E. Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies". **Journal of Cellular Physiology**, v. 186, n. 1, p. 136-145, 2001.

DENG, S.; IN-CHEOLM J.; LINLIN, S.; JUN, X.; NAM-HAI, C. JMJ24 targets chromomethylase3 for proteasomal degradation in Arabidopsis. **Genes & Development**, v. 30, n. 3, p. 251-256, 2016.

DODGE, J. E.; KANG, Y. K.; BEPPU, H.; LEI, H.; LI, E. Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. **Molecular and Cell Biology**, v. 24, n. 6, p. 2478-2486, 2004.

DOKMANOVIC, M.; CLARKE, C.; MARKS, P. A. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. **Molecular Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 981-989, 2007.

DÜRR, J.; LOLAS, I. B.; SØRENSEN, B. B.; SCHUBERT, V.; HOUBEN, A.; MELZER, M.; DEUTZMANN, R.; GRASSER, M.; GRASSER, K. D. The transcript elongation factor SPT4/SPT5 is involved in auxin-related gene expression in Arabidopsis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 7, p. 4332-4347, 2014.

EAMENS, A. L.; SMITH, N. A.; CURTIN, S. J.; WANG, M. B.; WATERHOUSE, P. M. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2219-2235, 2009.



- EAMENS, A.; WANG, M. B.; SMITH, N. A.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 456-468, 2008.
- EARLEY, W.; POETHIG, R. S. Binding of the cyclophilin 40 ortholog SQUINT to Hsp90 protein is required for SQUINT function in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38184-38189, 2011.
- EL-SHAMI, M.; PONTIER, D.; LAHMY, S.; BRAUN, L.; PICART, C.; VEGA, D.; HAKIMI, M. A.; JACOBSEN, S. E.; COOKE, R.; LAGRANGE, T. Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. **Genes & Development**, v. 21, n. 20, p. 2539-2544, 2007.
- ESCOBAR, M. A.; DANDEKAR, A. M. Post-transcriptional gene silencing in plants. In: MADAME Curie Bioscience Database [Internet]. Austin: Landes Bioscience, 2013. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6037/>>. Acesso em: 13 set. 2019.
- FAIRBAIRN, D. J.; CAVALLORO, A. S.; BERNARD, M.; MAHALINGA-IYER, J.; GRAHAM, M. W.; BOTELLA, J. R. Host-delivered RNAi: an effective strategy to silence genes in plant parasite nematodes. **Planta**, v. 226, n. 6, p. 1525-1533, 2007.
- FAKHR, M. G.; HAGH, M. F.; SHANEHBANDI, D.; BARADARAN, B. DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in Cancer. **Genetics Research International**, v. 2013, article 317569, 2013.
- FANG, X.; QI, Y. RNAi in plants: an Argonaute-centered view. **Plant Cell**, v. 28, n. 2, p. 272-285, 2016.
- FATICA, A.; BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. **Nature Reviews. Genetics**, v. 15, n. 1, p. 7-21, 2014.
- FENG, Q.; QIN, L.; WANG, M.; WANG, P. Signal-on electrochemical detection of DNA methylation based on the target-induced conformational change of a DNA probe and exonuclease III-assisted target recycling. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 149, n. 1, article 111847, 2019.
- FELSENFELD, G. A brief history of epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 1, a018200, 2014.
- FILIPOWICZ, W.; PASZKOWSKI, J. Gene silencing. In: ENCYCLOPEDIA of genetics. London: Academic Press, 2001. p. 813-814.
- FINNEGAN, E. J.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 16, p. 8449-8454, 1996.
- FLYNN, R. L.; ZOU, L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. **Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 45, n. 4, p. 266-275, 2010.
- FUKUDOME, A.; FUKUHARA, T. Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. **Journal of Plant Research**, v. 130, n. 1, p. 33-44, 2017.
- FULTZ, D.; CHOUDURY, S. G.; SLOTKIN, R. K. Silencing of active transposable elements in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 27, p. 67-76, 2015.

GAO, W.; LI, S.; LI, Z.; HUANG, Y.; DENG, C.; LU, L. Detection of genome DNA methylation change in spinach induced by 5-azaC. **Molecular and Cellular Probes**, v. 28, n. 4, p. 163-166, 2014.

GREER, E. L.; SHI, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 5, p. 343-357, 2012.

GROSS, L. Transposon silencing keeps jumping genes in their place. **PLoS Biology**, v. 4, n. 10, e353, 2006.

GUERRERO-BOSAGNA, C. DNA methylation. **Materials and Methods**, v. 3, n. 206, 2013. Disponível em: <<https://www.labome.com/method/DNA-Methylation.html>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

GUIDARELLI, M.; BARALDI, E. Transient transformation meets gene function discovery: the strawberry fruit case. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 444, 2015.

GUO, Q.; LIU, Q.; SMITH, N. A.; LIANG, G.; WANG, M. B. RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. **Current Genomics**, v. 17, n. 6, p. 476-489, 2016.

GUO, X. Y.; LI, Y.; FAN, J.; XIONG, H.; XU, F. X.; SHI, J.; SHI, Y.; ZHAO, J. Q.; WANG, Y. F.; CAO, X. L.; WANG, W. M. Host-induced gene silencing of MoAP1 confers broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 2027, 2019.

HAAG, J. R.; BROWER-TOLAND, B.; KRIEGER, E. K.; SIDORENKO, L.; NICORA, C. D.; NORBECK, A. D.; IRSIGLER, A.; LARUE, H.; BRZESKI, J.; MCGINNIS, K.; IVASHUTA, S.; PASA-TOLIC, L.; CHANDLER, V. L.; PIKAARD, C. S. Functional diversification of maize RNA PolymeraseIV and V subtypes via alternative catalytic subunits. **Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 378-390, 2014.

HAAG, J. R.; REAM, T. S.; MARASCO, M.; NICORA, C. D.; NORBECK, A. D.; PASA-TOLIC, L.; PIKAARD, C. S. In vitro transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing. **Molecular Cell**, v. 48, n. 5, p. 811-818, 2012.

HAAG, J. R.; PIKAARD, C. S. Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 8, p. 483-492, 2011.

HALIC, M.; MOAZED, D. Transposon silencing by piRNAs. **Cell**, v. 138, n. 6, p. 1058-1060, 2009.

HAMILTON, A.; VOINNET, O.; CHAPPELL, L.; BAULCOMBE, D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. **EMBO Journal**, v. 21, n. 17, p. 4671-4679, 2002.

HAMMOND, S. M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5822-5829, 2005.

HAN, M. H.; GOUD, S.; SONG, L.; FEDOROFF, N. The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 4, p. 1093-1098, 2004.

HENNIG, L.; DERKACHEVA, M. Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? **Trends in Genetics**, v. 25, n. 9, p. 414-423, 2009.

HANNON, G. J. (Ed.). **RNAi: a guide to gene silencing**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

HE, X.; DUAN, C.; CHEN, J.; OU-YANG, X.; ZHANG, Z.; LI, C.; PENG, H. Let-7a elevates p21(WAF1) levels by targeting of NIRF and suppresses the growth of A549 lung cancer cells. **FEBS Letters**, v. 583, n. 21, p. 3501-3507, 2009.

HE, X. J.; MA, Z. Y.; LIU, Z. W. Non-coding RNA transcription and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. **Molecular Plant**, v. 7, n. 9, p. 1406-1414, 2014.

HEILERSIG, H. J. B.; LOONEN, A.; JANSSEN, E. M.; WOLTERS, A. M. A.; VISSER, R. G. F. Efficiency of transcriptional gene silencing of GBSSI in potato depends on the promoter region that is used in an inverted repeat. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, n. 5, p. 437-449, 2006a.

HEILERSIG, H. J. B.; LOONEN, A.; BERGERVOET, M.; WOLTERS, A. M. A.; VISSER, R. G. F. Post-transcriptional gene silencing in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. **Plant Molecular Biology**, v. 60, n. 5, p. 647-662, 2006b.

HERR, A. J.; JENSEN, M. B.; DALMAY, T.; BAULCOMBE, D. C. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. **Science**, v. 308, n. 5718, p. 118-120, 2005.

HESSON, L. B.; SLOANE, M. A.; WONG, J. W. H.; NUNEZ, A. C.; SRIVASTAVA, S.; NG, B.; HAWKINS, N. J.; BOURKE, M. J.; WARD, R. L. Altered promoter nucleosome positioning is an early event in gene silencing. **Epigenetics**, v. 9, n. 10, p. 1422-1430, 2014.

HÖCK, J.; MEISTER, G. The Argonaute protein family. **Genome Biology**, v. 9, n. 2, article 210, 2008.

HOLLICK, J. B. Paramutation and related phenomena in diverse species. **Nature Reviews. Genetics**, v. 18, n. 1, p. 5-23, 2017.

HOLLIDAY, R.; HO, T. DNA methylation and epigenetic inheritance. **Methods**, v. 27, n. 2, p. 179-183, 2002.

HOLLIDAY, R.; PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, v. 187, n. 4173, p. 226-232, 1975.

HOLOCH, D.; MOAZED, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. **Nature Reviews. Genetics**, v. 16, n. 2, p. 71-84, 2015.

HSIEH, T. F.; IBARRA, C. A.; SILVA, P.; ZEMACH, A.; ESHED-WILLIAMS, L.; FISCHER, R. L.; ZILBERMAN, D. Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1451-1454, 2009.

HU, F.; LEI, R.; DENG, Y. F.; WANG, J.; LI, G. F.; WANG, C. N.; LI, Z. H.; ZHU, S. F. Discovery of novel inhibitors of RNA silencing suppressor P19 based on virtual screening. **RSC Advances**, v. 8, n. 19, p. 10532-10540, 2018.

HU, P.; ZHAO, H.; ZHU, P.; XIAO, Y.; MIAO, W.; WANG, Y.; JIN, H. Dual regulation of Arabidopsis AGO2 by arginine methylation. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, article 844, 2019.

HUANG, Y.; JI, L.; HUANG, Q.; VASSYLYEV, D. G.; CHEN, X.; MA, J. B. Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 823-827, 2009.

HUDA, A.; MARIÑO-RAMÍREZ, L.; LANDSMAN, D.; JORDAN, I. K. Repetitive DNA elements, nucleosome binding and human gene expression. **Gene**, v. 436, n. 1/2, p. 12-22, 2009.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 22-32, 2008.



HYUN, K.; JEON, J.; PARK, K.; KIM, J. 2017. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 4, e324, 2017.

ILLUM, L. R. H.; BAK, S. T.; LUND, S.; NIELSEN, A. L. DNA methylation in epigenetic inheritance of metabolic diseases through the male germ line. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 60, n. 2, p. 39-56, 2018.

IWASAKI, S.; KOBAYASHI, M.; YODA, M.; SAKAGUCHI, Y.; KATSUMA, S.; SUZUKI, T.; TOMARI, Y. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. **Molecular Cell**, v. 39, n. 2, p. 292-299, 2010.

JA, L.; DU, J.; HALE, C. J.; FENG, S.; KRAJEWSKI, K.; PALANCA, A. M.; STRAHL, B. D.; PATEL, D. J.; JACOBSEN, S. E. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 385-389, 2013.

JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M. History, discovery, and classification of lncRNAs. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1008, p. 1-46, 2017.

JEDDELOH, J. A.; STOKES, T. L.; RICHARDS, E. J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. **Nature Genetics**, v. 22, n. 1, p. 94-97, 1999.

JAUVION, V.; ELMAYAN, T.; VAUCHERET, H. The conserved RNA trafficking proteins HPR1 and TEX1 are involved in the production of endogenous and exogenous small interfering RNA in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 22, n. 8, p. 2697-2709, 2010.

JIA, T.; ZHANG, B.; YOU, C.; ZHANG, Y.; ZENG, L.; LI, S.; JOHNSON, K. C. M.; YU, B.; LI, X.; CHEN, X. The Arabidopsis MOS4-associated complex promotes microRNA bio-genesis and precursor messenger RNA splicing. **Plant Cell**, v. 29, n. 10, p. 2626-2643, 2017.

JOHNSON, L. M.; DU, J.; HALE, C. J.; BISCHOF, S.; FENG, S.; CHODAVARAPU, R. K.; ZHONG, X.; MARSON, G.; PELLEGRINI, M.; SEGAL, D. J.; PATEL, D. J.; JACOBSEN, S. E. SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 124-136, 2014.

JOLY-LOPEZ, Z.; FORCZEK, E.; VELLO, E.; HOEN, D. R.; TOMITA, A.; BUREAU, T. E. Abiotic stress phenotypes are associated with conserved genes derived from transposable elements. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 2027, 2017.

KAKRANA, A.; MATHIONI, S. M.; HUANG, K.; HAMMOND, R.; VANDIVIER, L.; PATEL, P.; ARIKIT, S.; SHEVCHENKO, O.; HARKESS, A. E.; KINGHAM, B.; GREGORY, B. D.; LEEBENS-MACK, J. H.; MEYERS, B. C. Plant 24-nt reproductive phasiRNAs from intramolecular duplex mRNAs in diverse monocots. **Genome Research**, v. 28, n. 9, p. 1333-1344, 2018.

KAMTHAN, A.; CHAUDHURI, A.; KAMTHAN, M.; DATTA, A. Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, article 208, 2015.

KANG, J. G.; PARK, J. S.; KO, J. H.; KIM, Y. S. Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. **Scientific Reports**, v. 9, article 11960, 2019.

KANNO, T.; BUCHER, E.; DAXINGER, L.; HUETTEL, B.; BOEHMDORFER, G.; GREGOR, W.; KREIL, D. P.; MATZKE, M.; MATZKE, A. J. **A structural-maintenance-of-chromosomes hinge**

- domain-containing protein is required for RNA-directed DNA methylation. *Nature Genetics*, v. 40, n. 5, p. 670-675, 2008.**
- KANNO, T.; METTE, M. F.; KREIL, D. P.; AUFSATZ, W.; MATZKE, M.; MATZKE, A. J. Involvement of putative SNF2 chromatin remodeling protein DRD1 in RNA-directed DNA methylation. ***Current Biology***, v. 14, n. 9, p. 801-805, 2004.
- KAPOOR, M.; TSUDA, S.; TANAKA, Y.; MAYAMA, T.; OKUYAMA, Y.; TSUCHIMOTO, S.; TAKATSUJI, H. Role of petunia pMADS3 in determination of floral organ and meristem identity, as revealed by its loss of function. ***Plant Journal for Cell and Molecular Biology***, v. 32, n. 1, p. 115-127, 2002.
- KAPUSI, E.; HENSEL, G.; CORONADO, M. J.; BROEDERS, S.; MARTHE, C.; OTTO, I.; KUMLEHN, J. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. ***Plant Molecular Biology***, v. 81, n. 1/2, p. 149-160, 2013.
- KASAI, A.; BAI, S.; HOJO, H.; HARADA, T. Epigenome editing of potato by grafting using transgenic tobacco as siRNA donor. ***PLoS One***, v. 11, n. 8, e0161729, 2016.
- KASAI, M.; KANAZAWA, A. RNA silencing as a tool to uncover gene function and engineer novel traits in soybean. ***Breeding Science***, v. 61, n. 5, p. 468-479, 2012.
- KARLOWSK, W. M. Beyond sequence similarity: the curious case of GW/WG protein domain. ***Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology***, v. v. 92, n. 4, p. 303-305, 2011.
- KAWASAKI, H.; TAIRA, K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. ***Nature***, v. 431, n. 7005, p. 211-217, 2004.
- KIM, V. N.; HAN, J.; SIOMI, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. ***Nature Reviews. Molecular Cell Biology***, v. 10, n. 2, p. 126-139, 2009.
- KIRINO, Y.; KIM, N.; DE PLANELL-SAGUER, M.; KHANDROS, E.; CHIOREAN, S.; KLEIN, P. S.; RIGOUTSOS, I.; JONGENS, T. A.; MOURELATOS, Z. Arginine methylation of Piwi proteins catalysed by dPRMT5 is required for Ago3 and Aub stability. ***Nature Cell Biology***, v. 11, n. 5, p. 652-658, 2009.
- KÖLLEN, K.; DIETZ, L.; BIES-ETHEVE, N.; LAGRANGE, T.; GRASSER, M.; GRASSER, K. D. The zinc-finger protein SPT4 interacts with SPT5L/KTF1 and modulates transcriptional silencing in *Arabidopsis*. ***FEBS Letters***, v. 589, n. 21, p. 3254-3257, 2015.
- KON, T.; YOSHIKAWA, N. Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. ***Frontiers in Microbiology***, v. 5, article 595, 2014.
- KOWALCZYKOWSKI, S. C. *Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. Trends in Biochemical Sciences*, v. 25, n. 4, p. 156-165, 2000.
- KU, H. Y.; LIN, H. PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. ***National Science Review***, v. 1, n. 2, p. 205-218, 2014.
- KUBOTA, T.; NONOYAMA, S.; TONOKI, H.; MASUNO, M.; IMAIZUMI, K.; KOJIMA, M.; WAKUI, K.; SHIMADZU, M.; FUKUSHIMA, Y. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. ***Human Genetics***, v. 104, n. 1, p. 49-55, 1999.

KUO, M. H.; ALLIS, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. **BioEssays**, v. 20, n. 8, p. 615-626, 1998.

LLAVE, C.; KASSCHAU, K. D.; RECTOR, M. A.; CARRINGTON, J. C. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. **Plant Cell**, v. 14, n. 4, p. 1605-1619, 2002.

LAM, J. K. W.; CHOW, M. Y. T.; ZHANG, Y.; LEUNG, S. W. S. siRNA Versus miRNA as therapeutics for gene silencing. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**, v. 4, e252, 2015.

LAW, J. A.; DU, J.; HALE, C. J.; FENG, S.; KRAJEWSKI, K.; PALANCA, A. M.; STRAHL, B. D.; PATEL, D. J.; JACOBSEN, S. E. Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. **Nature**, v. 498, n. 7454, p. 385-389, 2013.

LAW, J. A.; AUSIN, I.; JOHNSON, L. M.; VASHIST, A. A.; ZHU, J. K.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; JACOBSEN, S. E. A protein complex required for polymerase V transcripts and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 20, n. 10, p. 951-956, 2010.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 3, p. 204-220, 2010.

LI, J.; YANG, Z.; YU, B.; LIU, J.; CHEN, X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 15, n. 16, p. 1501-1517, 2005.

LI, Y.; KUMAR, S.; QIAN, W. Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 77-85, 2018.

LIN, H.; SPRADLING, A. C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the Drosophila ovary. **Development**, v. 124, n. 12, p. 2463-2476, 1997.

LISOWIEC-WĄCHNICKA, J.; BARTYŚ, N.; PASTERNAK, A. A systematic study on the influence of thermodynamic asymmetry of 5'-ends of siRNA duplexes in relation to their silencing potency. **Nature**, v. 9, article 2477, 2019.

LIU, C.; LU, F.; CUI, X.; CAO, X. Histone methylation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 395-420, 2010.

LIU, Q.; FENG, Y.; ZHU, Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants. **Functional & Integrative Genomics**, v. 9, n. 3, p. 277-286, 2009.

LIU, Z. W.; SHAO, C. R.; ZHANG, C. J.; ZHOU, J. X.; ZHANG, S. W.; LI, L.; CHEN, S.; HUANG, H. W.; CAI, T.; HE, X. J. The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, e1003948, 2014.

LOBBES, D.; RALLAPALLI, G.; SCHMIDT, D. D.; MARTIN, C.; CLARKE, J. SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. **EMBO Reports**, v. 7, n. 10, p. 1052-1058, 2006.

LU, Y.; YANG, X. Computational identification of novel microRNAs and their targets in *Vigna unguiculata*. **Comparative and Functional Genomics**, article 128297, 2010.

LUSSER, M.; PARISI, C.; PLAN, D.; CERREZO, E. R. **New plant breeding techniques**: state-of-the-art and prospects for commercial development. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011. Disponível em: <<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC63971/jrc63971.pdf>>.

Acesso em: 10 out. 2019.

MAKEYEV, E. V.; BAMFORD, D. H. Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity. **Molecular Cell**, v. 10, n. 6, p. 1417-1427, 2002.

MANAVELLA, P. A.; HAGMANN, J.; OTT, F.; LAUBINGER, S.; FRANZ, M.; MACEK, B.; WEIGEL, D. Fast-forward genetics identifies plant CPL phosphatases as regulators of miRNA processing factor HYL1. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 859-870, 2012.

MANI, U.; SANKARESWARAN, A. S.; GOUTHAM, A. R. N.; MOHAN, S. S. SWI/SNF Infobase: an exclusive information portal for SWI/SNF remodeling complex subunits. **PloS One**, v. 12, n. 9, e0184445, 2017.

MARCH, J. C.; BENTLEY, W. E. Methods for gene silencing with RNAi. **Methods in Molecular Biology**, v. 388, p. 427-434, 2007.

MARTIENSSEN, R. A.; COLOT, V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-1074, 2001.

MATRANGA, C.; TOMARI, Y.; SHIN, C.; BARTEL, D. P.; ZAMORE, P. D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 607-260, 2005.

MATZKE, M. A.; MOSHER, R. A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. **Nature Reviews. Genetics**, v. 15, n. 6, p. 394-408, 2014.

MCCLINTOCK, B. The fusion of broken ends of chromosomes following nuclear fusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 28, n. 11, p. 458-463, 1942.

MCLOUGHLIN, A. G.; WYTINCK, N.; WALKER, P. L.; GIRARD, I. J.; RASHID, K. Y.; KIEVIT, T.; FERNANDO, W. G. D.; WHYARD, S.; BELMONTE, M. F. Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **Scientific Reports**, v. 8, article 7320, 2018.

MEINS, F.; SI-AMMOUR, A.; BLEVINS, T. RNA silencing systems and their relevance to plant development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 2MIURA, K.; HASEGAWA, P. M. Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. **Trends Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 223-232, 2010.

MOISSIARD, G.; BISCHOF, S.; HUSMANN, D.; PASTOR, W. A.; HALE, C. J.; YEN, L.; STROUD, H.; PAPIKIAN, A.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; ACOBSEN, S. E. Transcriptional gene silencing by Arabidopsis microRNA homologues involves the formation of heteromers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. 7474-7479, 2014.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, 2013.

MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; BECLIN, C.; VAUCHERET, H. DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis. **Current Biology**, v. 10, n. 24, p. 1591-1594, 2000.

MOREY, L.; HELIN, K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription. **Trends in Biochemical Science**, v. 35, n. 6, p. 323-332, 2010.

MOURRAIN, P.; BECLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; JOUETTE, D.; LACOMBE, A. M.; NIKIC, S.; PICAULT, N.; REMOUE, K.; SANIAL, M.; VO, T. A.; VAUCHERET, H. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 533-542, 2000.

NAGANO, H.; FUKUDOME, A.; HIRAGURI, A.; MORIYAMA, H.; FUKUHARA, T. Distinct substrate specificities of *Arabidopsis* DCL3 and DCL4. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 3, p. 1845-1856, 2013.

NAKANISHI, K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? **Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA**, v. 7, n. 5, p. 637-660, 2016.

NAUMANN, U.; DAXINGER, L.; KANNO, T.; EUN, C.; LONG, Q.; LORKOVIC, Z. J.; MATZKE, M.; MATZKE, A. J. M. Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 187, n. 3, p. 977-979, 2011.

NEIGEBORN, L.; CARLSON, M. Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 108, n. 4, p. 845-858, 1984.

NEGI, P.; RAI, A. N.; SUPRASANNA, P. Moving through the stressed genome: emerging regulatory roles for transposons in plant stress response. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 1448, 2016.

NOSAKA, M.; ITOH, J. I.; NAGATO, Y.; ONO, A.; ISHIWATA, A.; SATO, Y. Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. **PloS Genetics**, v. 8, n. 9, e1002953, 2012.

NOWARA, D.; GAY, A.; LACOMME, C.; SHAW, J.; RIDOUT, C.; DOUCHKOV, D.; HENSEL, G.; KUMLEHN, J.; SCHWEIZE, P. HIGS: host-Induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. **Plant Cell**, v. 22, p. 3130-3141, 2010.

ONODERA, Y.; HAAG, J. R.; REAM, T. S.; NUNES, P. C.; PONTES, O.; PIKAARD, C. S. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. **Cell**, v. 120, n. 5, p. 613-622, 2005.

OUYANG, S.; PARK, G.; ATAMIAN, H. S.; HAN, C. S.; STAJICH, J. E.; KALOSHIAN, I.; BORKOVICH, K. A. MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. **PloS Pathogens**, v. 10, n. 10, e1004464, 2014.

PANG, Y. Y.; LU, R. J. H.; CHEN, P. Y. Behavioral epigenetics: perspectives based on experience-dependent epigenetic inheritance. **Epigenomes**, v. 3, n. 3, article 18, 2019.

PATHAK, K.; GOGOI, B. RNA interference (RNAi): application in crop improvement: a review. **Agricultural Reviews**, v. 37, n. 3, p. 245-249, 2016.

PATTANAYAK, D.; AMOLKUMAR, U.; SOLANKE, P.; KUMAR, A. Plant RNA Interference pathways: diversity in function, similarity in action. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 3, p. 493-506, 2013.

PENTERMAN, J.; ZILBERMAN, D.; HUH, J. H.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S.; FISCHER, R. L. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 16, p. 6752-6757, 2007.



PERAGINE, A.; YOSHIKAWA, M.; WU, G.; ALBRECHT, H. L.; POETHIG, R. C. *SGS3* and *SGS2/SDE1/RDR6* are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, v. 18, n. 19, p. 2368-2379, 2004.

PETERS, L.; MEISTER, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. **Molecular Cell**, v. 26, n. 5, p. 611-623, 2007.

PIKAARD, C. S.; SCHEID, O. M. Epigenetic regulation in plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 12, a019315, 2014.

PIKAARD, C. S.; TUCKER, S. RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V in maize: more than one flavor? **PLoS Genetics**, v. 5, n. 11, e1000736, 2009.

PONTES, O.; LI, C. F.; NUNES, P. C.; HAAG, J.; REAM, T.; VITINS, A.; JACOBSEN, S. E.; PIKAARD, C. S. The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 79-92, 2006.

PRAY, L. Transposons: the jumping genes. **Nature Education**, v. 1, n. 1, article 204, 2008.

PREALL, J.; GORRA, J. M.; HE, Z.; SONTHEIMER, E. J. Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in *Drosophila*. **Current Biology**, v. 16, n. 5, p. 530-535, 2006.

PRIGGE, M. J.; WAGNER, D. R. The *Arabidopsis* serrate gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. **Plant Cell**, v. 13, n. 6, p. 1263-1279, 2001.

PYOTT, D. E.; MOLNAR, A. Going mobile: non-cell-autonomous small RNAs shape the genetic landscape of plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 3, p. 306-318, 2015.

QI, L.; ZHANG, X.; ZHAI, H.; LIU, J.; WU, F.; LI, C.; CHEN, Q. Elongator is required for root stem cell maintenance by regulating *SHORTROOT* transcription. **Plant Physiology**, v. 179, p. 220-232, 2019.

QIU, H.; SARATHY, A.; SCHULTEN, K.; LEBURTON, J. P. Detection and mapping of DNA methylation with 2D material nanopores. **Materials and Applications**, v. 1, article 3, 2017.

QU, F.; YE, X.; MORRIS, T. J. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14732-14737, 2008.

RAND, T. A.; GINALSKI, K.; GRISHIN, N. V.; WANG, X. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 40, p. 14385-14389, 2004.

REAM, T. S.; HAAG, J. R.; WIERZBICKI, A. T.; NICORA, C. D.; NORBECK, A. D.; ZHU, J. K.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J.; PASA-TOLIĆ, L.; PIKAARD, C. S. Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. **Molecular Cell**, v. 33, n. 2, p. 192-203, 2009.

REUTER, M.; CHUMA, S.; TANAKA, T.; FRANZ, T.; STARK, A.; PILLAI, R. S. Loss of the Mili-interacting Tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 6, p. 639-646, 2009.

RIGAL, M. J.; BECKER, C.; PÉLISSIER, T.; POGORELCNIK, R.; DEVOS, J.; IKEDA, Y.; WEIGEL, D.; MATHIEU, O. Epigenome confrontation triggers immediate reprogramming of DNA methylation

and transposon silencing in *Arabidopsis thaliana* F1 epihybrids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 14, e2083-e2092, 2016.

RIGGS, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 14, n. 1, p. 9-25, 1975.

RODRÍGUEZ-LEAL, D.; CASTILLO-COBIÁN, A.; RODRÍGUEZ-ARÉVALO, I.; VIELLE-CALZADA, J. P. A primary sequence analysis of the ARGONAUTE protein family in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 1347, 2016.

ROBALINO, J.; BARTLETT, T.; SHEPARD, E.; PRIOR, S.; JARAMILLO, G.; SCURA, E.; CHAPMAN, R. W.; GROSS, P. S.; BROWDY, C. L.; WARR, G. W. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13561-13571, 2005.

ROJAS-RÍOS, P.; SIMONELIG, M. piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells. **Development**, v. 145, n. 17, article 161786, 2018.

ROY, P.; DATTA, A. DCL and associated proteins of *Arabidopsis thaliana*: an interaction study. **International Letters of Natural Sciences**, v. 61, p. 85-94, 2017.

SASSAKI, F. T.; CAMPOS-PEREIRA, T.; MAIA, I. G. The post-transcriptional gene silencing pathway in Eucalyptus. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 496-500, 2005.

SAURABH, S.; VIDYARTHI, A. S.; PRASAD, D. RNA interference: concept to reality in crop improvement. **Planta**, v. 239, p. 543-564, 2014.

SCHERR, M.; MORGAN, M. A.; EDER, M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 245-256, 2003.

SCHMITZ, R. J.; ZHANG, X. High-throughput approaches for plant epigenomic studies. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 2, p. 130136, 2011.

SIGMAN, M. J.; SLOTKIN, R. K. The first rule of plant transposable element silencing: location, location, location. **Plant Cell**, v. 28, p. 304-313, 2016.

SLOAN, A. E.; SIDORENKO, L.; MCGINNIS, K. M. Diverse gene-silencing mechanisms with distinct requirements for RNA polymerase subunits in *Zea mays*. **Genetics**, v. 198, n. 3, p. 1031-1042, 2014.

SMITH, L. M.; PONTES, O.; SEARLE, I.; YELINA, N.; YOUSAFZAI, F. K.; HERR, A. J.; PIKAARD, C. S.; BAULCOMBE, D. C. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 19, n. 5, p. 1507-1521, 2007.

SONG, M. S.; ROSSI, J. J. Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 10, p. 1603-1618, 2017.

SOUZA, A. J.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Gene silencing: concepts, applications, and perspectives in woody plants. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 6, p. 645-656, 2007.

SUSSMAN, M. R. The zinc-finger protein SPT4 interacts with SPT5L/KTF1 and modulates transcriptional silencing in *Arabidopsis*. **FEBS Letters**, v. 589, n. 21, p. 3254-3257, 2015.

SUTTON, M. D.; WALKER, G. C. *Managing DNA polymerases: coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 15, p. 8342-8349, 2001.

SUZUKI, R.; HONDA, S.; KIRINO, Y. PIWI expression and function in cancer. *Frontiers in Genetics*, v. 3, article 204, 2012.

TAKAHASHI, T.; NAKANO, Y.; UI-TEI, K. Current status for application of RNA interference technology as nucleic acid drug. In: UCHIUMI, F. (Ed.). **Gene expression and regulation in mammalian cells: transcription from general aspects**. London: IntechOpen, 2018.

TANG, G.; YAN, J.; GU, Y.; QIAO, M.; FAN, R.; MAO, Y.; TANG, X. Construction of short tandem target mimic (STTM) to block the functions of plant and animal microRNAs. *Methods*, v. 58, n. 2, p. 118-125, 2012.

TANG, G.; GALILI, G.; ZHUANG, X. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolic engineering. *Metabolomics*, v. 3, n. 3, p. 357-369, 2007.

TANG, G.; GALILI, G. Using RNAi to improve plant nutritional value: from mechanism to application. *Trends in Biotechnology*, v. 22, n. 9, p. 463-469, 2004.

TARIQ, M.; PASZKOWSKI, J. DNA and histone methylation in plants. *Trends in Genetics*, v. 20, n. 6, p. 244-251, 2004.

TIRNAZ, S.; BATLEY, J. DNA methylation: toward crop disease resistance improvement. *Trends in Plant Science*, v. 24, n. 12, p. 1137-1150, 2019.

TOLIA, N. H.; JOSHUA-TOR, L. Slicer and the argonautes. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 1, p. 36-43, 2007.

TOMPA, R.; MCCALLUM, C. M.; DELROW, J.; HENIKOFF, J. G.; VAN STEENSEL, B.; HENIKOFF, S. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of chromomethylase3. *Current Biology*, v. 12, n. 1, p. 65-68, 2002.

TOMPKINS, J. D.; HALL, C.; CHEN, V. C.; LI, A. X.; WU, X.; HSU, D.; COUTURE, L. A.; RIGGS, A. D. Epigenetic stability, adaptability, and reversibility in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, n. 31, article 12544-9, 2012.

VAGIN, V. V.; WOHLSCHLEGEL, J.; QU, J.; JONSSON, Z.; HUANG, X.; CHUMA, S.; GIRARD, A.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J.; ARAVIN, A. A. Proteomic analysis of murine Piwi proteins reveals a role for arginine methylation in specifying interaction with Tudor family members. *Genes & Development*, v. 23, n. 15, p. 1749-1762, 2009.

VAUCHERET, H. *Noncoding and small RNAs Plant ARGONAUTES*. *Trends in Plant Science*, v. 13, n. 7, p. 350-358, 2008.

VAZQUEZ, F.; GASCIOLLI, V.; CRÉTÉ, P.; VAUCHERET, H. *The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing*. *Current Biology*, v. 14, n. 4, p. 346-351, 2004.

WANG, B. M.; DENNIS, E. S. *SPT5-like, a new component in plant RdDM*. *Embo Reports*, v. 10, n. 6, p. 573-575, 2009.



WANG, J.; PLACE, R. F.; PORTNOY, V.; HUANG, V.; KANG, M. R.; KOSAKA, M.; HO, M. K. C.; LI, L. C. *Inducing gene expression by targeting promoter sequences using small activating RNAs.* **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 1, e14, 2015.

WANG, J.; MEI, J.; REN, G. *Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation.* **Frontiers in Plant Science**, v. 10, article 360, 2019.

WANG, M. B.; ABBOTT, D. C.; WATERHOUSE, P. M. *A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus.* **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 6, p. 347-356, 2000.

WASSENEGGER, M.; KRCZAL, G. *Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases.* **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 3, p. 142-151, 2006.

WASSENEGGER, M.; HEIMES, S.; RIEDEL, L.; SÄNGER, H. L. *RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants.* **Cell**, v. 76, n. 3, p. 567-576, 1994.

WEINHEIMER, I.; JIU, Y.; RAJAMÄKI, M. L.; MATILAINEN, O.; KALLIJÄRVI, J.; CUELLAR, W. J.; LU, R.; SAARMA, M.; HOLMBERG, C. I.; JÄNTTI, J.; VALKONEN, J. P. T. *Suppression of RNAi by dsRNA-degrading RNaseIII enzymes of viruses in animals and plants.* **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 3, e1004711, 2015.

WENDTE, J. M.; HAAG, J. R.; PONTES, O. M.; SINGH, J.; METCALF, S.; PIKAARD, C. S. *The Pol IV largest subunit CTD quantitatively affects siRNA levels guiding RNA-directed DNA methylation.* **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 17, p. 9024-9036, 2019.

WIERZBICKI, A. T. *The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing.* **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, p. 517-522, 2012.

WIERZBICKI, A. T.; COCKLIN, R.; MAYAMPURATH, A.; LISTER, R.; ROWLEY, M. J.; GREGORY, B. D.; ECKER, J. R.; TANG, H.; PIKAARD, C. S. *Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome.* **Genes & Development**, v. 26, n. 16, p. 1825-1836, 2012.

WIERZBICKI, A. T.; HAAG, J. R.; PIKAARD, C. S. *Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes.* **Cell**, v. 135, n. 4, p. 635-648, 2008.

WILKINSON, K. A.; HENLEY, J. M. *Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation.* **Biochemical Journal**, v. 428, n. 2, p. 133-145, 2010.

WOOD, A.; SHILATIFARD, A. *Posttranslational modifications of histones by methylation.* **Advances in Protein Chemistry**, v. 67, p. 201-222, 2004.

WYRICK, J. J.; HOLSTEGE, F. C. P.; JENNINGS, E. G.; CAUSTON, H. C.; SHORE, D.; GRUNSTEIN, M.; LANDER, E. S.; YOUNG, R. A. *Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast.* **Nature**, v. 402, p. 418-421, 1999.

XIE, M.; YU, B. *siRNA-directed DNA methylation in plants.* **Current Genomics**, v. 16, n. 1, p. 23-31, 2015.

XIE, Z.; JOHANSEN, L. K.; GUSTAFSON, A. M.; KASSCHAU, K. D.; LELLIS, A. D.; ZILBERMAN, D.; JACOBSEN, S. E.; CARRINGTON, J. C. *Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants.* **PLoS Biology**, v. 2, n. 5, e104, 2004.

YAN, W.; CHEN, D.; SMACZNIAK, C.; ENGELHORN, J.; LIU, H.; YANG, W.; GRAF, A.; CARLES, C. C.; ZHOU, D. X.; KAUFMANN, K. *Dynamic and spatial restriction of Polycomb activity by plant histone demethylases.* **Nature Plants**, v. 4, p. 681-689, 2018.

YANG, T.; WANG, Y.; TEOTIA, S.; ZHANG, Z.; TANG, G. *The making of leaves: how small RNA networks modulate leaf development.* **Frontiers in Plant Science**, v. 9, article 824, 2018.

YANG, Z.; EBRIGHT, Y. W.; YU, B.; CHEN, X. *HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide.* **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 667-675, 2006.

YAU, Y.; STEWART, C. N. *Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants.* **BMC Biotechnology**, v. 13, article 36, 2013.

YOGINDRAN, S.; RAJAM, M. V. *RNAi for crop improvement.* In: BAHADUR, B.; VENKAT RAJAM, M.; SAHIJRAM, L.; KRISHNAMURTHY, K. (Ed.). **Plant biology and biotechnology.** New Delhi: Springer, 2015. p. 623-637.

YOU, W.; LORKOVIC, Z. J.; MATZKE, A. J.; MATZKE, M. *Interplay among RNA polymerases II, IV and V in RNA-directed DNA methylation at a low copy transgene in *Arabidopsis thaliana*.* **Plant Molecular Biology**, v. 82, n. 1/2, p. 85-90, 2013.

YOUNIS, A.; SIDDIQUE, M. I.; KIM, C. K.; LIM, K. B. *RNA Interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of hi-tech plant breeding.* **International Journal Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1150-1158, 2014.

YU, H.; ZHAOM, J.; XU, J.; LI, X.; ZHANG, F.; WANG, Y.; CARR, C.; ZHANG, J.; ZHANG, G. *Detection of changes in DNA methylation induced by low-energy ion implantation in *Arabidopsis thaliana*.* **Radiation Research**, v. 175, n. 5, p. 599-609, 2011.

ZARATIEGUI, M.; IRVINE, D. V.; MARTIENSSEN, R. A. *Noncoding RNAs and gene silencing.* **Cell**, v. 128, n. 4, p. 763-776, 2007.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, A. K.; PAN, Y.; BAI, J.; FANG, J.; SHI, H.; ZHU, J. K. *Knockdown of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development.* **Plant Physiology**, v. 176, n. 3, p. 2082-2094, 2018.

ZHANG, H.; TANG, K.; WANG, B.; DUAN, C. G.; LANG, Z.; ZHU, J. K. *Protocol: a beginner's guide to the analysis of RNA-directed DNA methylation in plants.* **Plant Methods**, v. 10, p. 1-9, 2014.

ZHANG, H.; ZHU, J. K. *Active DNA demethylation in plants and animals.* **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 77, p. 161-173, 2012.

ZHANG, H.; ZHU, J. K. *RNA-directed DNA methylation.* **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 142-147, 2011.

ZHANG, X.; HENDERSON, I. R.; LU, C.; GREEN, P. J.; JACOBSEN, S. E. *Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 11, p. 4536-4541, 2007.

ZHENG, B.; WANG, Z.; LI, S.; YU, B.; LIU, J. Y.; CHEN, X. *Intergenic transcription by RNA Polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*.* **Genes and Development**, v. 23, n. 24, p. 2850-2860, 2009.

ZHENG, X.; PONTES, O.; ZHU, J.; MIKI, D.; ZHANG, F.; LI, W. X.; LIDA, K.; KAPOOR, A.; PIKAARD, C. S.; ZHU, J. K. ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in Arabidopsis. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1259-1262, 2008.

ZHONG, X.; HALE, C. J.; LAW, J. A.; JOHNSON, L. M.; FENG, S. DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 19, n. 9, p. 870-875, 2012.

ZHOU, M.; LAW, J. A. RNA Pol IV and V in gene silencing: rebel polymerases evolving away from pol II's rules. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 27, p. 154-164, 2015.

ZHU, J. K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 143-166, 2009.

ZHU, Y.; ROWLEY, M. J.; BÖHMDORFER, G.; WIERZBICKI, A. T. A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 298-309, 2013. ZIELEZINSKI, A.; KARLOWSKI, W. M. Identification and analysis of WG/GW ARGONAUTE-binding domains. **Methods in Molecular Biology**, v. 1640, p 241-256, 2017.

ZONG, J.; YAO, X.; YIN, J.; ZHANG, D.; MA, H. Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. **Gene**, v. 447, n. 1, p. 29-39, 2009.

**Embrapa**

---

**Milho e Sorgo**



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

