SBM Sociedade Brasileira de Microbiologia
#01
julho - 2007

MICROBIOLOGIA *in foco*

A revista do Microbiologista.

informativo sbm • ano 1 • www.sbmicrobiologia.org.br

Um novo enfoque em Microbiologia.

Consensos

Testes de Sensibilidade In Vitro a Antifúngicos 2006

SBM 50 anos

Prof. Dr. Luiz Rachid Trabulsi

RNA INTERFERÊNCIA

A nova corrida do ouro.

Carlos F. M. Menck
Depto. de Microbiologia,
Professor Titular do Instituto de Ciências Biomédicas
Av. Prof. Lineu Prestes 1374 - CEP 05508-900
São Paulo- SP - Brasil

Redescobrindo o metabolismo da célula.

A revelação de que a molécula de RNA tinha atividade catalítica, em meados dos anos '80, já nos havia alertado que estas provavelmente desempenham funções muito mais relevantes do que simples mensageiros ou fábricas de proteínas. Porém, ainda não estávamos preparados para mudanças tão drásticas na forma de como a célula controla seu metabolismo. O início da descoberta começou com fatos inusitados, e difíceis de explicar, em plantas, mais especificamente petúnia, no início da década de '90. Foram construídas plantas transgênicas que super-expressavam genes para produção de pigmentos, e se esperava que estas gerassem flores com coloração violeta escuro (em comparação com plantas selvagens que têm flores violeta-claro). Entretanto, para surpresa dos pesquisadores, as plantas apresentavam flores brancas, devido à ausência de síntese do pigmento, por silenciamento do transgene e do gene endógeno!

Esse fenômeno de silenciamento gênico em plantas também foi observado em outros organismos, ficando conhecido como co-supressão. Porém, o mecanismo de silenciamento era desconhecido. Alguns anos mais tarde, os grupos dos pesquisadores americanos Andrew Z. Fire e Craig C. Mello publicaram em conjunto resultados de seus trabalhos com o modelo biológico *Caenorhabditis elegans* (um verme nematóide), revelando que pequenas moléculas de RNA dupla-fita (**RNAdf**) poderiam silenciar a expressão de genes (Fire et al, 1998). Os experimentos apresentados chamam atenção pela simplicidade. Ao analisar os efeitos já conhecidos de inibição de expressão gênica por moléculas de RNA simples fita anti-senso e também senso (similar aos dados de co-supressão), os pesquisadores descobriram que o uso simultâneo das duas moléculas tinha um efeito sinergístico. Alguns experimentos e controles suplementares revelaram que a molécula efetora era, na verdade, o RNAdf, e o significado desta descoberta foi muito bem avaliado e discutido. Pela abilidade do RNAdf de interferir na expressão genética, o mecanismo começou a ser chamado de RNA interferência, ou simplesmente **RNAi**.

Alguns poucos anos mais tarde (2001) confirmou-se a existência do mesmo mecanismo em células humanas, o que evidenciou a alta importância evolutiva da via de RNAi em eucariontes em geral, e abriu perspectivas de uso desse mecanismo como base para silenciamento gênico em mamíferos, com grande potencial tecnológico (Elbashir et al, 2001). Descobriu-se também que pequenas moléculas de RNA são sintetizadas nas células, a partir do seu genoma, de modo a produzir estruturas similares a grampos, formando moléculas de RNAdf (conhecidos como microRNA, ou **miRNA**) que controlam a expressão de genes celulares, mudando radicalmente a forma com que o metabolismo celular deve ser investigado. Em 2006, apenas 8 anos após sua descoberta, os Dres. Fire e Mello receberam o Prêmio Nobel de Medicina.

Mecanismos de ação de RNAi

A via metabólica de processamento pelo RNAi está ilustrado na figura 1. A ilustração separa os processos celulares endógenos, e aqueles induzidos artificialmente por moléculas exógenas. Nos processos celulares (figura 1A), genes que codificam grupos de microRNAs são transcritos a partir da RNA polimerase II, como microRNAs primários (**pri-miRNAs**), que podem corresponder a moléculas com comprimento de milhares de nucleotídeos, que são poliadeniladas e recebem o 5'-cap, como os RNAs mensageiros celulares. Porém, ainda dentro do núcleo, esses pri-miRNAs são clivados por RNAses (**Drosha** ou **Pasha**) e processados para

formar estruturas de RNAdf em grampo, conhecidos como pre-microRNAs (**pre-miRNAs**) com cerca de 70 bases. Estas moléculas são exportadas ao citoplasma (pela enzima Exportina-5) e são novamente clivadas por uma RNAse III, **Dicer**, resultando em duplexes de 19 a 23 pares de base.

Essas moléculas de RNAdf se associam ao complexo **RISC** (do inglês "RNA Induced Silecing Complex"), que promove a interação com moléculas de RNAs mensageiros que sejam complementares a uma das fitas da duplex (conhecido como RNA guia). Dois mecanismos de silenciamento, a partir dessa interação, são bem conhecidos para silenciamento gênico: bloqueio da tradução e degradação da fita alvo. Enquanto a primeira ocorre principalmente em moléculas de miRNA cuja complementaridade é apenas parcial, em alguns casos a similaridade entre a molécula de miRNA e parte do RNA mensageiro alvo é total, resultando na clivagem e degradação específica deste transcrito. É importante salientar que, em casos de complementação incompleta, moléculas de miRNA podem regular centenas de genes, e cada gene alvo pode ser regulado por múltiplos miRNAs, demonstrando a complexidade dessa rede de regulação gênica.

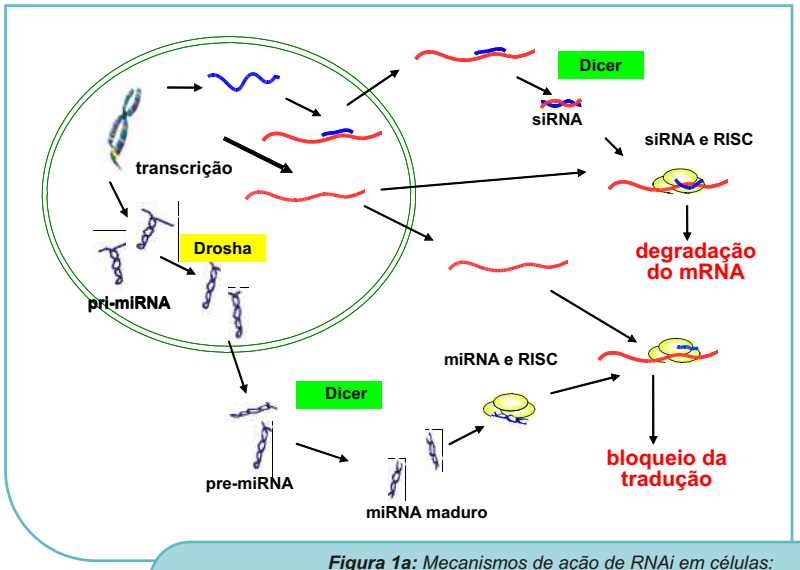

Figura 1a: *Mecanismos de ação de RNAi em células: São apresentados dois tipos de moléculas de RNAi endógenos: miRNA, que bloqueia tradução e siRNA que promove a degradação do mRNA;*

Pelo menos um terceiro mecanismo de silenciamento pode também ocorrer, ao nível transcricional. Nesse caso, foi demonstrado que duplexes de RNA tendo similaridade com promotores gênicos também pode resultar na metilação desse promotor ou mesmo remodelamento da cromatina, com conseqüente redução dos níveis de transcrição daquele gene (Morris et al, 2004).

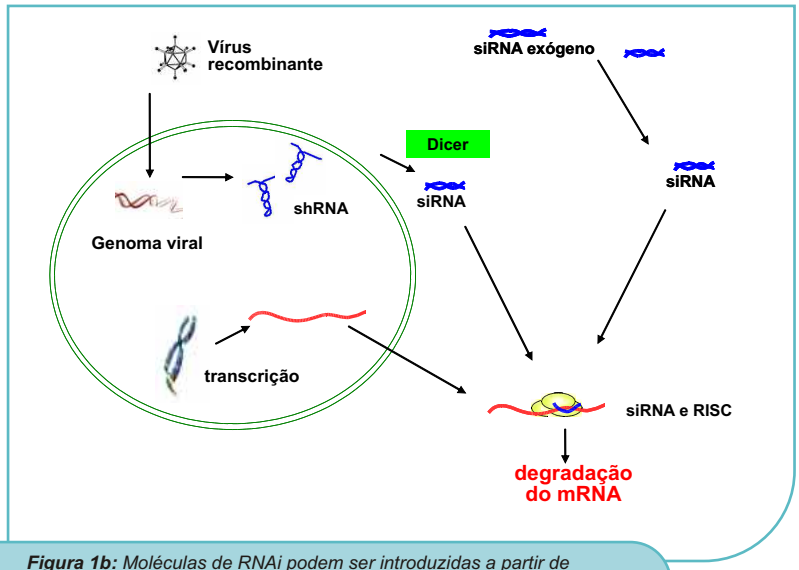

Figura 1b: *Moléculas de RNAi podem ser introduzidas a partir de vetores exógenos, seja através de vetores (em geral virais) recombinantes (que codificam shRNAs), ou então através de duplexes (siRNA) exógenos.*

Emprego do mecanismo de RNAi para estudos funcionais.

Além de ser uma descoberta que revolucionou a nossa forma de ver as células, o uso de RNAi como ferramenta para inibir a expressão de genes específicos também revolucionou nossa forma de determinar o papel de genes em células de vários organismos, incluindo humano. Para isso foram desenvolvidas várias estratégias que permitem a redução de expressão de genes específicos ("**knock-down**"), através de moléculas de RNAi complementares (figura 1B). Para células humanas, pode-se, por exemplo, transfectar pequenas moléculas de RNAdf (19 a 30 bp) diretamente nas células em cultura, visando a degradação específica de um gene. Essas moléculas, conhecidas como **siRNA** ("small interfering RNA"), precisam ter algumas características de seqüência particulares para serem ativas e o silenciamento de seu gene alvo possibilita a obtenção de várias informações da função exercida pela proteína que ele codifica na célula, através de uma abordagem genética simples. Atualmente, várias empresas de biotecnologia oferecem moléculas de siRNA, cujas seqüências são obtidas através de algoritmos

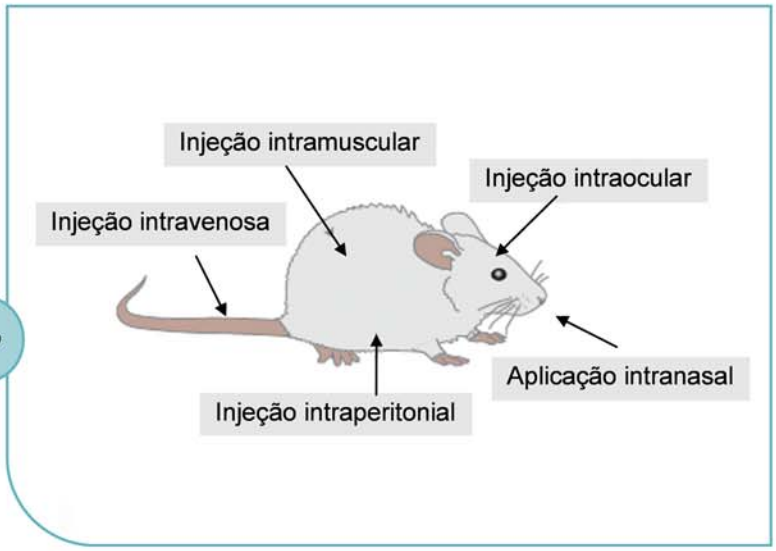

Figura 2: *Vias possíveis de introdução de moléculas de RNAi em animais, como protocolos pré-clínicos.*

próprios, para qualquer gene que o cliente pretenda silenciar. Outra característica importante é o tamanho da duplex que deve ter 19 a 30 pb, uma vez que tamanhos maiores podem induzir respostas interferon em células animais. Vários desses algoritmos são livres para uso ("free-ware") e podem ser acessados diretamente na internet. Para a maioria de genes humanos (e de alguns outros organismos), as empresas propõem 3 moléculas de siRNAs previamente desenhados, com garantia de que pelo menos dois desses podem reduzir em pelo menos 70% a expressão do gene alvo.

Alternativamente, vetores (em geral derivados de vírus como adenovírus, retrovírus ou vírus adeno-associados) podem ser transduzir genes que expressam uma molécula de RNA palindrômica, que pode gerar uma duplex de RNA na forma de grampo, conhecida como **shRNA** (do inglês "short hairpin RNA"). Como o siRNA, shRNA tem como objetivo o silenciamento do gene alvo em estudo. Essa estratégia apresenta como vantagens a possibilidade de uma eficiente transdução, pelo vírus, do gene de shRNA, e, no caso de retrovírus, a obtenção de linhagens celulares que apresentam o silenciamento do gene alvo de modo permanente.

É importante destacar que a maior parte dos genes identificados com o sequenciamento do genoma humano não apresenta função conhecida. Além disso, as estratégias de inativação gênica por nocaute ("knock-out") envolvem processos de recombinação homóloga, muito pouco eficientes em células de mamíferos, e praticamente impossíveis de serem realizadas em células humanas. Logo, o emprego dessas abordagens envolvendo os mecanismos de RNAi abriu perspectivas de se realizar estudos de genômica funcional para células humanas, nos quais podem ser obtidas, pelo menos teoricamente, informações sobre toda e qualquer sequência do genoma humano.

Interferindo na expressão gênica *in vivo*.

Em 2001, ao se anunciar pela primeira vez, com estardalhaço na mídia, a conclusão do sequenciamento do genoma humano, a expectativa de que a informação gerada fosse útil para cura de doenças de origem genética se espalhou rapidamente. Essa excitação rapidamente se transformou em frustração pela falta de resultados rápidos, o que era perfeitamente compreendido por aqueles que trabalharam no projeto genoma e que conheciam as limitações das informações geradas. Uma das razões para a demora na obtenção de resultados concretos em termos de produtos, que poderiam resultar em melhoria de saúde, foi a falta de ferramentas que nos permitissem intervir no genoma.

No entanto, uma luz parece ter surgido com a descoberta da ação de RNAi em células humanas e de outros mamíferos. Apesar, desta descoberta não datar mais do que 6 anos, muito rapidamente se mostrou que vetores virais ou pequenas moléculas de siRNA podem atuar diretamente *in vivo*, o que já resultou em mais de uma centena de trabalhos científicos publicados, no quais testes (a maior parte deles com resultados positivos) mostram o funcionamento de RNAi em experimentos com animais. Mesmo

Tabela 1: ALGUNS ALVOS PARA TERAPIA COM siRNA

Tipo de doença	Alvo	Rota de administração
Neovascularização ocular	VEGF	Intravítrea
Doenças respiratórias	Genes virais (RSV, Influenza)	Intranasal
Hepatites virais	Genes virais (HBV e HCV)	Intravenosa
Hipercolesterolemia	APOB	Intravenosa
Tumores em geral	Vários alvos, com foco em genes envolvidos em controle do ciclo celular	Intratumoral

que na maior parte das vezes sejam empregados camundongos, há vários casos de experimentos pré-clínicos com primatas não humanos (Zimmermann et al, 2006), e mesmo alguns Protocolos Clínicos em Fase I (de segurança no uso em humanos), alguns já concluídos, sem que se verificasse nenhum efeito tóxico. É possível que em mais dois ou três anos seja lançado o primeiro produto farmacológico formado apenas por uma pequena molécula duplex de RNA, que atue silenciando a expressão de um gene. Essa velocidade no desenvolvimento de um produto baseado em siRNA é espantosa e deve-se a vários fatores, incluindo os extensos trabalhos anteriores para terapia gênica e a alta eficiência dessas moléculas na modulação da expressão gênica. Entretanto, várias barreiras ainda têm que ser superadas, incluindo a informação recente de que a transdução de shRNA, através de vírus adeno-associados, resultou na morte hepática dos animais. Provavelmente, essa morte ocorreu devido a saturação do mecanismo de RNAi, interferindo com a exportação de miRNAs endógenos do núcleo para o citoplasma (Grim et al, 2006).

Desenvolvimento de Terapia por siRNA.

O primeiro desafio a ser vencido para o desenvolvimento desse tipo de terapia é a definição de um gene alvo. Vários são os problemas de saúde que resultam de expressão aumentada de um ou mais genes, entre eles, tumores, hipercolesterolemia, infecções virais, etc (Tabela 1). E estes têm sido extensivamente investigados em trabalhos com células e em animais. A seleção de duplexes que modulem especificamente o gene alvo pode ser trabalhosa, e, como foi dito acima, existem atualmente vários algoritmos que podem ser usados para obter várias sequências candidatas para cada gene. Essas sequências devem ser testadas em laboratório, preferencialmente através de culturas celulares. Um problema importante nessa escolha consiste na redução de expressão em genes diferentes do alvo (Jackson et al, 2003) em uma célula contendo siRNA, fenômeno este chamado de efeito "off-target". Aparentemente, este efeito ocorre pelo reconhecimento de sequências similares, mas não idênticas, ao alvo, que são encontradas na região 3' não traduzida de vários genes, através do mecanismo de miRNA. Várias são as abordagens para superar o problema de "off-target", sendo que a identificação de dois siRNA para um mesmo gene alvo pode assegurar que o gene é responsável pelo fenótipo celular observado.

Uma vez definida uma ou mais moléculas de duplexes de siRNA eficientes no silenciamento do gene alvo, o desafio é a forma de entrega dessas moléculas em um organismo. O uso de duplexes de RNA (siRNA) ou vetores virais (shRNA) deve ser escolhido dependendo do objetivo do trabalho. Moléculas pequenas e artificiais de siRNA estão se tornando cada vez mais populares pela versatilidade e facilidade com que se pode introduzi-las nas células e *in vivo*. Além disso, são consideradas como drogas pequenas e assim poderão ser usadas em pouco tempo como produtos farmacêuticos comuns, sem as questões de biossegurança normalmente levantadas para vetores virais. Questões como a instabilidade da molécula de siRNA (sobretudo *in vivo*) está sendo contornada através de modificações químicas que aumentam o tempo de ação, mantendo ou mesmo melhorando suas características farmaco-cinéticas, sem reduzir seu efeito no silenciamento gênico. Além disso, processos de entrega têm tido sucesso através do uso de vesículas de lipossomos e complexos com polissacarídeos, que além de aumentar a eficiência do processo de entrega do siRNA nos tecidos do animal, também garantem a estabilidade da molécula.

Principais alvos para terapia por RNAi: em busca do ouro.

Vários são os alvos já testados para estudos com siRNA em animais, e alguns são apresentados na tabela 1 (e ilustrado na figura 2). Um orgão que tem sido focado nesses estudos é o olho, e doenças genéticas associadas. A possibilidade de introdução localizada do siRNA diretamente por injeção ocular, reduzindo a necessidade de material (em relação a aplicações sistêmicas) favorece o desenvolvimento e sucesso desses estudos. Destacam-se processos de inibição do gene *VEGF* ("vascular endothelial growth factor"), que pode promover vascularização próxima a retina, o que está associado à doença de degeneração macular relacionada a idade (AMD, do inglês "age-related macular degeneration"), que provoca a perda de visão em milhões de idosos no mundo inteiro. Várias empresas farmacêuticas já concluíram testes pré-clínicos em animais e iniciaram protocolos clínicos Fase I com humanos, sendo que pelo menos alguns desses protocolos já concluíram essa Fase e está recrutando pacientes para Fase II.

A facilidade de introdução de moléculas de siRNA em pulmão, através de inalação com administração intranasal, também tem propiciado resultados promissores. Doses relativamente baixas de siRNA, com ou sem reagentes de transfecção como lipossomos, tem se mostrado eficientes na inativação de genes virais que provocam doenças respiratórias. Entre os vírus alvos desses experimentos de terapia, destacamos o vírus respiratório sincicial (RSV, que já está sendo testado em protocolo clínico em Fase I, pela empresa Alnylam Pharmaceuticals) e mesmo o vírus influenza H5N1, que provoca a temida gripe aviária.

Outros alvos incluem a redução da apoliproteína B (APOB) no fígado, o que em macacos resultou em significativa redução de colesterol no sangue. Vários vírus mortais como hepatite B, hepatite C, rotavírus e HIV (vírus da imunodeficiência humana, AIDS), também têm sido considerados excelentes alvos para terapia com siRNA. Esses resultados com vírus têm sido muito promissores,

porém pode haver problemas para o seu bom funcionamento. Isto porque o mecanismo de RNAi pode ser novo para nós, mas acredita-se que a origem desse mecanismo nas células ocorreu provavelmente a bilhões de anos, como uma estratégia de combate a infecções virais. Com isso, os vírus puderam, com o tempo, evoluir sistemas de defesa contra a maquinaria celular. Defato, vários exemplos já mostraram que os vírus como RSV, HIV e vaccinia têm mecanismos específicos para suprimir a maquinaria de RNAi celular e que existe, de fato, uma importante interface de relações patógeno-hospedeiro, nas quais as moléculas de miRNAs são efetores críticos (Barik e Bitko, 2006; Scaria et al, 2006).

A inibição da expressão de vários genes-alvo tem sido proposta como possível terapia para vários tipos diferentes de tumores. Os alvos para combate ao câncer envolvem uma grande quantidade de vias: oncogenes, mediadores de ciclo celular e apoptose, genes envolvidos em degradação e estabilidade proteica, angiogênese, moléculas relacionadas a invasão metastática e adesão celular. Além disso, siRNA também pode auxiliar no tratamento com radiação ionizante e agentes quimioterápicos. Nesse caso os alvos para silenciamento são genes que codificam proteínas anti-apoptóticas, de multi-resistência a drogas e mesmo envolvidas no reparo de DNA, pois estas atuam na defesa da célula aos agentes terapêuticos, que na maior parte das vezes atua causando lesões no genoma celular (Pai et al, 2005).

Conclusões

O avanço obtido em tão pouco tempo de pesquisa na área é impressionante, mesmo dentro da dinâmica ciência da Biologia. A forma como enxergamos a célula eucarionte mudou completamente nos últimos anos, e aparentemente estamos apenas iniciando nossas descobertas de como funcionam os mecanismos de RNAs regulatórios na célula. Por exemplo, recentemente foram divulgados dados que indicam que moléculas de dsRNA direcionadas a algumas regiões do promotor celular podem ativar genes e não silenciá-lo. Essas moléculas foram batizadas como **RNAa** ("RNA activators"), o que pode ampliar ainda mais a complexidade do sistema (Li et al, 2006). Além disso, apesar dos mecanismos de RNAi serem descritos apenas para eucariontes, recentemente foram propostos sistemas de RNAi similares para bactérias (Marakova et al, 2006).

Da mesma forma, o uso de mecanismos de RNAi para processos terapêuticos tem avançado muito rapidamente, mas ainda temos um longo caminho a percorrer. Durante a década de '80, artigos sobre Terapia Gênica anunciavam a 4a Revolução da Medicina. Apesar de alguns resultados positivos terem sido alcançados, as dificuldades encontradas e os problemas criados pela introdução de vírus recombinantes em organismos, infelizmente, não permitiram que essa revolução ocorresse como previsto. O conhecimento acumulado, no entanto serviu de base para a rápida obtenção de resultados promissores com RNAi. Além disso, o pequeno tamanho dessa molécula permite que seu tratamento seja similar ao dispensado a drogas farmacêuticas, normalmente usadas em processos terapêuticos. É possível que essa Revolução Médica esteja prestes a acontecer, finalmente (Dykxhoorn and Lieberman, 2006). Alguns sites de empresas que tem trabalhado com RNAi fazem grandes promessas ("RNAi pode auxiliar a combater toda e qualquer doença genética humana", www.sirna.com), chegando a propor o uso de siRNA para reduzir o crescimento de pêlos, em áreas em que isso for indesejado. Essa proposta, com o "knock-down" do gene "hairless" (cuja versão mutada foi identificada em famílias cujos afetados não apresentam pêlos), permite se antever um mercado bilionário, que visa um objetivo mais estético do que médico. Entretanto, a aplicação de terapia baseada na molécula de siRNA deve ser analisada com otimismo cauteloso, e ainda requer intenso trabalho de pesquisa, mesmo porque precisamos conhecer melhor o próprio mecanismo celular de RNAi.

Referências:

Barik S, Bitko V. Prospects of RNA interference therapy in respiratory viral diseases: update 2006. Expert Opin Biol Ther.2006 Nov;6(11):1151-60.

Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. Cell. 2006 Jul 28;126(2):231-5.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001 May 24;411(6836):494-8.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. Nature. 2006 May 25;441(7092):537-41.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. Nat Biotechnol. 2003 Jun;21(6):635-7. Epub 2003 May 18.

Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proc Natl Acad Sci U S A.2006 Nov 14;103(46):17337-42.

Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct. 2006 Mar 16;1:7.

Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. Science. 2004 Aug 27;305(5688):1289-92.

Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. Gene Ther. 2006 Mar;13(6):464-77.

Scaria V, Hariharan M, Maiti S, Pillai B, Brahmachari SK. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. Retrovirology. 2006 Oct11;3:68.

Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. Nature. 2006 May 4;441(7089):111-4.Epub 2006 Mar 26.