
Prêmio Nobel de Medicina

ATUALIZANDO O CÓDIGO GENÉTICO: O RNA DE INTERFERÊNCIA – UM COMENTÁRIO SOBRE O PRÊMIO NOBEL DE MEDICINA E FISIOLOGIA DE 2006

UPDATING THE GENETIC CODE: INTERFERENCE RNA – A COMMENT ON THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 2006

Ursula Matte¹, Fernanda Oliveira¹, Roberto Giugliani²

INTRODUÇÃO

O ácido ribonucleico (RNA) é geralmente conhecido como a molécula intermediária no processo de transmissão da informação genética codificada pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) e traduzida em proteínas pelo ribossomo. Esse processo de transferência da informação genética é conhecido como o dogma central da biologia molecular (figura 1). Entretanto, a função biológica do RNA é bastante mais complexa, e estudos realizados nos últimos 5 anos têm praticamente redefinido o papel do RNA na biologia molecular, ao revelarem seu papel no controle da expressão gênica. Essa descoberta é importante não só para o entendimento dos processos celulares em condições normais e patológicas, mas também por representar uma poderosa ferramenta para o estudo da função dos genes a partir de seu silenciamento, sendo uma alternativa potencial para o tratamento de diversas doenças.

Na década de 1980, foi demonstrado que a introdução de um RNA com orientação oposta ao RNA normal era capaz de diminuir os níveis da proteína codificada por aquele RNA (1,2). Esse mecanismo foi denominado de RNA anti-sentido (*antisense*, figura 2), e imaginava-se que a diminuição na síntese protéica decorresse do pareamento entre as duas fitas de RNA complementares, o que impediria sua ligação ao ribossomo. Essa técnica foi amplamente utilizada em modelos experimentais, sendo conhecida também como *knock-*

down, uma vez que a perda da expressão não era total como ocorre nos modelos *knock-out*. Em 1998, Mello & Fire descobriram um mecanismo muito mais específico e eficiente de silenciamento gênico: o RNA de interferência (RNAi) (3). Essa descoberta lhes valeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2006.

O que Mello & Fire observaram foi que a introdução de um RNA dupla fita na célula era capaz de praticamente eliminar a expressão da proteína codificada por aquele RNA, de maneira muito mais eficiente do que o RNA anti-sentido. Os experimentos descritos no artigo da revista *Nature* são extremamente elegantes e simples. Os autores compararam a diminuição da expressão de uma proteína no modelo animal *C. elegans* através da introdução de moléculas de RNA com sentido normal, anti-sentido ou dupla fita e verificaram que a dupla fita de RNA apresentava o melhor resultado. Além disso, testaram o ponto em que o mecanismo ocorria através da introdução de fitas duplas correspondentes a diferentes regiões do gene: promotor, íntron ou éxon. Se o silenciamento ocorresse apenas nos dois primeiros casos (promotor e íntron), isso significaria que ele tinha lugar no núcleo da célula. Ao contrário, foi observado que o silenciamento ocorria apenas quando o RNA de fita dupla inserido correspondia a regiões exônicas, o que significa que o mecanismo ocorre no citoplasma e é dirigido ao RNA maduro (sem íntrons). Dessa forma, os autores concluíram tratar-se de um mecanismo de

¹ Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

² Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, HCPA, Porto Alegre, RS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, UFRGS, Porto Alegre, RS. Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS.
Correspondência: Ursula Matte, Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas – HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-003, Porto Alegre, RS.

silenciamento pós-transcricional (3). Essa conclusão foi reafirmada em outro trabalho do mesmo grupo ainda em 1998 (4).

Os detalhes do processo pelo qual o silenciamento ocorre foram elucidados em pouco tempo (5,6) e envolvem uma série de enzimas capazes de reconhecer e clivar moléculas de RNA mensageiro. Inicialmente, uma enzima chamada *Dicer* reconhece e cliva moléculas de RNA de fita dupla em fragmen-

tos de cerca de 21 pares de bases. Em seguida, esses fragmentos são reconhecidos por um complexo enzimático chamado *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC), do qual fazem parte várias enzimas, entre elas a *Slicer*, uma proteína da família dos argonautas. O RISC liga-se a uma das fitas do RNA e percorre o citoplasma em busca de fragmentos complementares a essa região. Quando esses fragmentos são encontrados, eles se pareiam à região complementar, e o

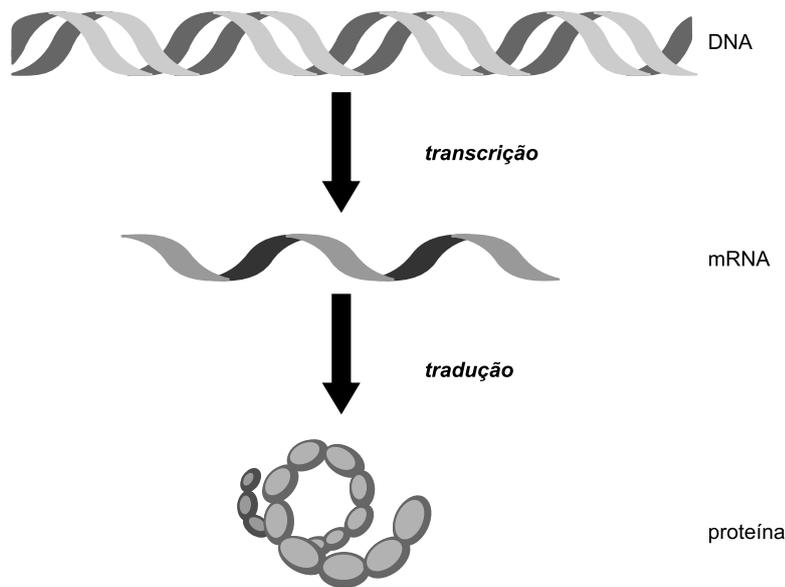


Figura 1. O dogma central da biologia molecular. Na verdade, uma supersimplificação dos processos envolvidos na transformação da informação genética codificada pelo DNA em uma proteína composta por aminoácidos.

DNA = ácido desoxirribonucléico; mRNA = ácido ribonucléico mensageiro.

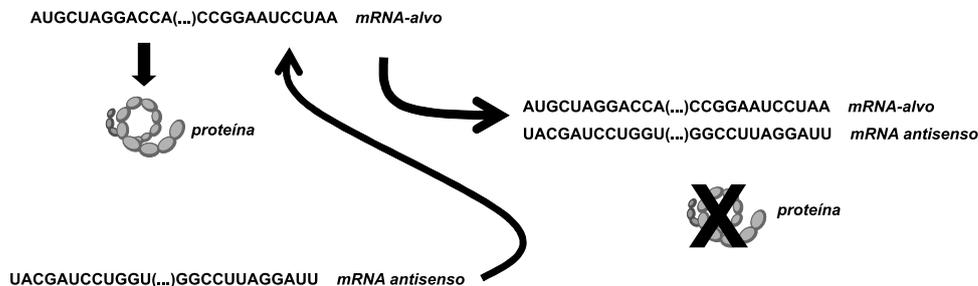


Figura 2. Mecanismo de ação do RNA antisense. A inibição da transcrição ocorre por pareamento, que explica a baixa eficiência do silenciamento (relação 1:1 entre mRNA-alvo e antisense). Nem todos os nucleotídeos do mRNA estão representados.

RNA = ácido ribonucléico; mRNA = ácido ribonucléico mensageiro.

RNA mensageiro é clivado, impedindo a sua tradução e, conseqüentemente, a formação da proteína (7,8). A figura 3 demonstra de forma esquemática o mecanismo de ação do RNAi.

Inicialmente, imaginou-se que esse mecanismo ocorresse apenas em condições experimentais, porém logo se descobriu tratar-se de um mecanismo natural e amplamente distribuído entre os diferentes organismos (mamíferos, insetos, plantas). Acredita-se que o papel da RISC e da *Dicer* seja o de proteção contra infecções virais, já que, normalmente, a presença de RNA dupla fita é um evento associado a certos tipos de vírus (9). Além disso, em 2001, descobriu-se que o mecanismo de RNAi faz parte do sistema de controle da expressão gênica de eucariotos através do microRNA (miRNA) (10,11). O miRNA é uma pequena molécula de RNA que forma uma alça de cerca de 21 nucleotídeos, que sofre a ação da *Dicer* e ligação ao RISC para silenciamento do RNA-alvo. Geralmente, um miRNA é capaz de silenciar mais de

um gene, e cada gene sofre a ação de vários miRNA. Atualmente, existem várias bases de dados de miRNA que estão disponíveis para consulta na internet (12). Mais recentemente, mecanismos semelhantes ao RNAi têm sido descritos como envolvidos na manutenção da condensação da heterocromatina presente em regiões não-transcritas do DNA (13,14) e também na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento (15).

De qualquer forma, o uso do RNAi como uma ferramenta de estudo tornou-se amplamente difundido. A figura 4 mostra o número de publicações no PubMed, por ano, pesquisadas com a palavra-chave *RNA interference*. O principal motivo é que os níveis de silenciamento alcançados com essa técnica chegam a mais de 90%, tornando possível a criação de linhagens celulares sem a expressão do gene de interesse de forma muito mais barata do que a partir da criação de animais *knock-out* por técnicas convencionais de interrupção gênica.

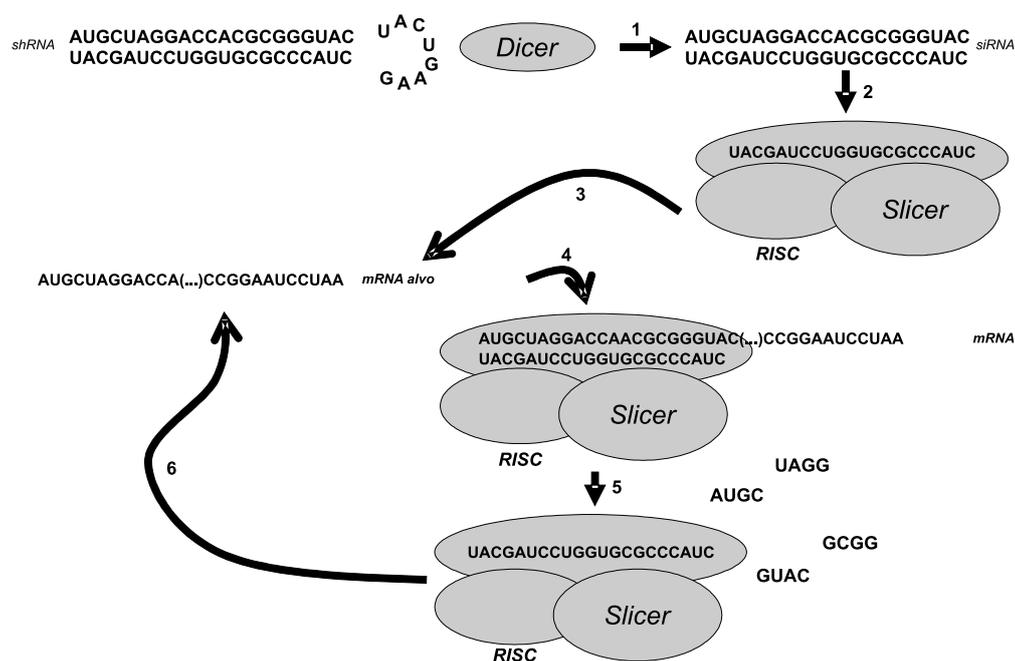


Figura 3. Mecanismo de ação do RNAi. Uma molécula de RNA dupla fita (no caso, um short hairpin RNA) inserida na célula é clivada pela enzima *Dicer* (1). Em seguida, uma das fitas liga-se ao RISC (2) e sai em busca de moléculas homólogas (3). Com a ligação do mRNA-alvo ao complexo (4), a *Slicer* cliva o mRNA-alvo, impedindo a sua tradução (5). O complexo permanece ativo e pode silenciar outras moléculas de mRNA-alvo (6). Note que o silenciamento também pode iniciar diretamente no passo 2, com a adição de siRNA.

RNA = ácido ribonucléico; RNAi = RNA de interferência; RISC = RNA-Induced Silencing Complex; mRNA = ácido ribonucléico mensageiro; siRNA = small interfering RNA.

Como um mesmo fragmento de RNA ligado ao RISC é capaz de silenciar várias moléculas de RNA mensageiro (mRNA), fica claro por que o silenciamento por RNAi é mais eficiente que o RNA anti-sentido. Porém, o que não é tão claro é como um fragmento de apenas 21 nucleotídeos pode ser específico no silenciamento de genes que, normalmente, possuem um mRNA de cerca de 3.000 nucleotídeos. Esse ponto ainda é controverso. Por um lado, vários estudos demonstram a especificidade do silenciamento, que pode chegar, inclusive, a discriminar duas moléculas de RNA-alvo que diferem por apenas um nucleotídeo (16). Por outro lado, existem vários estudos alertando para os efeitos indesejados do silenciamento gênico usando RNAi (17). É preciso deixar claro que esses estudos muitas vezes envolvem a administração de grandes quantidades de RNAi de forma sistêmica, e que os efeitos são observados em órgãos com alto grau de expressão gênica, como o fígado. Porém, em nível experimental, é muito mais comum a falha na seqüência desenhada do RNAi em silenciar o gene de interesse do que o inverso – a tal ponto que as empresas que vendem essas moléculas anunciam que, de cada três moléculas desenhadas, estima-se que apenas uma vá de fato funcionar.

Entre as estratégias para o uso de RNAi, está a administração direta de moléculas de RNA dupla fita de 21 pares de bases, os *short interfering RNA* (siRNA).

Essas moléculas não necessitam da presença da *Dicer* e ligam-se diretamente ao RISC, mas o silenciamento induzido é temporário. Outra estratégia é a administração de vetores que contenham a seqüência de interesse transcrita sob a forma de uma alça, ou *short hairpin RNA* (shRNA), semelhante aos miRNA. Nesse caso, o tempo de silenciamento é maior, podendo, inclusive, ser permanente se for usado um vetor adequado (18). Além disso, modificações nos vetores podem tornar a expressão do shRNA tecido-específico, o que aumenta ainda mais a especificidade e a segurança dessa terapia. Ao contrário do que ocorre em plantas, em mamíferos, a via de silenciamento não se autoperpetua e, portanto, só é ativa enquanto houver moléculas de RNA dupla fita presentes na célula (19).

Além de reformular o conceito do papel do RNA na fisiologia celular, a descoberta do RNAi modificou as possibilidades de estudo das funções dos genes *in vitro* e possibilitou uma nova área de atuação para a terapia gênica. Até então, terapia gênica era sinônimo de introdução de um gene funcional na célula. A partir da descoberta do RNAi, tornou-se possível também atuar de forma a silenciar a expressão de um gene, seja para fins de estudo, seja com fins terapêuticos. Além disso, por se tratar de um mecanismo pós-transcricional, não há alteração do genoma celular. Da mesma forma, todos os trabalhos que envolvessem a inibição da ação de uma proteína eram mediados pelo

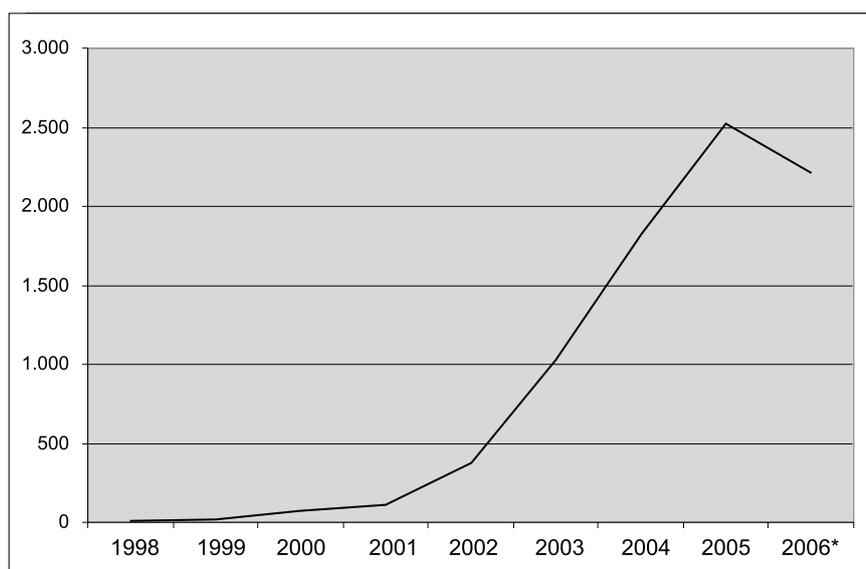


Figura 4. Número de publicações com a palavra-chave RNA interference disponíveis no PubMed por ano.

*Dados até outubro de 2006.

uso de anticorpos contra a proteína em questão ou contra os seus ligantes. Entretanto, a falta de especificidade tecidual do anticorpo acarreta uma série de efeitos colaterais. A partir do uso de RNAi, espera-se que seja possível uma administração e expressão localizada do RNA dupla fita para um silenciamento gênico tecido-específico.

Várias companhias já possuem produtos em fase de testes pré-clínicos, e pelo menos um produto já está em ensaio clínico de fase I. As doenças que são passíveis de tratamento por RNAi são aquelas que envolvem a expressão de um gene anormal, como o câncer, as infecções virais, certas doenças neurodegenerativas (como doença de Huntington e de Machado-Joseph), entre outras. Os principais alvos para uso clínico do RNAi, atualmente, concentram-se nas doenças virais, pois as seqüências-alvo são muito diferentes das seqüências do hospedeiro, diminuindo a possibilidade de efeitos indesejados (*off-target*) (20). Estudos *in vivo* em roedores têm demonstrado a possibilidade de uso dessa tecnologia em doenças como hepatite B (21), e um estudo em primatas não-humanos demonstrou a segurança e a eficácia do silenciamento do gene ApoB para redução nos níveis de colesterol e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (22).

No Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o Centro de Terapia Gênica possui um projeto em andamento para o uso de RNAi para o fator de transformação do crescimento- α 1 (TGF- α 1) em um modelo animal de fibrogênese hepática por ligadura de ducto biliar, em colaboração com o Laboratório de Hepatologia Experimental. O plasmídeo contendo a seqüência-alvo para TGF- α 1 encontra-se à disposição para uso de outros grupos de pesquisa interessados na aplicação dessa metodologia em diferentes modelos experimentais.

REFERÊNCIAS

- Mizuno T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (miRNA). *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81(7):1966-70.
- Nordström K, Wagner EG. Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem Sci*. 1994;19(7):294-300.
- 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;391(6669):806-11.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(26):15502-7.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev*. 1999;13(24):3191-7.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-6.
- Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 2004;431(7006):338-42.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431(7006):343-9.
- Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*. 2002;296(5571):1263-5.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001;294(5543):858-62.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294(5543):853-8.
- Sanger Institute. miRBase: the home of microRNA data. Disponível em: <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, et al. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol*. 2001;11(6):436-40.
- Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI. Establishment and maintenance of a heterochromatic domain. *Science*. 2002;297(5590):2232-7.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
- Miller VM, Xia H, Marrs GL, et al. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7195-200.
- Barik S. RNAi in moderation. *Nat Biotechnol*. 2006;24(7):796-7.
- Lu PY, Xie F, Woodle MC. *In vivo* application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet*. 2005;54:117-42.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*. 1999;286(5441):950-2.
- Uprichard SL. The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Lett*. 2005;579(26):5996-6007.

21. Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol.* 2005;23(8):1002-7.
22. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 2006;441(7089):111-4.