

Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas

Natália Regine de França¹, Danilo Mesquita Júnior², Amanda Bandeira Lima¹,
Fernando Vianna Cabral Pucci³, Luís Eduardo Coelho Andrade⁴, Neusa Pereira Silva⁵

RESUMO

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional conservado durante a evolução. Esse mecanismo, recentemente descrito, é mediado por pequenos RNAs de fita dupla (dsRNAs) capazes de reconhecer especificamente uma sequência de mRNA-alvo e mediar sua clivagem ou repressão traducional. O emprego da RNAi como uma ferramenta de terapia gênica tem sido muito estudado, especialmente em infecções virais, câncer, desordens genéticas herdadas, doenças cardiovasculares e mesmo em doenças reumáticas. Aliados aos dados do genoma humano, os conhecimentos do silenciamento gênico mediado por RNAi podem permitir a determinação funcional de praticamente qualquer gene expresso em uma célula e sua implicação para o funcionamento e homeostase celular. Vários estudos terapêuticos *in vitro* e *in vivo* em modelos de doenças autoimunes vêm sendo realizados com resultados encorajadores. As vias de quebra de tolerância e inflamação são alvos potenciais para terapia com RNAi em doenças inflamatórias e autoimunes. Nesta revisão vamos recordar os princípios básicos da RNAi e discutir os aspectos que levaram ao desenvolvimento de propostas terapêuticas baseadas em RNAi, começando pelos estudos *in vitro* de desenvolvimento de ferramentas e identificação de alvos, chegando até os estudos pré-clínicos de disponibilização da droga *in vivo*, e testes em células humanas e modelos animais de doenças autoimunes. Por fim, vamos revisar os últimos avanços da experiência clínica da terapia com RNAi.

Palavras-chave: RNA interferente pequeno, expressão gênica, autoimunidade, doenças reumáticas.

INTRODUÇÃO

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional (*post transcription gene silencing* - PTGS) atuando sobre o RNA mensageiro (mRNA). No foco deste mecanismo está uma molécula de fita dupla de RNA (dsRNA - *double stranded RNA*) que, ao ser incorporada na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no mRNA-alvo, ocasionando assim o silenciamento, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA. Há evidências de que dsRNAs estejam também envolvidos com a manutenção da condensação de regiões da cromatina e supressão da transcrição nas proximidades dessas

regiões, entretanto a associação entre o silenciamento transcricional (*transcription gene silencing* - TGS) e RNAi ainda não está completamente esclarecida. Em fungos, a deleção de genes relacionados à via de RNAi causa perda do silenciamento gênico e desestruturação da heterocromatina. Esse fenômeno ainda não é bem compreendido em nível molecular, mas parece ter grande importância para o funcionamento adequado de genes e para a manutenção da integridade genômica.¹

A RNAi foi descrita pela primeira vez em plantas (petúnias) no início da década de 1990.² Plantas transgênicas, superexpressando genes para produção de pigmentos, apresentavam flores brancas devido à inibição da síntese do pigmento por silenciamento do transgene e do gene endógeno. Esse fenômeno, conhecido como “cossupressão”, também foi observado

Submetido em 18/6/2010. Aprovado, após revisão, em 14/11/2010. Declaramos a inexistência de conflito de interesse. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

1. Pesquisadora pela UNIFESP; Mestranda em Reumatologia na UNIFESP

2. Mestre em Reumatologia pela UNIFESP; Doutoranda em Reumatologia na UNIFESP

3. Pesquisador e representante científico da EUROIMMUN

4. Professor Associado da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP; Assessor Médico do Setor de Imunologia Fleury Medicina Diagnóstica

5. Professor Associado da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP

Correspondência para: Neusa Pereira da Silva. Disciplina de Reumatologia - UNIFESP. Rua Botucatu, 740, 3º andar. São Paulo, SP. CEP 04023-069.

E-mail: npsilva@unifesp.br

em outras espécies de plantas, fungos e outros organismos, porém, o mecanismo que levava ao silenciamento gênico ainda era desconhecido.²⁻⁴

Em 2006, os pesquisadores norte-americanos, Andrew Z. Fire e Craig C. Mello foram contemplados com o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por sua participação na elucidação do silenciamento gênico por RNAi.⁵ O mecanismo de RNAi ocorre em vários organismos eucariotes^{6,7} e os dsRNAs envolvidos podem ser classificados de acordo com sua origem e função em pelo menos três categorias: miRNAs (microRNAs), siRNAs (*short interfering RNAs*) e shRNAs (*short hairpin RNAs*).⁸

Os miRNAs representam pequenos dsRNAs endógenos, com aproximadamente 22 nucleotídeos, cuja principal função é atuar como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução do mRNA-alvo em proteína. Sua descoberta data de pouco mais de uma década, em estudos realizados com *Caenorhabditis elegans*, e são hoje reconhecidos como reguladores fundamentais da expressão gênica em plantas e animais. Os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em um longo microRNA primário (pri-miRNA) que, ainda no núcleo, é clivado por um complexo proteico do qual fazem parte uma RNase III (Drosha) e a proteína Pasha ou DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein) que apresenta um domínio de ligação para dsRNA. A clivagem resulta no micro-RNA precursor (pré-miRNA), com cerca de 70 pares de bases, contendo um trecho de fita dupla e uma alça de fita simples, formando uma estrutura denominada *hairpin*. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5, onde é clivado pela Dicer, gerando um miRNA maduro com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. A Dicer é uma RNase III essencial no processo de RNAi. Apresenta um domínio de ligação ao RNA, PAZ, que parece ser responsável pelo tamanho do dsRNA gerado. Está também envolvida na incorporação de uma das fitas do miRNA a um complexo denominado RISC (RNA-Induced Silencing Complex) do qual faz parte juntamente com Argonauta (Ago2) e outras proteínas.⁹ O complexo RISC permite o pareamento entre a fita do miRNA incorporada e a região homóloga do mRNA-alvo por complementaridade de bases. Normalmente, quando a complementaridade é total, ocorre degradação do mRNA e, quando parcial, ocorre repressão da tradução e posterior degradação do mRNA (Figura 1).¹⁰

Argonautas são proteínas presentes no complexo RISC, caracterizadas pela presença de domínios conservados (PAZ e PIWI). Elas se ligam aos siRNA e miRNA, e apresentam atividade de endonuclease dirigida contra a fita de mRNA

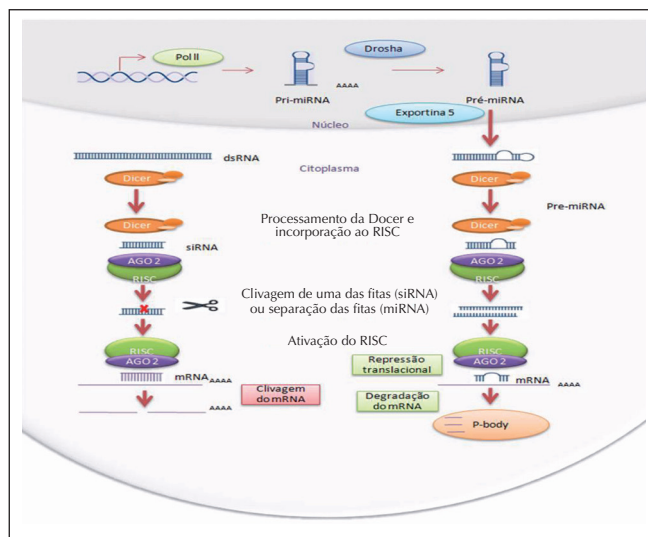


Figura 1. Esquema das vias que levam à interferência por microRNAs e siRNAs.

complementar ao siRNA ou miRNA. As proteínas argonautas são também responsáveis pela seleção da fita do siRNA, que será incorporada ao RISC.^{11,12}

Os shRNAs são RNAs de dupla fita construídos para apresentarem uma estrutura semelhante aos miRNAs. Podem ser sintetizados exogenamente e introduzidos prontos na célula ou transcritos dentro da célula a partir de vetores que codificam o shRNA junto a um promotor da RNA polimerase III. Nesse caso o transcrito é processado pela Dicer da mesma forma que os miRNAs.¹³

Os siRNA são moléculas sintéticas de dupla fita de RNA de 19 a 30 pb, que atuam por meio de pareamento a sequências complementares ao RNA mensageiro alvo, causando sua degradação e, portanto, silenciamento específico do gene. O silenciamento do gene-alvo possibilita a obtenção de informações sobre a função exercida na célula pela proteína que esse gene codifica.¹⁴

Recentemente tem sido demonstrada a existência de uma ligação entre RNAi e corpos GW (GWB),^{15,16,17} os quais parecem ser os sítios envolvidos na repressão da tradução de mRNAs por miRNAs. Os GWB (ou *P bodies*) são estruturas citoplasmáticas recentemente descritas que estão envolvidas no controle da expressão gênica pós-transcricional.¹⁸ Esse controle regula o *turnover* de mRNA bem como a remoção de RNAs aberrantes e com mutações *nonsense*. A formação dos GWB parece depender de proteínas específicas e RNA, em particular, miRNAs.¹⁵

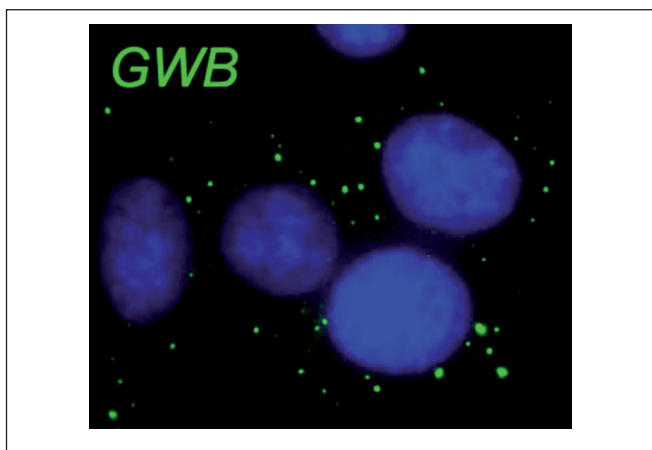


Figura 2. Imunofluorescência em células HEp-2, mostrando a presença de corpos GW (visualizados em verde) no citoplasma. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Fotomicrografia gentilmente cedida pelo Dr. EK Chan, Departamento de Biologia Oral, Universidade da Flórida, Gainesville, Estados Unidos.

Aspectos gerais relacionados à terapia empregando RNAi

O grande potencial de RNAi tem resultado em estratégias bem-sucedidas para o silenciamento de uma grande variedade de genes codificadores de proteínas, permitindo obter importantes informações sobre a função desses genes e respectivas proteínas. A alta especificidade desse método permite interferir com alelos relacionados com doença que diferem do alelo normal por apenas alguns poucos nucleotídeos. A RNAi é muito mais potente do que outras estratégias antisense que empregam fitas curtas de DNA antisense e ribozimas.¹⁹

A RNAi tem sido o método de escolha no silenciamento de genes em células de mamíferos por sua seletividade e potência. O emprego de RNAi como abordagem terapêutica tem sido considerado altamente promissor no combate a doenças em que a expressão anormal de certos genes pode ser identificada como a causa ou o fator contribuinte. Entre essas doenças podemos citar câncer, doenças genéticas dominantes, doenças autoimunes e infecções virais.²⁰

Há atualmente mais de uma dezena de companhias de biotecnologia dedicadas ao desenvolvimento de aplicações clínicas de siRNA em várias doenças humanas.²¹ A RNAi tem sido utilizada com sucesso em modelos experimentais no silenciamento de genes críticos para a viabilidade, proliferação e disseminação de células tumorais.^{22,26} Até o momento, porém, a maior contribuição da interferência por RNA tem

sido a revolução tecnológica introduzida no processo de descoberta de novas drogas. O uso de RNAi reduz o número de alvos potenciais permitindo centralizar esforços nos genes candidatos mais promissores.^{27,28} A RNAi tornou-se também uma poderosa ferramenta para a validação de alvos de drogas terapêuticas.

siRNAs e shRNAs

Há basicamente duas estratégias para se induzir RNAi. Na primeira, siRNAs pré-sintetizados são introduzidos nas células-alvo. Embora muitas estratégias empreguem siRNAs de 21-23 pares de base, siRNAs mais longos, com 27 nucleotídeos (nt), que são processados pela Dicer, são mais eficientes em promover o silenciamento. Esses siRNAs mais longos apresentam uma extremidade 3' com 2nt não pareados e uma extremidade cega (*blunt end*) permitindo que o processamento pela Dicer resulte em um único siRNA. Eventualmente, a extremidade cega pode ativar proteínas sinalizadoras e induzir a produção indesejada de interferon por vias de resposta ao estresse, entretanto, por ser mais potente, os siRNAs de 27nt podem ser usados em doses menores, evitando esse efeito.²⁹ Uma vez que o silenciamento obtido com siRNAs é transitório, novas estratégias foram desenvolvidas visando obter um silenciamento mais permanente.

A segunda estratégia se baseia na introdução de vetores que codificam o shRNA, o que resulta em silenciamento estável de longa duração na célula. A transcrição do shRNA é controlada por sequências promotoras para as RNA polimerases II ou III, dependendo do tipo de expressão desejada. Altos níveis de shRNAs são obtidos com promotores de RNA pol III. Já os shRNAs sob controle de promotores de RNA pol II são transcritos como precursores longos que mimetizam os pri-miRNAs, podem ser expressos especificamente em um dado tecido e, por serem efetivos em baixos níveis, evitam a saturação dos componentes da via de RNAi.^{20,29}

Seleção

Existem três atributos importantes que devem ser levados em consideração quando se deseja projetar e selecionar um siRNA. São eles: potência, especificidade e estabilidade às nucleases. O passo inicial para identificar siRNAs bons candidatos começa com um projeto de bioinformática. Diversos algoritmos têm sido desenvolvidos visando selecionar siRNAs com as características de especificidade e estabilidade desejadas e atualmente existem métodos *in vitro* para identificar rapidamente os candidatos capazes de silenciar um dado gene de interesse.³⁰ Ainda assim, os siRNAs devem ser avaliados experimentalmente para

determinar a eficácia do silenciamento e verificar ausência de efeitos indesejados, denominados efeitos fora do alvo (*off-target effect*).³¹

Potência

Os siRNAs podem ser desenhados para silenciar qualquer gene desejado, frequentemente com atividade *in vitro* em concentrações da ordem de nanomolar ou mais baixas. Embora o uso de algoritmos aumente a chance de identificação de siRNAs eficientes, algumas vezes falham em prever siRNAs potentes.³⁰ O uso de siRNAs um pouco mais longos, que necessitem ser processados pela Dicer antes de serem incorporados ao complexo RISC, parece resultar em maior eficiência. Entretanto, essas moléculas mais longas são mais difíceis de serem sintetizadas e têm maior probabilidade de ativar uma resposta imune indesejada.³¹

Especificidade

Um dos fatores críticos para o sucesso no uso de RNAi é a capacidade do siRNA em silenciar especificamente o mRNA-alvo. O silenciamento gênico mediado por siRNAs pode ser altamente específico, como evidenciado pelo silenciamento seletivo de alelos que divergem em um único nucleotídeo.³² No entanto, siRNAs também podem reconhecer e interferir com a expressão de mRNAs que apresentam homologia parcial com o mRNA-alvo. De fato, a avaliação da atividade transcricional *in vitro* tem mostrado que siRNAs podem alterar os níveis de mRNA de genes que não constituem o alvo desejado (efeitos fora do alvo) embora com menor intensidade.^{33,34} Um desenho criterioso da molécula de siRNA e a introdução de modificações químicas nos resíduos de ribose da fita guia podem reduzir ou evitar a maioria dos efeitos ditos fora-do-alvo sem afetar o desempenho do siRNA sobre o gene desejado.³⁵

Além disso, siRNAs podem eventualmente induzir efeitos indesejados por ativação de mecanismos da resposta imune inata usada na defesa viral. A ativação dos receptores *Toll-like* (TLR), especialmente TLR7 que reconhece dsRNA, é uma grande preocupação. A ativação desses receptores nas células dendríticas plasmocitoides resulta em produção de interferons tipo I e citocinas pró-inflamatórias.³⁶

Estabilidade

Moléculas de siRNAs desprotegidas são degradadas no plasma humano, com uma meia-vida de minutos.^{37,38} Para converter siRNAs em droga otimizada, modificações químicas capazes de prolongar a meia-vida da molécula sem comprometer sua atividade biológica têm sido investigadas detalhadamente.

Algumas modificações envolvem alterações no grupo fosfato da ligação entre os nucleotídeos, que conferem estabilidade frente à exonucleases e são bem toleradas.³⁷⁻⁴⁰ As modificações em resíduos de açúcar, como a metilação, que conferem resistência a endonucleases, embora em geral toleradas, dependem da localização dentro da molécula. Em geral, modificações em açúcares da fita senso são mais bem aceitas do que na fita guia, ou antisenso.^{21,41} As mudanças mínimas necessárias à estabilidade de um dado siRNA podem ser avaliadas pelo estudo de produtos de degradação do siRNA no plasma. Alguns grupos obtiveram melhora na estabilidade e eficiência de entrega *in vivo* complexando siRNA com colesterol,⁴² atelocolágeno⁴³ e polietilenimina.⁴⁴

Introdução de siRNAs *in vivo*

O principal obstáculo ao uso de siRNAs como drogas terapêuticas é obter sua penetração na célula através da membrana citoplasmática, de modo a ser incorporado na via de RNAi e causar a degradação do mRNA-alvo no tecido de interesse. Na ausência de agentes de transfecção ou alta pressão, a maioria das células não incorpora siRNA.^{45,46}

O siRNA, por sua carga negativa, não penetra com facilidade através das membranas celulares hidrofóbicas.^{20,47} Entretanto, silenciamento *in vivo* tem sido relatado após administração direta de siRNAs desprotegido (*naked*) a locais anatomicamente isolados (intravítreo, intranasal e intratecal), demonstrando a possibilidade de entrega de siRNAs em olhos, pulmão e sistema nervoso central.⁴⁸⁻⁵¹ Entretanto, o emprego terapêutico de RNAi de modo mais amplo depende da possibilidade de associar às moléculas de siRNA outras propriedades farmacológicas como biodisponibilidade e seletividade para as células-alvo.^{31,42}

Diversas estratégias empregam injeção endovenosa de siRNAs quimicamente modificados, mediante conjugação ao colesterol, ou protegidos dentro de lipossomas catiônicos. A conjugação ao colesterol tem mostrado bons resultados, pois prolonga a meia-vida dos siRNA na circulação por meio de ligação a lipoproteínas, que são resistentes à filtração pelos rins e oferecem também proteção à ação das nucleases plasmáticas. Embora eficaz, a conjugação ao colesterol não é um método seletivo, pois o complexo colesterol-siRNA-lipoproteína pode ser endocitado por receptores de colesterol encontrados em todos os tipos celulares.²⁰ A ligação de siRNAs a lipossomas catiônicos, que também vem sendo amplamente estudada, melhora a farmacocinética e diminui a toxicidade dos siRNAs, embora resulte também em amplo espectro de ação celular.³¹

Mecanismos seletivos de entrega de siRNA a células e tecidos estão sendo intensamente estudados. Uma possibilidade é a ligação de siRNAs a aptâmeros que se ligam a receptores celulares específicos. Aptâmeros são moléculas RNA ou DNA, capazes de se ligarem com alta afinidade a íons, oligossacarídeos e uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas como trombina, L-selectina, P-selectina, vasopressina. Além de apresentarem alta afinidade e especificidade pelos seus ligantes, os aptâmeros podem ser sintetizados quimicamente, sendo, portanto bastante atraentes para uso terapêutico, em que o controle de qualidade é crítico.⁵²

Recentemente foi relatada a introdução célula-específica de siRNAs empregando o siRNA ligado a uma proteína de fusão Fab de imunoglobulina-protamina. A ligação do siRNA é mediada pela interação com a porção protamina e a especificidade celular é dependente da porção Fab da molécula de anticorpo.⁴⁵ A entrega a células específicas facilita a incorporação do siRNA por endocitose. Os sistemas seletivos de entrega para receptores específicos de superfície celular são vantajosos pela necessidade de menor dose e redução de efeitos fora do alvo.

Diversos grupos têm estudado o uso de vetores virais para a introdução de shRNAs em organismos.^{53,54} Entretanto, o uso de vetores virais ainda é questionado quanto à segurança para emprego terapêutico.⁵⁵

Estudos pré-clínicos com RNAi em doenças reumáticas autoimunes

As últimas três décadas foram marcadas por rápidos avanços nas técnicas de biologia molecular, que hoje estão amplamente disponíveis para rotina dos grupos de pesquisa no mundo todo.

Exemplos eloquentes incluem a técnica de *microarray* e os métodos de silenciamento gênico como os pequenos RNAs de interferência (siRNA) e a transfecção celular com construtos antissenso. Para os grupos de pesquisa interessados no estudo da patogênese de doenças, essas novas técnicas permitem um rápido *screening* de genes que estão diferencialmente expressos na saúde e na doença e que provavelmente estão implicados no desenvolvimento e progressão da doença.⁵⁶ Neste contexto, têm sido realizado inúmeros progressos na compreensão da fisiopatologia das doenças do tecido conjuntivo. As doenças do tecido conjuntivo compreendem um amplo espectro de desordens nas quais a fisiopatologia e apresentação clínica são bastante diversas. Entretanto o descobrimento de mecanismos e moléculas-chave implicados na patogênese das mesmas tem aumentado significativamente as opções de tratamento para suas complicações órgão-específicas ou sistêmicas. Enquanto as terapias não seletivas convencionais ainda têm importância

na vida clínica cotidiana, a maioria dos novos agentes desenvolvidos visa a moléculas específicas ou a mecanismos que apresentam papel funcional na patogênese da doença sistêmica ou manifestações órgão-específicas. Muitas citocinas, quimioquinas, fatores de transcrição, moléculas expressas na superfície de células do sistema imune (CDs, moléculas de adesão) têm sido alvo de estudos para terapia molecular com RNAi.

Na osteoartrite (OA), várias citocinas e enzimas têm sido associadas ao dano articular e, nos últimos anos, terapias gênicas visando citocinas e/ou vias de sinalização ativadas em processos inflamatórios, trouxeram novas esperanças no seu tratamento. A IL-1 e o TNF- α são considerados as principais citocinas inflamatórias participantes nesta enfermidade,⁵⁷ sendo assim potenciais alvos para terapia em OA. O NF- κ B é um dos principais fatores de transcrição relacionado à via inflamatória e vários métodos têm sido usados para inibir a indução de NF- κ B, como o uso de oligonucleotídeos antissenso⁵⁸ e construtos adenovirais de I κ B mutado.⁵⁹ Recentemente, um estudo em modelo animal de OA mostrou a eficácia do siRNA específico para subunidade p65 do NF- κ B.⁶⁰ A interferência por RNA foi capaz de inibir a expressão de vários genes relacionados à via de sinalização do NF- κ B, tais como os genes da ciclooxigenase-2 (COX-2), da óxido nítrico sintetase-2 (NOS-2) e da metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9). Esses mediadores estão associados ao início e à progressão da lesão articular em modelo de osteoartrite e são induzidos em condrócitos expostos a IL-1 e TNF- α . Esses resultados demonstram que o siRNA específico para NF- κ B p65 é um potencial candidato na terapia gênica preventiva para OA em estágios precoces.

A possibilidade de inibir a atividade de NF- κ B torna-se ainda mais interessante quando seu potencial de ação sobre ativação de células do sistema imune é analisado mais amplamente, como em alguns protocolos que visam inibir a maturação de células dendríticas e assim restabelecer a tolerância imunológica. A companhia de biotecnologia canadense *Tolerothech Inc.* tem explorado o uso de siRNA em estudos pré-clínicos para silenciar a via inflamatória Th1. Essa companhia desenvolveu o fármaco ToleroVaxT que é um siRNA específico para subunidade p35 da IL-12. Seu uso induz desvio imune de uma resposta Th1 para uma resposta Th2 com elevados níveis de IL-4 e IL-10 e baixa produção de INF- γ . Com essa ferramenta tem sido possível inibir a atividade aloestimulatória de DCs (células dendríticas) em culturas mistas de leucócitos.⁶¹

A senescência dos condrócitos também tem sido alvo de estudos com siRNA, uma vez que a idade é considerada outro fator de risco para desenvolvimento de OA, por sua correlação com a queda na síntese de matriz extracelular pelos condrócitos que também apresentam menor responsividade aos fatores

de crescimento. A proteína p16^{INK4a} tem um papel importante no controle do ciclo celular e senescência, atuando como um competidor de ciclinas que controlam a saída da célula da fase G1 e levando à senescência. Em pacientes com OA há uma alta expressão de p16^{INK4a} e o silenciamento desta proteína *in vitro* em condrócitos de pacientes com OA levou a uma alteração de suas características senescentes, ao aumento na expressão de alguns genes específicos de condrócitos e a melhora geral em sua capacidade de reparo. A inibição da p16^{INK4a} por RNAi pode ser uma estratégia terapêutica explorada para o bloqueio da senescência articular de condrócitos relevante à prevenção e ao tratamento de OA.⁶²

Estratégias terapêuticas com siRNA também têm sido alvo de estudos *in vitro* com sinoviócitos de pacientes com artrite reumatoide (AR). Na AR, um dos mecanismos que provocam degradação articular é a presença de células sinoviais anormalmente resistentes à apoptose, que produzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases. A indução de apoptose é uma propriedade comum dos receptores de morte, a maioria dos quais pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF). Um desses receptores é o ligante indutor de apoptose ligado ao TNF (TRAIL). Entretanto, alguns dos receptores tipo TRAIL, como o TRAIL 4, possuem atividade antiapoptótica. No estudo de Terzioglu *et al.* (2007) observou-se que a terapia gênica utilizando siRNA específico para TRAIL 4 combinado com a transfecção de TRAILS pró-apoptóticos eliminou os sinoviócitos resistentes à apoptose. O equilíbrio da expressão desses receptores pode ser uma nova estratégia de terapia gênica para sensibilizar os sinoviócitos de pacientes com AR à apoptose.⁶³ Em modelos animais de artrite induzida por colágeno, alguns estudos com siRNA visando o silenciamento do TNF- α estão sendo realizados. Algumas formas de entrega de siRNA estão sendo testadas, como a entrega direta do siRNA no tecido articular por eletroporação ou a entrega sistêmica de siRNA usando lipossomo como carreador. Ambos os estudos vêm apresentando bons resultados, diminuindo significativamente a inflamação articular.^{64,65}

No contexto de doenças do espectro do lúpus eritematoso sistêmico (LES), estudos em modelos animais têm demonstrado o potencial da terapia por RNAi. Camundongos homocigotos para mutação do gene que codifica a proteína Roquin apresentam grande aumento na expressão do receptor co-estimulatório induzível de células T (ICOS), com consequente acúmulo de linfócitos e desenvolvimento de síndrome semelhante ao LES.⁶⁶ A proteína Roquin contém domínios de ligação ao RNA e pode ser observada associada aos grânulos de estresse e aos GWB. Esta estreita associação leva ao questionamento sobre a possibilidade de Roquin ser capaz de

direcionar certos mRNAs para rota de decaimento por miRNA nos *GW-bodies*. O miR-101 é um componente-chave na repressão da expressão de ICOS e a expressão de miR-101 foi capaz de reduzir os níveis deste receptor co-estimulatório. Acredita-se que, devido à mutação na proteína Roquin nos camundongos, o mRNA de ICOS não seja corretamente endereçado aos GWB impedindo que haja o controle de sua expressão pelo miR-101.⁶⁶ Existem muitos estudos mostrando a importância de proteínas capazes de regular a repressão mediada por miRNA direcionando a localização do mRNA-alvo para os GWB. De maneira interessante, tem sido descrito um grande número de autoanticorpos contra componentes chaves da maquinaria de interferência por RNA, tanto em camundongos quanto em humanos,⁶⁷ inclusive contra proteínas Argonautas e Dicer.⁶⁸

Em doenças autoimunes com manifestações clínicas de fibrose, como a esclerose sistêmica, o TGF- β 1 é um potencial alvo para prevenção e tratamento. Uma vez que esta citocina apresenta um papel importante na fisiopatologia da fibrose em várias doenças, a utilização de RNAi visando esta molécula poderá prevenir o desenvolvimento de fibrose ou até mesmo trazer melhora do quadro, como observado no estudo de Takabatake *et al.* (2005) em modelo animal de glomerulonefrite. Neste estudo a utilização de siRNA contra TGF- β 1 levou a uma melhora significativa no quadro de progressão da expansão de matriz fibrótica.⁶⁹

A análise do perfil de expressão de miRNAs também tem se mostrado uma ferramenta útil na investigação dos mecanismos genéticos envolvidos na predisposição e patogênese de doenças humanas, uma vez que os mesmos possuem um papel essencial na embriogênese e diferenciação celular. Korolov *et al.* (2008) mostraram um papel relevante de miRNAs nos estágios iniciais do desenvolvimento de células B em modelo experimental de knockout condicional de Dicer.⁷⁰ Dai *et al.* (2008) estudaram o perfil de expressão de miRNAs em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e identificaram 16 miRNAs diferencialmente expressos no grupo LES quando comparado a controles normais,⁷¹ indicando que a avaliação de miRNAs é uma ferramenta potencialmente útil como biomarcador de prováveis fatores envolvidos na patogênese de doenças reumáticas autoimunes.

Perspectivas

Mesmo que a terapia com RNAi esteja associada a um tratamento com alto grau de especificidade, achados recentes sugerem que os efeitos fora do alvo e outras potenciais complicações podem ser observadas. Alguns siRNA podem induzir a supressão pós-traducional de produtos gênicos não

desejados, assim como observado pela atividade dos miRNAs, que podem ser capazes de atuar sobre diferentes produtos gênicos. Esse efeito inibitório não específico ocorre quando o siRNA é utilizado em baixas concentrações e apresenta complementaridade parcial com o gene-alvo. O desenvolvimento de um siRNA com uma simples alteração, que levará a um pareamento parcial, poderá não só reduzir sua eficiência de silenciamento, como aumentar a chance de pareamento com transcritos cujo silenciamento não é desejado e que contenham regiões de complementaridade parcial. Outros efeitos não específicos dos siRNAs também têm sido observados. Por exemplo, vias alternativas de resposta celular contra dsRNA podem ser ativadas, resultando na ativação e no aumento na expressão de genes tipicamente associados a resposta imune inata, incluindo genes para expressão de Interferons de tipo I (INF).³⁶ Além disso, os receptores tipo *Toll-like* (TLRs), como TLR7 e TLR8, podem reconhecer certas sequências de siRNA e induzir resposta imune com produção de INFs.³⁶ Mais estudos ainda serão necessários para investigar a frequência de reconhecimento inespecífico e os efeitos adversos do uso de RNAi e shRNA, bem como identificar as sequências

estruturais responsáveis por desencadear tais processos. Táticas potenciais para reduzir os efeitos de indução de INF ou ativação dos TLRs incluem o desenvolvimento de algoritmos para o desenho de siRNAs e modificações químicas capazes de diminuir sua imunogenicidade e aumentar sua vida útil, evitando sua degradação por RNases do organismo. Outra possibilidade que deve ser investigada rigorosamente está relacionada a sua segurança em relação à possibilidade de induzir mutagênese insercional e transformação maligna, ou a possibilidade do organismo desenvolver respostas imunes contra as proteínas dos vetores virais utilizados para transfecção em alguns modelos de terapia.³⁴ De maneira geral, a utilização de RNAi como estratégia terapêutica é uma alternativa atraente e potencialmente promissora. Os resultados em modelos experimentais de doença autoimunes e estudos *in vitro* com células humanas vêm trazendo resultados encorajadores, mas uma futura aplicação clínica desse modelo terapêutico ainda requer vigorosas investigações referentes à sua eficácia, seletividade, desenvolvimento de estratégias para evitar efeitos fora do alvo e otimização dos sistemas de entrega dos siRNAs.

REFERÊNCIAS

REFERENCES

1. Petersen CP, Doench JG, Grishok A, Sharp, PA. The biology of short RNAs. *In: The RNA World*, 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; 2005.
2. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell* 1990; 2:279-89.
3. Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G. Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *Embo J* 1996; 15(12):3153-63.
4. Cogoni C, Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10(6):638-43.
5. 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; 391:806-11.
6. Tijsterman M, Ketting RF, Plasterk RH. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 2002; 36:489-519.
7. Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 2004; 6:509-19.
8. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431:343-9.
9. Ricarte Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(6):1102-7.

10. Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ *et al.* Purified Argonaute2 and a siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(4):340-9.
11. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 2005; 123(4):621-9.
12. Höck J, Meister G. The Argonaute protein family. *Genome Biol* 2008; 9(2):210.
13. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Dev* 2002; 16:948-58.
14. Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells. *Science* 2004; 305(5688):1289-92.
15. Jakymiw A, Pauley KM, Li S, Ikeda K, Lian S, Eystathioy T *et al.* The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci* 2007; 120:1317-23.
16. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature Cell Biology* 2005; 7:1261-6.
17. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology* 2005; 7:633-6.
18. Eystathion T, Chan EKL, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzier MJ. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 2002; 13(4):1338-51.
19. Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(4):1000-4.
20. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi Therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(2-3):75-86.
21. Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 2005; 107:222-39.
22. Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3667-77.
23. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(13):3799-804.
24. Li K, Lin SY, Brunicaudi FC, Seu P. Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(13):3593-7.
25. Li LP, Liang NC, Luo CQ. Construction of survivin siRNA expression vector and its regulation on cell cycle and proliferation in MCF-7 cells. *Ai Zheng* 2004; 23(7):742-8.
26. Salvi A, Arici B, De Petro G, Barlati S. Small interfering RNA urokinase silencing inhibits invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(6):671-8.
27. Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 2004; 351:1772-7.
28. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418(6894): 244-51.
29. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Rev Genet* 2007; 8:173-84.
30. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22(3):326-30.
31. Fougerolles A, Vornlocher HP, Maraganore J, Lieberman J. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6:443-53.
32. Schwarz DS, Ding H, Kennington L, Moore JT, Schelter J, Burchard J *et al.* Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide. *Plos Genetics* 2006; 2:1307-18.
33. Lin X, Ruan X, Anderson MG, McDowell JA, Kroeger PE, Fesik SW *et al.* siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:4527-35.
34. Qiu S, Adema CM, Lane T. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:1834-47.
35. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, *et al.* Position-specific chemical modification of siRNAs reduces off-target transcript silencing. *RNA* 2006; 12:1197-205.
36. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S *et al.* Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11:263-70.
37. Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* 2004; 10:766-71.
38. Choung S, Kim YJ, Kim S, Park HO, Choi YC. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342:919-27.
39. Hall AHS, Wan J, Shaughnessy EE, Shaw BR, Alexander KA. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(20):5991-6000.
40. Allerson CR, Sioufi N, Jarres R, Prakash TP, Naik N, Berdeja A *et al.* Fully 2'-modified oligonucleotide duplexes with improved *in vitro* potency and stability compared to unmodified small interfering RNA. *J Med Chem* 2005; 48:901-4.
41. Fougerolles A, Manoharan M, Meyers R, Vornlocher HP. RNA interference *in vivo*: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics. *Methods Enzymol* 2005; 392:278-96.
42. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432:173-8.
43. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M *et al.* Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(13):e109.
44. Urban-Klein, B, Werth S, Abuharbeid S, Czubayko F, Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*. *Gene Ther* 2005; 12(5):461-6.
45. Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM *et al.* Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nature Biotechnol* 2005; 23:709-17.
46. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K *et al.* Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* 2006; 12:1188-96.

47. Juliano RL. Peptide-oligonucleotide conjugates for the delivery of antisense and siRNA. *Curr Opin Mol Ther* 2005; 7:132-6.
48. Reich SJ, Fosnot J, Kuroki A, Tang W, Yang X, Maguire AM *et al*. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol Vision* 2003; 9:210-6.
49. Tolentino MJ, Brucker AJ, Fosnot J, Ying GS, Wu IH, Malik G *et al*. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor small interfering RNA inhibits growth and leakage in a nonhuman primate, laser-induced model of choroidal neovascularization. *Retina* 2004; 24:132-8.
50. Shen J, Samul R, Silva RL, Akiyama H, Liu H, Saishin Y *et al*. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006; 13:225-34.
51. Nakamura H, Siddiqui SS, Shen X, Malik AB, Pulido JS, Kumar NM *et al*. RNA interference targeting transforming growth factor- β type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol Vision* 2004; 10:703-11.
52. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* 2005; 56:555-83.
53. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ *et al*. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004; 10(8):816-20.
54. Banerjee A, Li MJ, Bauer G, Remling L, Remling L, Lee NS, Rossi J *et al*. Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced SiRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-Hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 2003; 8(1):62-71.
55. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P *et al*. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302(5644):415-9.
56. Kramer R, Cohen D. Functional genomics to new drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 965-72.
57. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25(4):254-72.
58. Autieri MV, Yue TL, Ferstein GZ, Ohlstein E. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213(3):827-36.
59. Tak PP, Gerlag DM, Aupperle KR, van de Geest DA, Overbeek M, Bennett BL *et al*. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase beta is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1897-907.
60. Lianxu D, Hongti J, Changlong Y. NF- κ Bp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1 β -induced and TNF- α -induced chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14:367-76.
61. Hill JA, Ichim TE, Kusznierek KP, Li M, Huang X, Yan X *et al*. Immune modulation by silencing IL-12 production in dendritic cells using small interfering RNA. *J Immunol* 2003; 171:691-6.
62. Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16^{INK4a} - specific siRNA *in vitro*. *Rheumatology* 2004; 43:555-568.
63. Terzioglu E, Bisgin A, Sanlioglu AD, Ulker M, Yazisiz V, Tuzuner S *et al*. Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synovial cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2007; 46:783-9.
64. Schiffelers RM, Xu J, Storm G, Woodle MC, Scaria PV. Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1314-8.
65. Khoury M, Louis-Plence P, Escriou V, Noel D, Largeau C, Cantos C *et al*. Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1867-77.
66. Yu D, Tan AHM, Hu X, Athanasopoulos V, Simpson N, Silva DG, Hutloff A *et al*. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* 2007; 450:299-304.
67. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 2006; 125:1111-24.
68. Jakymiw A, Ikeda K, Fritzer MJ, Reeves WH, Satoh M, Chan EKL. Autoimmune targeting of key components of RNA interference. *Arthritis Res* 2006; 8(4):R87.
69. Takabatake Y, Isaka Y, Mizui M, Kawachi H, Shimizu F, Ito T *et al*. Exploring RNA interference as a therapeutic strategy for renal disease. *Gene Ther* 2005; 12:965-73.
70. Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborty T, Kanellopoulou C *et al*. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 2008; 132:860-74.
71. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH *et al*. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2007; 16(12):939-46.