

Viroide – um RNA parasita



Tiago Campos Pereira^{1,2}, Danyel Fernandes Contiliani^{2,3}

¹Departamento de Biologia, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

²Programa de Pós-Graduação em Genética, FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP

³Instituto Agronômico de Campinas, IAC, Ribeirão Preto, SP

Autor para correspondência - tiagocampospereira@ffclrp.usp.br

Palavras-chave: viroide, ribozima, RNA, patógeno, fitopatologia, agente subviral

O viroide é uma molécula RNA ímpar na biologia devido a um conjunto de propriedades incomuns: ele é de simples fita, porém se estrutura como uma dupla fita; alguns deles possuem atividade catalítica; é capaz de ser replicado pela célula hospedeira e causar doenças em plantas e fungos. Assim, o viroide é um patógeno de RNA, e os genomas de alguns deles não possuem genes. Esses organismos incomuns são muito menores e mais simples que os vírus sendo, portanto, denominados agentes subvirais. Neste trabalho, veremos como eles conseguem causar doenças mesmo sendo desprovidos de genes.

O que são patógenos?

Patógenos são organismos causadores de doenças. Diversas classes de patógenos são descritas, sendo as mais familiares: (a) organismos eucariontes multicelulares (por exemplo, o platelminto *Taenia solium*, causador da cisticercose); (b) organismos eucariontes unicelulares (por exemplo, a levedura *Cryptococcus neoformans*, causadora da criptococose); (c) organismos procariontes (por exemplo, a bactéria *Yersinia pestis*, causadora da peste bubônica) e (d) vírus (por exemplo, o vírus da Febre Amarela, causador da Febre Amarela). As três primeiras classes compartilham o fato de serem organismos constituídos por células. Por sua vez, os vírus são entidades acelulares e podem ser interpretados como parasitas intracelulares obrigatórios, submicroscópicos, compostos por ácido nucleico, proteína e, dependendo da família viral, com presença de envelope lipoproteico.

Há outras classes menos conhecidas de patógenos, entre elas os príons, que são estruturalmente ainda mais simples que os vírus, compostos exclusivamente por proteína (vide artigo O gene *PRNP* codificador da proteína príon e o mal da vaca louca, *Genética na Escola*, v.13, n. 1, 2018) e os viroides, compostos exclusivamente por RNA.

Viroide – um RNA patogênico

Em 1971, o pesquisador suíço-americano Theodor Otto Diener, atualmente com 101

anos, publicou um conjunto de artigos a respeito do patógeno causador do afilamento do tubérculo da batata, uma doença que afetava a produção dessa espécie vegetal. Seus estudos apresentavam algo até então desconhecido pela ciência – o **agente etiológico** da doença era muito menor e mais simples que os vírus. O organismo causador dessa enfermidade era desprovido de camada lipídica e até mesmo de um capsídeo proteico; ele era composto somente por uma molécula de RNA. Apenas isso. Theodor criou o termo *viroide* (*oide* - semelhante) para designar essa nova classe de patógenos, similares aos vírus por serem acelulares e extremamente diminutos, porém distintos deles por serem destituídos de proteínas.

Os viroides são moléculas de RNA de fita simples, de 246 a 434 nucleotídeos de extensão. Curiosamente, devido ao elevado grau de complementaridade interna da cadeia de RNA (i.e., sequências de nucleotídeos que são complementares entre si dentro da mesma cadeia), os viroides apresentam estrutura semelhante a uma dupla fita de RNA quase-perfeita (Figura 1). Seu tamanho pode variar de 50 **nanômetros** (nm), quando considerado como dupla fita, ou 100 nm quando observado como simples fita, **linearizado**. Todos os viroides descritos infectam apenas plantas (por exemplo, o tomateiro, o coqueiro, a pereira, a macieira, a videira, o pessegueiro e o abacateiro) e fungos (como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*). Eles são transmitidos por pulgões, pequenos insetos que se alimentam da seiva, ou durante o manuseio das plantas (por exemplo, instrumentos de poda usados em uma planta contaminada). Até o momento, nenhum viroide foi identificado

Agente etiológico - organismo causador de doença; o mesmo que patógeno.

Nanômetro - a milionésima parte do milímetro.

Linearizado - em biologia molecular, o termo aplica-se a uma molécula que previamente era circular, porém devido a um corte em sua cadeia tornou-se linear, apresentado assim duas extremidades.

em animais. Contudo, ressalta-se que o vírus da hepatite Delta, que afeta humanos, possui algumas curiosas semelhanças com viroides: pequeno genoma de RNA, circular, com es-

trutura em dupla-fita, e com mecanismos de replicação similares.

Afinal, como uma molécula de RNA pode se replicar?

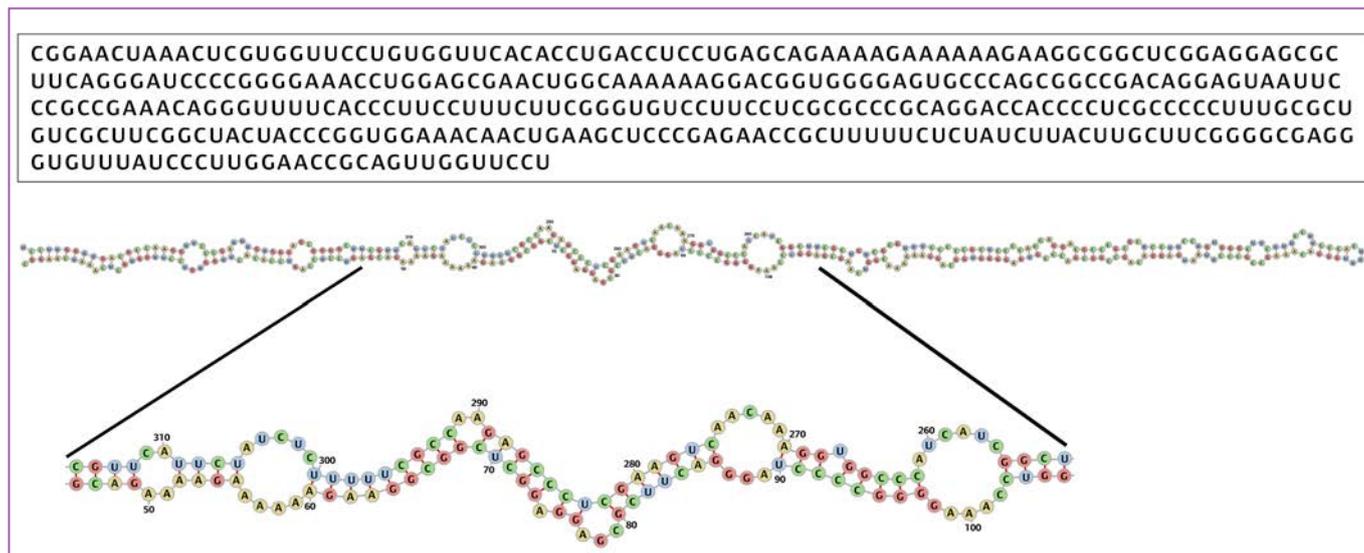


Figura 1. A estrutura do genoma de um viroide. O genoma do viroide do tubérculo afilado da batata (PSTV) possui 359 nucleotídeos (sequência dentro da caixa preta), constituindo um dos menores genomas conhecidos. Devido ao alto grau de complementaridade entre as bases de sua cadeia nucleotídica, este RNA de simples fita emparelha consigo mesmo, formando uma estrutura semelhante a um RNA de dupla fita quase perfeitamente emparelhado (imagem do meio). Esse emparelhamento interno pode ser visto em detalhe na imagem inferior. As regiões que parecem bolhas representam as regiões sem complementaridade interna. As imagens do meio e inferior foram geradas a partir do software online RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) com a sequência original do PSTV.

Um RNA replicável

No contexto celular, o DNA nuclear é replicado antes da mitose por enzimas conhecidas como DNA polimerases. Por sua vez, as moléculas de RNA mensageiro, transportador e ribossomal não são duplicadas, pois a célula não possui um sistema de replicação para essas classes de RNAs. Como, então, a molécula de RNA do viroide consegue se multiplicar na célula?

Algo muito especial ocorre para a replicação dos viroides. Eles são copiados por meio de uma atividade não convencional da enzima RNA polimerase II (RNAPII). Relembrando, a RNA polimerase II é uma enzima que se liga ao DNA (aos genes, mais especificamente) e sintetiza moléculas de RNA mensageiro (mRNAs), processo esse denominado de transcrição gênica. Entretanto, acredita-se que o RNA do viroide seja capaz de recrutar a RNAPII e alterar sua função, para que ela realize a replicação dele (sintetizando uma molécula de RNA complementar ao viroide, denominada de fita negativa) (Figura 2). Por sua vez, a fita negativa serve como molde para a mesma enzima RNAPII fazer cópias do viroide (convencionalmente designado de cópias de fita positiva).

Essa replicação ocorre de uma maneira bem curiosa, denominada de círculo rolante. Isto é, o genoma do viroide serve como um molde 'circular', sobre o qual a RNAPII fica dando voltas ininterruptamente, gerando uma longa cadeia multimérica de viroides (Figura 2).

E, então, como esse **concatâmero** é cortado em unidades do viroide?

Concatâmero - estrutura composta por várias cópias de uma mesma unidade básica, todas elas dispostas em sequência linear e de maneira consecutiva.

Multimérica - estrutura composta por várias cópias de uma mesma unidade básica.

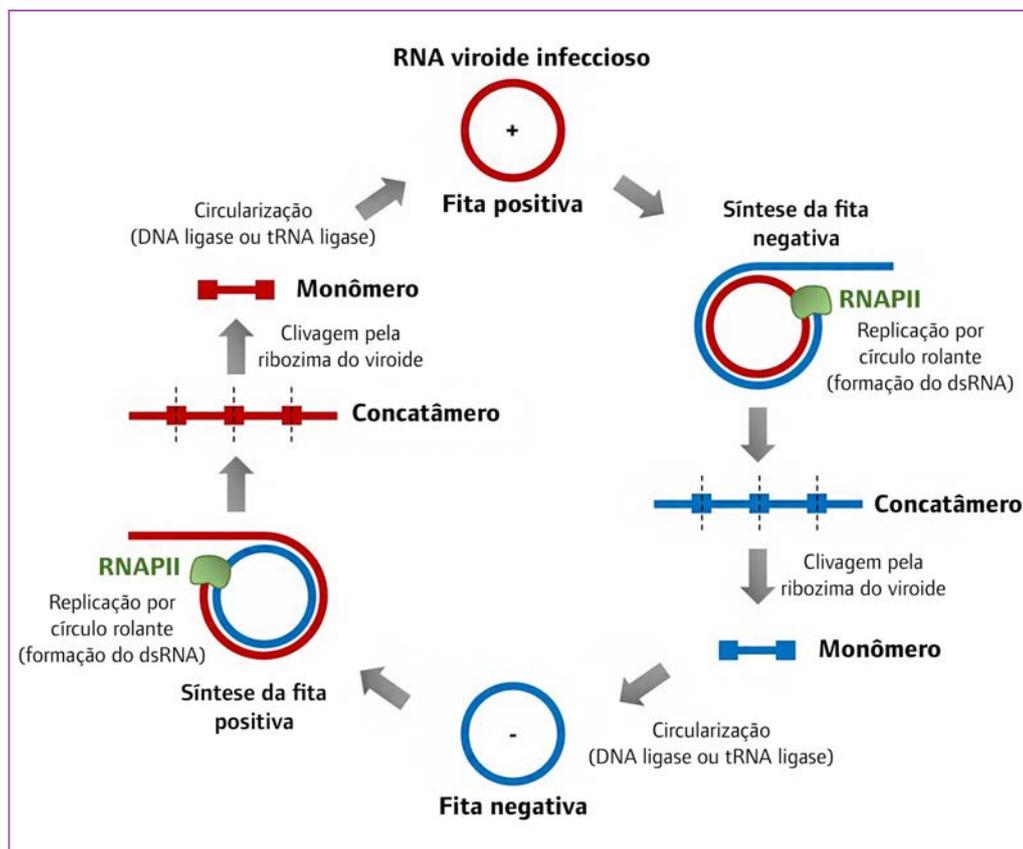


Figura 2. O mecanismo de replicação do viroide por círculo rolante. Convencionalmente, o viroide é designado de fita (ou polaridade) positiva (+). Apesar de ter alto grau de complementaridade interna, por questões didáticas, ele é aqui representado simplesmente como um círculo. No núcleo, ele é replicado pela RNAPII, enzima essa que se liga ao viroide (representado como um círculo vermelho), e percorre toda sua extensão ininterruptamente (tal como se estivesse rolando pelo círculo), gerando uma longa cadeia de RNA (em azul) com diversas cópias (isto é, multimérica) de polaridade negativa (-). É importante ressaltar que parte da cadeia azul está perfeitamente emparelhada com a vermelha, formando um RNA de dupla fita (dsRNA) perfeito (duas regiões circulares lado a lado). A cadeia multimérica (concatâmero) é então clivada nas unidades fundamentais (isto é, no tamanho do próprio genoma do viroide, o monômero) por meio da atividade catalítica de corte do próprio RNA (ribozima). Estes monômeros de polaridade negativa são então circularizados por uma ligase celular e então submetidos ao processo de replicação de círculo rolante novamente, para gerar as cópias monoméricas originais (de polaridade positiva) do viroide. Nota-se, portanto, que todo esse processo de replicação apresenta simetria entre as fitas positiva e negativa. Imagem baseada em Clark, D.P. e colaboradores, 2019.

Um RNA catalítico

Monômero - a unidade básica de uma estrutura repetitiva, tal como a de um polímero.

Clivagem - corte. Em biologia molecular, o termo geralmente se refere ao corte realizado, por enzimas, em sequências nucleotídicas, de aminoácidos ou outras biomoléculas.

Circularizado - em biologia molecular, o termo aplica-se a uma molécula que previamente era linear, porém, devido à ligação das duas extremidades de sua cadeia, tornou-se circular.

Neste momento, outra característica de alguns viroides merece comentário: alguns deles possuem atividade catalítica, isto é, são enzimas de RNA. Em sua ampla maioria, as enzimas celulares são proteínas; entretanto, há alguns poucos exemplos de enzimas de RNA, designadas de ribozimas. Os viroides são exemplos de ribozimas.

Assim, alguns viroides são capazes de realizar o corte da cadeia multimérica em **monômeros**, por meio de sua atividade catalítica de **clivagem**. Em seguida, esses monômeros são **circularizados** por meio da atividade de enzimas convencionais da célula, tais como a DNA ligase (por meio de uma atividade não convencional de ligar RNAs) ou da tRNA ligase.

É necessário esclarecer que nem todos os viroides possuem essa atividade de ribozima. Há a hipótese de que outras enzimas celulares, tais como a RNase III, realizem a clivagem daqueles viroides que não forem catalíticos.

Depois das análises anteriores, ainda pode se fazer a seguinte pergunta: Considerando-se um genoma tão pequeno, afinal, quantos genes o viroide possui?

Um genoma desértico

É importante ressaltar que o viroide e o seu genoma são, na verdade, a mesma entidade, uma mesma coisa. Em resposta à pergunta anterior, de maneira extraordinária, os viroides não possuem genes codificadores de proteínas! Esses dois aspectos reforçam a natureza singular do viroide na biologia.

Conforme exposto anteriormente, alguns viroides possuem atividade de ribozima. Nesse sentido, pode-se argumentar que tais viroides possuem um único gene codificador para um RNA funcional – a ribozima. Por sua vez, os demais viroides que não possuem atividade de ribozima são genomas despro-

vidos de genes. Um genoma com zero gene. Isso leva a outra pergunta: Como, então, o viroide é capaz de causar uma doença?

Um acidente de percurso

Alguns vírus possuem RNAs de dupla fita (dsRNAs) como materiais genéticos, ao passo que os RNAs celulares são tipicamente de simples fita. Essa diferença é a base de um sistema de defesa celular contra vírus. Isto é, quando uma célula hospedeira identifica dsRNAs em seu interior, ela os fragmenta (por meio de uma enzima denominada Dicer) e usa os segmentos gerados para reconhecer, por complementaridade, demais RNAs do vírus (Figura 3).

Patogênese - modo como um agente patogênico causa uma doença.

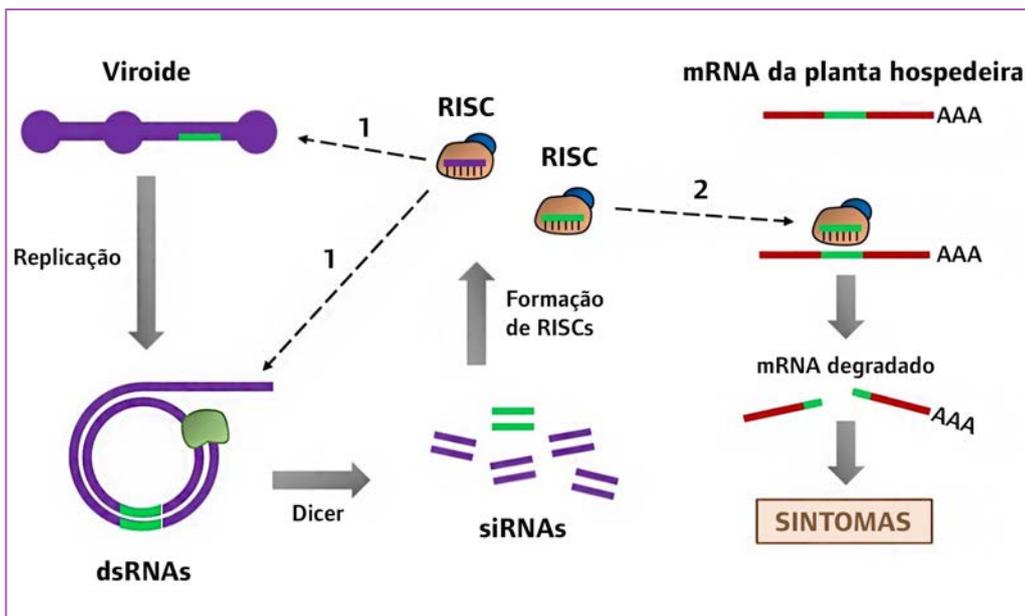


Figura 3. O mecanismo de patogênese do viroide.

Durante sua replicação, os viroides geram RNAs de dupla fita (dsRNAs) perfeitos, os quais são reconhecidos pela célula, e processados em pequenos fragmentos pela enzima Dicer, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs). Os siRNAs constituem os complexos celulares RISC, os quais identificam (por complementaridade) e tentam clivar os demais RNAs derivados do viroide (setas tracejadas 1). Entretanto, alguns siRNAs viroidais (regiões em verde) apresentam complementaridade parcial com RNAs mensageiros da célula vegetal, levando ao corte e destruição acidental dessas moléculas (seta tracejada 2). A redução destes mRNAs do hospedeiro resulta nos sintomas e está envolvida com o desenvolvimento da doença em si. Imagem baseada em Wang, M.B. e colaboradores, 2004.

Entretanto, no caso dos viroides, algo inesperado ocorre. Os fragmentos derivados do viroide apresentam complementaridade parcial com RNAs mensageiros da célula, permitindo o emparelhamento de bases entre tais moléculas. Portanto, uma vez que esses fragmentos se associam ao **complexo ribonucleoproteico** RISC (do inglês, complexo induzido por RNA) ele é encaminhado até

as regiões complementares dos mRNAs da célula vegetal, resultando na destruição acidental destas moléculas (Figura 3). Assim, os mRNAs atingidos se tornam incapazes de gerar os seus produtos de maneira suficiente, inviabilizando suas funções biológicas. Esse evento, por sua vez, leva ao surgimento de sintomas típicos de doenças viroidais, tais como a redução de tamanho de estruturas da

Complexo ribonucleoproteico - agregados moleculares formados por RNA e proteínas.

planta, ondulação das folhas, alterações na casca, **clorose** e deformação de tubérculos, frutos e flores. Portanto, em síntese, ao tentar combater o viroide, a planta acaba destruindo alguns de seus RNAs, levando à doença.

Por fim, é relevante destacar que os viroides da família Pospiviroidae se replicam no núcleo (por meio da RNAPII, tal como descrito anteriormente) ao passo que os viroides da família Avsunviroidae se multiplicam no cloroplasto (por meio de outra RNA polimerase, que atua nessa organela). Diante disso, levanta-se a hipótese de que outros mecanismos moleculares de patogênese existam, tal como a interação do RNA do viroide com genes no núcleo ou no genoma do cloroplasto, alterando a expressão dos mesmos, resultando assim nos sintomas observados.

Conclusões

Os viroides estão entre os parasitas estruturalmente mais simples conhecidos pela ciência. Viroides são seres vivos? Essa é uma pergunta difícil de ser respondida, principalmente pelo fato de não possuímos, no presente, uma definição universalmente aceita sobre o que é vida. Entretanto, considerando-se o fato de que viroides possuem material genético, são replicados dentro da célula, sofrem mutação e passam por seleção natural, os pontos a favor de seu status como vivos são relevantes. A eventual identificação dessa classe de RNAs parasitas infectando outros grupos (arqueias e animais), assim como a compreensão a respeito da origem dos viroides e sua correlação filogenética com os vírus e as células, constituiriam descobertas marcantes.

Para saber mais

NAVARRO, B.; FLORES, R.; DI SERIO, F. Advances in Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Virology*, v. 8, p. 305-325, 2021.

WANG, M.B.; Bian, X.Y.; WU, L.M. et al. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.101, n.9, p. 3275-80, 2004.

FLORES, R.; NAVARRO, B.; DELGADO, S.; SERRA, P.; DI SERIO, F. Viroid pathogenesis: a critical appraisal of the role of RNA silencing in triggering the initial molecular lesion. *FEMS Microbiol Rev.* v. 44, n. 3, p. 386-398, 2020.

CLARK, D.P.; PAZDERNIK, N.J.; MCGEHEE, M.R. *Molecular Biology* (Third Edition). Chapter 24 - Viruses, Viroids, and Prions. Academic Cell, p. 749-792, 2019.

Clorose - redução anormal da produção de clorofila em folhas vegetais, deixando-as amarelas ou brancas.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6631365/>