

Ana Rita Macário Ribeiro

# Estratégias de Silenciamento Génico em Doenças Neurodegenerativas

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rita Macário Ribeiro

# Estratégias de Silenciamento Génico em Doenças Neurodegenerativas

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Sérgio Paulo Magalhães Simões e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Rita Macário Ribeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010129307, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Setembro de 2015.

---

(Ana Rita Macário Ribeiro)

## **AGRADECIMENTOS**

**É com grande satisfação que termino mais uma fase do meu percurso, e é com a maior sinceridade e gratidão que dirijo os meus mais profundos agradecimentos a todos os que o tornaram possível:**

Ao Professor Doutor Sérgio Simões, pelos conhecimentos transmitidos no campo da Biotecnologia, que me permitiram ter novas perspetivas relativamente ao desenvolvimento de terapêuticas inovadoras, e pela orientação na realização deste projeto.

A todos os professores, pelos seus ensinamentos partilhados ao longo de cinco anos de curso.

Aos meus amigos, pela força e motivação constantes, pelas aventuras passadas e pelas futuras, pela amizade de sempre.

Ao meu irmão, o meu cúmplice de todas as horas, o meu amigo em cada momento, o meu companheiro de sempre e para sempre.

Aos meus pais, pela dedicação infinita, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos que levo para a vida. Cada vitória no meu percurso será sempre dedicada a vocês.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
ABSTRACT .....	4
RESUMO.....	4
1. TERAPIA GÉNICA.....	5
2. SILENCIAMENTO DE GENES.....	5
3. iRNA.....	5
3.1. miRNA.....	7
3.2. siRNA .....	8
4. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	10
5. iRNA E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	10
5.1. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS.....	11
5.2. DESAFIOS DAS TECNOLOGIAS BASEADAS EM iRNA.....	12
5.2.1. TRANSPORTE.....	12
5.2.2. EFEITOS <i>OFF-TARGET</i> .....	13
5.2.3. EFEITO IMUNOGÉNICO.....	13
5.2.4. SATURAÇÃO DA MAQUINARIA CELULAR.....	14
6. PERSPETIVA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA .....	14
7. ALZHEIMER.....	16
7.1. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO SOCIOECONÓMICO.....	16
7.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	16
7.3. FISIOPATOLOGIA.....	17
7.4. TERAPÊUTICAS BASEADAS EM iRNA.....	18
7.4.1. miRNA .....	19
7.4.2. siRNA.....	19
8. PARKINSON.....	20
8.1. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO SOCIOECONÓMICO.....	20
8.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	21
8.3. FISIOPATOLOGIA.....	21
8.4. TERAPÊUTICAS BASEADAS EM iRNA.....	21

8.4.1. miRNA .....	22
8.4.2. siRNA.....	23
CONCLUSÃO .....	23
BIBLIOGRAFIA .....	25
ANEXO .....	30

## ABREVIATURAS

**A $\beta$**  – beta-amilóide

**APOE** – Apolipoproteína E

**APP** – *Amiloid Precursor Protein*

**BACE1** –  $\beta$ -secretase cleaving enzyme

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**dsRNA** – *double stranded RNA*

**FAD** – *Familial Alzheimer Disease*

**FGF20** – *Fibroblast Growth Factor 20*

**iRNA** – *interference RNA*

**LRRK2**– *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*

**miRNA** – microRNA

**ncRNA** – *non-coding RNA*

**NMDA** – N-metil-D-aspartato

**Pitx3** – *Pituitary Homebox 3*

**PS1** – *Presenilin 1*

**PS2** – *Presenilin 2*

**RISC** – *RNA-Induced Silencing Complex*

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RNAm** – RNA mensageiro

**RNAse** – Ribonuclease

**SAD** – *Sporadic Alzheimer Disease*

**shRNA** – *small hairpin RNA*

**siRNA** – *small interference RNA*

**SNCA** –  $\alpha$ -sinucleína

**TRBP** – HIV-1 *Transactivating Response (TAR) RNA Binding Protein*

## ABSTRACT

*Gene silencing occurs naturally in our cells, through a set of mechanisms called iRNA. Its mediating action in several cellular processes and its role in the pathophysiology of many diseases have been studied over the past decades, with results that led investigators to propose its use as a basis for new therapeutic strategies.*

*Alzheimer's and Parkinson's diseases are the most common neurodegenerative diseases and it is expected that their prevalence will increase in coming decades due to increased life expectancy of the world population. They have high economic and social impacts and currently represent a major clinical challenge, since existing treatments do not allow for effective cure of the disease, only attenuate their symptoms and seek to delay its progression.*

*Both researchers and the Pharmaceutical Industry are now focusing on the development of therapies based technologies iRNA, namely miRNA and siRNA, for the treatment of neurodegenerative diseases. In this work I will explain the mechanisms underlying these technologies and discuss some studies that underlie its application in the treatment of Alzheimer and Parkinson diseases, demonstrating the reason for the investments in the area and its promising future.*

## RESUMO

O silenciamento gênico ocorre naturalmente nas células do nosso organismo, através de um conjunto de mecanismos denominados iRNA. A sua ação mediadora em vários processos celulares e o seu papel na fisiopatologia de algumas doenças têm sido estudados ao longo das últimas décadas, com resultados que levaram os investigadores a propor o seu uso como base para novas estratégias terapêuticas.

As doenças de Alzheimer e Parkinson são as doenças neurodegenerativas mais comuns e prevê-se que a sua prevalência aumente nas próximas décadas, devido ao aumento da esperança média de vida da população mundial. Têm elevados impactos socioeconómicos e representam atualmente um desafio clínico, já que os tratamentos existentes não permitem a cura efetiva da doença, apenas atenuam os seus sintomas e atrasam a sua progressão.

Investigadores e Indústria Farmacêutica estão agora a apostar no desenvolvimento de terapêuticas baseadas em tecnologias de iRNA, nomeadamente miRNA e siRNA, para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Neste trabalho, explicarei os mecanismos subjacentes a estas tecnologias e abordarei alguns estudos que fundamentam a sua aplicação no tratamento das doenças de Alzheimer e Parkinson, demonstrando o porquê dos investimentos na área e do seu futuro promissor.



## 1. TERAPIA GÊNICA

Terapia gênica é uma forma de medicina molecular que se baseia na transferência de material genético (DNA ou RNA) para as células, permitindo a correção de uma disfunção celular ou a adição de uma nova função à célula, com o objetivo de curar uma doença ou melhorar o estado clínico de um doente (1;2). Um produto de terapia gênica é “obtido através de um conjunto de processos de fabrico que visam a transferência e subsequente expressão de um gene profilático, diagnóstico ou terapêutico, para células animais ou humanas”, através de um sistema de expressão contido num vetor (3). A terapia gênica pode ser explorada através de diferentes abordagens, nomeadamente, por adição de genes terapêuticos, substituição de genes defeituosos, reparação de mutações gênicas ou silenciamento de genes específicos.

## 2. SILENCIAMENTO DE GENES

O silenciamento de genes ocorre naturalmente nas células eucariotas, funcionando como mecanismo de regulação de genes e de defesa contra ácidos nucleicos de origem externa (vírus, transposões, transgenes) (4). Atua sobretudo em processos de pós-transcrição da síntese proteica, por interação com as moléculas de RNAm. Tem constituído matéria de interesse para vários estudos ao longo das últimas décadas, não só pelo seu contributo para um maior conhecimento de fenómenos biológicos e fisiopatológicos, mas também como potencial estratégia de diagnóstico e terapêutica para diversas doenças.

Numa fase inicial, as tecnologias de *knockdown* de sequências específicas de RNA baseavam-se na utilização de oligonucléotidos antisense e, mais tarde, de ribozimas (5). Estas moléculas mostraram algum potencial terapêutico, mas questões relativas ao seu transporte e estabilidade, efeitos *off-target* e dificuldade de seleção de sequências-alvo efetivas, levaram à carência de resultados científicos robustos e a um abrandamento na aposta do seu desenvolvimento como fármacos.

A descoberta do mecanismo endógeno de iRNA (*interference RNA*) e demonstração de características potencialmente úteis do ponto de vista farmacológico, levaram ao seu estudo como alternativa terapêutica para várias doenças.

## 3. iRNA

iRNA traduz-se num conjunto de mecanismos que ocorre naturalmente nos seres vivos, e que leva ao silenciamento sequências específicas de genes. Está envolvido em diversos processos fisiológicos, como formação de heterocromatina, crescimento e

proliferação celular e diferenciação tecidual (6). É mediado por pequenas moléculas de RNA: miRNA (*micro RNA*) e siRNA (*small interfering RNA*) (ver Anexo).

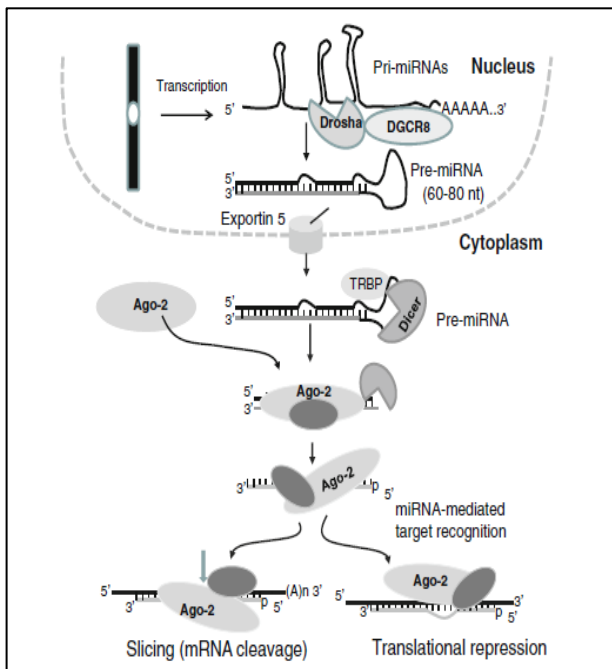
A sua descoberta surgiu na sequência de diversas investigações respeitantes às moléculas de RNA realizadas ao longo das últimas décadas e contribui para a evolução do conceito de Dogma Central da Biologia e da ideia de que o genoma apenas expressa a sua informação através de proteínas.

Com efeito, até aos anos 1980's, o RNA era visto como uma molécula inerte, simples intermediário na transmissão de informação para a síntese proteica. Sidney Altman e Thomas Cech foram os primeiros cientistas a mostrar as suas propriedades catalíticas, em plantas, descoberta pela qual foram reconhecidos através da atribuição do Prémio Nobel da Química, em 1989 (7). Mais tarde, em 1998, Andrew Fire e Craig Mello descobriram que moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNA) tinham capacidade de regular a expressão génica em *Caenorhabditis elegans*, ao promoverem silenciamento de genes por diminuição ou degradação do RNAm endógeno, processo este denominado por RNA de interferência (iRNA) (8). Esta descoberta valeu-lhes o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina, em 2006. Thomas Tuschl veio depois mostrar que pequenos duplexes de cerca de 21 nucleótidos de RNA (siRNA – *small interference RNA*) eram os mediadores da degradação de sequências específicas de RNAm em mamíferos, propondo que o iRNA pudesse vir a ser usado como terapia génica (9). Finalmente, em 2010, Davis *et al.* demonstraram pela primeira vez em humanos que siRNA administrado sistemicamente pode levar à inibição de genes específicos por um mecanismo de ação de iRNA (10).

Estes avanços promoveram um estudo mais efetivo dos processos de iRNA, levando à exploração das suas propriedades de potência (ação silenciadora alcançada a partir de concentrações inferiores de moléculas efectoras), especificidade (fácil *design* e síntese de sequências dirigidas exclusivamente para determinados genes) e versatilidade (terapêutica direcionada simultaneamente para múltiplas sequências dentro de um gene ou um grupo de genes) (11). Estas características constituem importantes aspetos a ter em atenção no desenvolvimento de terapêuticas baseadas em silenciamento génico, incentivando à procura de um mais profundo conhecimento relativamente ao iRNA e seus principais mediadores: miRNA e siRNA.

### 3.1. miRNA

miRNAs são moléculas de RNA não codificante (ncRNA) que atuam na regulação da expressão génica através de estratégias de pós-transcrição. São transcritos poliadenilados de genes presentes naturalmente no nosso genoma. A maioria dos miRNA é formada por uma



**Figura 1** – Representação esquemática do mecanismo de silenciamento génico mediadas por miRNA. Adaptado de (6).

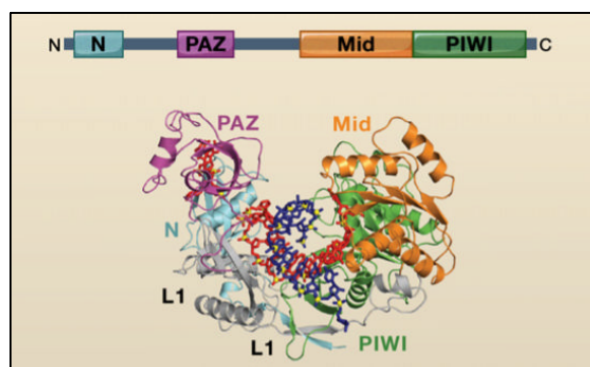
via canónica (Figura 1). O primeiro passo da sua génese ocorre no núcleo da célula, onde são transcritos pela RNA polimerase II (a mesma enzima que produz o RNAm), originando longas moléculas de miRNA primário (pri-miRNA). Estas são processadas por uma RNase III, Drosha, com a ajuda do co-fator DGCR8 (que posiciona o sítio catalítico da Drosha no local adequado). Formam-se assim pre-miRNAs (precursores do miRNA com cerca de 70 nucleótidos), que são, de seguida, exportados para o citoplasma pela Exportina-5. Aqui, são metabolizados pela Dicer (RNase III citoplasmática) e pela

proteína de ligação TAR RNA (TRBP), que fazem a excisão da ansa terminal da molécula de pre-miRNA, dando origem a miRNA de cadeia dupla maduros, com cerca de 21-23 nucleótidos. A proteína Dicer é uma RNase III específica de dsRNA. É composta por três domínios (um domínio PAZ e dois domínios RNase III) que têm um papel central na clivagem das moléculas dsRNA. O domínio PAZ (domínio partilhado com a proteína Argonauta), liga-se à extremidade 3' do RNA e os domínios RNase, que ficam posicionados a cerca de 22 nucleótidos de distância dessa ligação, clivam e separam os miRNA/siRNA dos seus precursores. Este corte deixa extremidades 5'-monofosfato nos produtos, que serão importantes em fases subsequentes do processo de silenciamento.

Estes duplexes têm uma semi-vida curta, uma vez que se juntam rapidamente a uma proteína Argonata 2, que faz a separação das duas cadeias do duplex. O miRNA, juntamente com a Argnauta e outras enzimas formam o complexo RISC (RNA-induced silencing complex). A proteína Argonata possui quatro domínios: PAZ (partilhado com a Dicer), PIWI, Mid e N (Figura 2). O domínio PAZ liga-se à extremidade 3' do miRNA. A extremidade 5' liga-se ao Mid. A cadeia do duplex que tiver extremidade 5' com menor

estabilidade termodinâmica vai ser escolhida como cadeia-guia. Os nucleótidos 2-8 da cadeia-guia são importantes no reconhecimento do alvo e têm as suas bases expostas para emparelhamento por complementaridade com o RNAm, ligando-se à extremidade 3'-UTR do RNAm. A cadeia não complementar ao RNAm-alvo é descartada (4). Consoante o grau de complementaridade entre estas moléculas,

o RNAm vai ser degradado por clivagem catalisada pela Argonata (homologia completa) ou a sua tradução vai ser inibida (homologia parcial) (12).



**Figura 2** – Em cima, a disposição canónica dos domínios da proteína argonata. Em baixo, uma estrutura cristalizada da proteína argonata de *Thermus thermophilus*, ligada a uma cadeia-guia de RNA e ao seu RNAm-alvo. Adaptado de (4).

Ainda não se conhece de que modo o silenciamento mediado por miRNA afecta a tradução do RNAm: se numa fase inicial, de alongação, de terminação ou em ambas. Sabe-se, no entanto, que muitos miRNA endógenos manipulam a tradução de vários genes ao mesmo tempo, uma vez que, tanto um miRNA pode regular vários RNAm codificantes de proteínas, como o mesmo RNAm pode ser regulado por diversos miRNA (12). Esta pode ser uma propriedade muito útil do ponto de vista do tratamento de doenças de etiologia multigénica, mas pode também ser a principal responsável por efeitos *off-target* e potencial toxicidade.

Foram entretanto identificadas vias alternativas que levam à formação de miRNA. A mais comum ultrapassa o processamento em dois passos (Drosha/Dicer) com um evento de *splicing* e digestão por exonucleases que origina pequenos intrões em forma de ansa, denominados mirtrons (13). Estas moléculas são pouco comuns nas células, quando comparadas com os miRNA, mas têm sido motivo de estudo, uma vez que foram identificadas em todo o reino animal e há evidência de que tenham uma particular importância no sistema nervoso de primatas (14). Poderão, ainda, constituir uma alternativa terapêutica no caso de doenças provocadas por danos celulares nos quais a maquinaria de iRNA está funcionalmente comprometida, nomeadamente no que diz respeito às enzimas Drosha e Dicer, comprometendo a eficácia de terapias baseadas em miRNA e siRNA (12).

### 3.2. siRNA

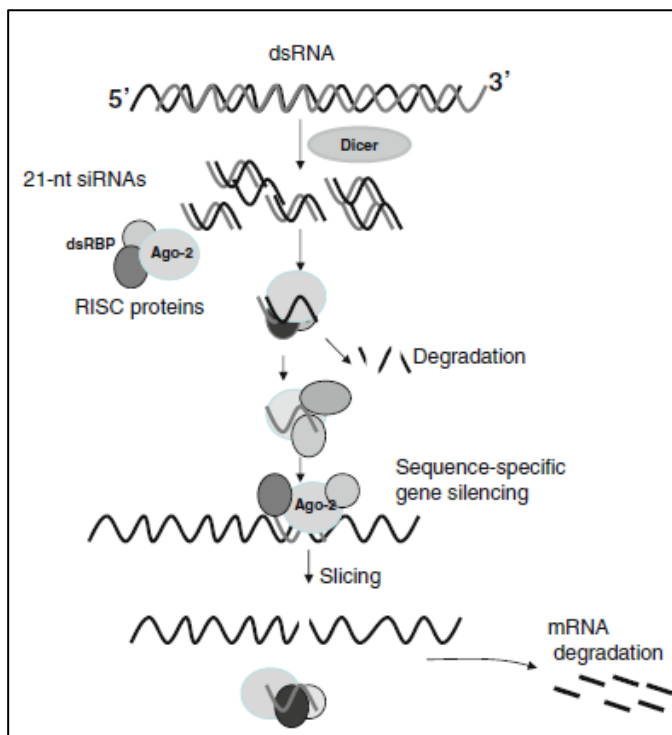
O siRNA é, também, classificado como ncRNA. Durante algum tempo pensou-se que, ao contrário do miRNA, o siRNA tinha origem apenas exógena (vírus, transposões, transgenes). No entanto, recentemente foram descobertas formas endógenas de siRNA,

derivadas de transcritos de RNAm convergentes. O siRNA é obtido a partir de longas moléculas de cadeia dupla de RNA (dsRNA), que são processadas pela Dicer e TRBP em siRNA (21-23 nucleótidos). Sendo semelhantes em tamanho e estrutura, siRNA e miRNA maduros seguem as mesmas vias a partir desta fase: há incorporação no complexo

multiproteico RISC por junção com a proteína Argonata 2; as cadeias de RNA são separadas; e a cadeia-guia (aquela de tem a extremidade 5' termodinamicamente menos estável) orienta o complexo até ao RNAm-alvo. O RNAm é então degradado pelo domínio PIWI da Argonata (Figura 3).

A ligação fosfodiéster entre os nucleótidos do alvo que estão emparelhados com os resíduos 10 e 11 do siRNA é clivada, o que gera produtos com extremidades 5'-monofosfato e 3'-hidroxilo.

Seguidamente, exonucleases celulares atacam os fragmentos resultantes e completam o processo de degradação (4). No final, o complexo RISC ativado é reciclado, ficando disponível para degradar novas moléculas de RNAm (6).



**Figura 3** — Representação sistemática do mecanismo de silenciamento gênico por siRNA. Adaptado de (6).

Uma não complementaridade no centro do duplex siRNA/alvo suprime a atividade endonucleotídica e algumas proteínas Argonata não possuem sequer esta atividade, mesmo com alvos perfeitamente emparelhados. Estes alvos podem ainda ser silenciados por um mecanismo semelhante ao que é utilizado pelo miRNA. Pensa-se que este silenciamento é responsável pela maioria dos efeitos *off-target* do siRNA, pelo que é de grande importância e está a cativar a atenção dos investigadores (4).

Uma das principais diferenças entre miRNAs e siRNAs está na precisão das suas extremidades. Os siRNAs são muito mais heterogêneos na composição das suas extremidades, o que se reflete numa maior especificidade para o substrato. Os miRNA comportam-se como produtos de atividade gênica: têm terminações exatas, com pouca variação (4).

## 4. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas são “condições hereditárias e esporádicas que se caracterizam por uma disfunção progressiva do sistema nervoso. Estão, muitas vezes, associadas a uma atrofia das estruturas nervosas centrais ou periféricas que foram afetadas” (15). Esta deterioração leva a problemas de movimento, ataxia e alterações cerebrais, que culminam com o aparecimento de demência. Apesar de cada doença constituir uma entidade única, as doenças neurodegenerativas têm em comum o principal fator de risco (o envelhecimento) e três aspetos fisiopatológicos fundamentais: agregação de proteínas, neuroinflamação e disfunção mitocondrial. Partilham também alguns desafios, como a falta de testes de diagnóstico precoce e a existência de uma grande proporção de doentes com formas esporádicas ou idiopáticas (16).

Estima-se que haja, em 2015, 47,47 milhões de pessoas com demência no mundo, número que deverá aumentar para os 75,63 milhões em 2030 e 135,46 milhões em 2050 (17). O seu impacto socioeconómico é muito elevado, não só para os doentes, que se veem incapacitados em executar atividades básicas do seu dia-a-dia, como para os seus cuidadores, que ficam sujeitos a uma grande tensão psicológica e financeira. Os custos associados a estas condições estão relacionados com cuidados médicos (diagnósticos, terapêuticos), cuidados informais (não diretamente pagos – apoio de familiares e amigos) e cuidados formais (lares especializados, serviços de apoio domiciliário, entre outros). Estimou-se que, em 2010, estes custos ultrapassaram os 600 mil milhões de dólares em todo o mundo, constituindo o dobro dos valores gastos com o cancro e o triplo da despesa com doenças cardíacas (18).

Perante os desafios clínicos, terapêuticos, sociais e económicos que as doenças neurodegenerativas apresentam atualmente, há uma grande necessidade de desenvolver métodos que permitam aumentar os conhecimentos relativamente aos seus mecanismos fisiopatológicos. Só deste modo conseguiremos métodos de diagnóstico e terapêutica mais eficazes, que permitam melhorar a qualidade de vida dos doentes e daqueles que os acompanham.

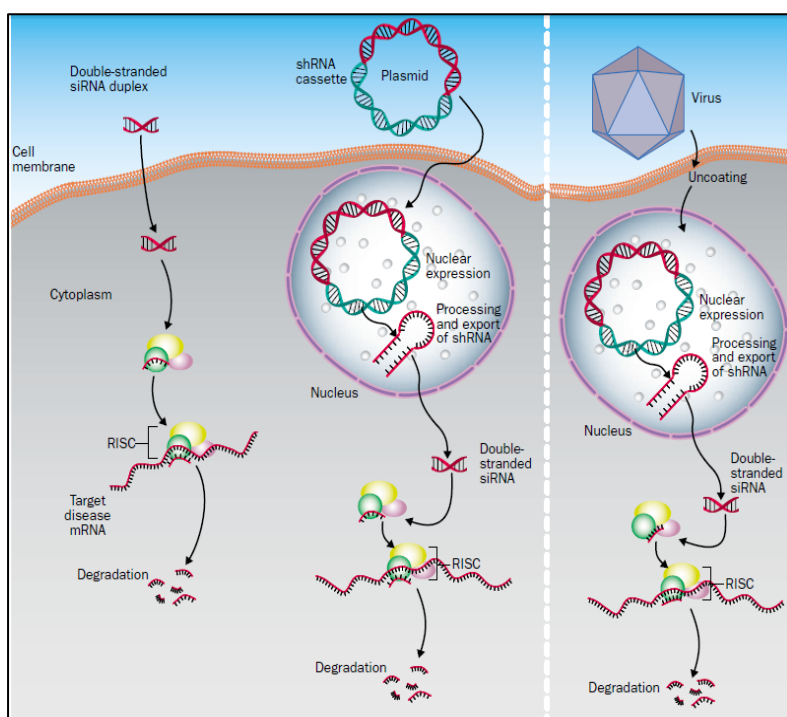
## 5. miRNA E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A influência dos miRNA no mecanismo fisiopatológico de doenças do sistema nervoso foi inicialmente identificada num modelo de peixe-zebra (*Danio rerio*), quando se observou que uma mutação na enzima Dicer levou a uma falha na produção de miRNA maduros, resultando em efeitos morfológicos ao nível das células nervosas (19). Mais tarde, descobriu-se que os miRNA são encontrados em grande quantidade no sistema nervoso,

onde atuam como reguladores de diversas funções: crescimento de neurites, morfologia de dendrites, diferenciação neuronal e plasticidade sináptica (16). Distúrbios nas suas vias de biogênese e atividade estão, assim, relacionados com a origem e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (20). Este aspeto tem possibilitado o estudo de novos alvos e o desenvolvimento da tecnologia do iRNA como uma potencial alternativa terapêutica, sobretudo para doenças “*nondruggable*”.

## 5.1. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

Como referido anteriormente, os miRNA são moléculas endógenas, produzidas naturalmente pelas células eucariotas, pelo que o seu potencial terapêutico está a ser explorado através de duas estratégias: mimetizadores de miRNA e anti-miRNA. Os mimetizadores de miRNA são pequenas moléculas de RNA recombinante que se



**Figura 4** — Três vias para inibição da expressão proteica com iRNA. À esquerda, as células são transfetadas com siRNA pré-formado. No centro, transfecção de vetores com plasmídeos para o núcleo da célula, com transcrição de shRNA. À direita, vetores virais entram na célula por endocitose mediada por receptores e libertam o seu genoma no núcleo, onde será transcrito em shRNA. Adaptado de (60).

assemelham a precursores de miRNA (pri e pre-miRNA). Podem atuar em diferentes passos das vias de biogênese de proteínas, levando a uma diminuição da sua expressão (21). Os anti-miRNA são moléculas que levam a uma perda de função num miRNA de interesse. São sintetizadas de forma a ligarem-se por complementaridade a uma determinada sequência do miRNA-alvo, inativando-o (21). Constituem uma estratégia particularmente interessante para o tratamento de doenças em que há uma sobreexpressão

de miRNA, promovendo um aumento das vias de sobrevivência celular e uma diminuição das vias apoptóticas (22).

A utilização de terapias baseadas em siRNA tem de ser abordada de modo diferente,



uma vez que estas moléculas raramente são encontradas no citoplasma de células eucariotas (Figura 4). São, em vez disso, desenhadas e quimicamente sintetizadas em laboratório, de modo a mimetizarem miRNA maduros endógenos, mas com perfeita complementaridade com as sequências-alvo. São diretamente injetadas no citoplasma das células, desencadeando um mecanismo de silenciamento que leva à clivagem do RNAm pretendido (23). No entanto, este modo de utilização de siRNA tem demonstrado efeitos de duração apenas transitória, pelo que foi desenvolvida uma estratégia que permite uma produção prolongada de RNA terapêuticos nas células pretendidas (24). Esta abordagem consiste na utilização de tecnologias de siRNA baseadas em vetores, que são transportados para o núcleo da célula, e fazem a inclusão de sequências específicas no seu genoma. Estas sequências codificam para shRNA (*short hairpin RNA*), pequenas moléculas de RNA com uma estrutura em forma de gancho. Assim, ao contrário dos siRNA, os shRNA são sintetizados no núcleo, seguindo depois uma via de processamento semelhante à dos siRNA e que culmina com a degradação do RNAm ou com uma supressão da sua tradução em proteínas (25).

## 5.2. DESAFIOS DAS TECNOLOGIAS BASEADAS EM iRNA

Estudos em modelos animais e ensaios clínicos em humanos têm demonstrado a eficácia terapêutica do iRNA e um perfil de segurança promissor (12). No entanto, vários desafios técnicos têm surgido e só a sua solução poderá levar a um maior desenvolvimento destas tecnologias e à sua utilização na prática clínica.

### 5.2.1. TRANSPORTE

O transporte das moléculas efectoras de iRNA, requer a sua estabilização a nível sistémico e local, um direcionamento para o tecido-alvo e uma facilitação do *uptake* celular.

A estabilidade destas moléculas nos fluidos biológicos é baixa, uma vez que muitos RNA curtos são rapidamente degradados e eliminados do organismo. Modificações no esqueleto (por exemplo, 2'-O-metilação) ou formação de conjugados (como conjugados peguilhados ou com colesterol) podem ser uma solução, melhorando a estabilidade e biodisponibilidade das moléculas de siRNA/miRNA, já que as protegem da ação de endo e exonucleases.

Um transporte deficitário para o tecido-alvo pode levar a uma baixa eficácia ou a efeitos indesejados. Além disso, devido à presença da barreira hematoencefálica, o Sistema Nervoso Central (SNC) constitui um local de difícil acesso. Para ultrapassar estas questões, as moléculas efectoras podem ser incorporadas em *carriers* (nanopartículas, anticorpos, aptâmeros, proteínas) que se associam às células de modo não específico ou específico,



nomeadamente através da sua ligação a recetores específicos da superfície das células (12). Estes veículos de transporte não-virais podem aceder ao SNC através de três vias: circulação sanguínea, fluido cerebrospinal ou injeção intraparenquimal direta, dependendo da população celular alvo (23). Dependendo do período de silenciamento desejado e do tecido-alvo, o transporte de siRNA/miRNA pode ainda ser feito através de vetores virais, que transferem o material genético transportado para o núcleo das células-alvo, permitindo que estas expressem os RNA terapêuticos. Neste contexto, salienta-se a utilização de lentivírus, que é particularmente vantajosa quando o alvo são células em estado quiescente (como, por exemplo, macrófagos), tendo capacidade de integrar o seu genoma, permitindo uma expressão génica prolongada. Vírus adenoassociados são usados para células sem capacidade de divisão (como os neurónios). Não integram o seu genoma, mas persistem de forma episomal, sendo menos propensos a causar mutações e, portanto, mais seguros (27).

### 5.2.2. EFEITOS *OFF-TARGET*

As células possuem uma complexa rede de interações entre os diversos mecanismos que nelas existem, nomeadamente entre as vias responsáveis pela regulação génica. Assim, o silenciamento de um gene pode refletir-se noutros genes ou noutras vias.

Estes efeitos *off-target* podem ser desencadeados de várias formas. A sequência do iRNA terapêutico pode apresentar semelhanças com miRNA endógenos e, como tal, ser complementar de RNAm codificantes que não sejam o alvo, impedindo a formação de proteínas não relacionadas com a doença. Esta situação pode ocorrer para centenas de RNAm que tenham uma região 3'-UTR complementar com a sequência de nucleótidos 2-8 da extremidade 5' da cadeia-guia do siRNA em questão. A molécula efetora de iRNA pode também ser idêntica a um RNAm que não o alvo, sendo traduzida e originando um fenótipo (26). Há, ainda, a possibilidade de não ser a cadeia-guia do siRNA a ser incorporada no complexo RISC, mas sim a sua complementar, levando a efeitos inesperados (30).

### 5.2.3. EFEITO IMUNOGÉNICO

Tal como acontece com qualquer agente externo, a exposição das células a RNA exógenos pode perturbar o seu normal funcionamento, levando à estimulação do sistema imunitário. Esta resposta imunológica depende de vários fatores, como o tipo de vetor utilizado (viral ou não-viral), a dose e a molécula terapêutica em questão, nomeadamente a sua sequência. De facto, mostrou-se que moléculas com sequências como GUCCUCAA, UGUGU, UGGC e GU conseguem ativar os recetores Toll-like 7 e 8, presentes na membrana dos endossomas de células do sistema imune, conferindo imunogenicidade aos

siRNA que as contêm. Também o tamanho da molécula efetora pode influenciar as suas propriedades imunogénicas, uma vez que foi demonstrado que, ao contrário dos duplexes com 21 nucleótidos, siRNA com 25 nucleótidos de comprimento estimulam o sistema imunitário, independentemente da sequência das suas cadeias (30). As moléculas efectoras podem ainda desencadear mecanismos de defesa pela sua estrutura de dupla cadeia de RNA. Apesar de moléculas pequenas, como o siRNA, serem desenhadas para escapar à indução de respostas imunitárias mediadas por Interferão tipo I (típica da resposta celular a dsRNA longas exógenas), outras vias imunitárias podem ser estimuladas. Com efeito, demonstrou-se que a administração de siRNA leva à indução de respostas imunes sistémicas, nomeadamente através da deteção de Interferão- $\alpha$  no soro e de células dendríticas na medula óssea (31).

O efeito imunogénico das terapêuticas baseadas em iRNA depende também do estado imunológico do doente, que é um aspeto a ter em conta no caso das doenças neurodegenerativas, por apresentarem elevada prevalência em indivíduos com idade mais avançada. Com o envelhecimento, ocorrem alterações progressivas na atividade do sistema imunitário, nomeadamente ao nível do cérebro, que se refletem numa maior suscetibilidade e sensibilidade deste órgão a infeções e estímulos imunitários (28).

A título de exemplo, investigadores que utilizaram lipossomas catiónicos para transporte de siRNA descobriram que estes originavam ou potenciavam respostas mediadas por interferões (29), e, num outro estudo, a utilização de sistemas virais promoveu respostas derivadas da infiltração de linfócitos T e macrófagos no cérebro (28).

#### 5.2.4. SATURAÇÃO DA MAQUINARIA CELULAR

O facto das tecnologias baseadas em iRNA atuarem em mecanismos celulares naturais pode levar a uma desestabilização destas vias, nomeadamente pela saturação da maquinaria celular necessária aos processos de iRNA. Esta saturação pode advir de níveis elevados de precursores do iRNA, que são difíceis de controlar, já que a expressão destas moléculas depende de variados fatores, tais como vetores, promotores, estrutura da ansa e disponibilidade dos componentes das vias de iRNA (23). É mais provável que esta situação aconteça quando os efetores são moléculas de shRNA do que siRNA, já que as primeiras são expressas pela própria célula, enquanto que as segundas são exógenas e a sua quantidade é mais facilmente controlada (26).

## 6. PERSPETIVA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

A descoberta do iRNA cativou a atenção de investigadores de todo o mundo, que viram no silenciamento génico uma potencial nova área terapêutica. Também a indústria

farmacêutica mostrou grande interesse por esta área científica. A possibilidade do rápido desenvolvimento de iRNAs dirigidos para genes-alvo específicos, que levassem à cura de doenças sem tratamento totalmente eficaz, levou a que cientistas e empresas depositassem grandes expectativas nestas novas moléculas (32). Contudo, esta atmosfera positiva rapidamente desvaneceu, perante os desafios técnicos que foram surgindo e a falta de resultados clínicos robustos.

Dirk Haussecker fez uma reflexão sobre o assunto e dividiu a evolução do negócio das terapêuticas de iRNA em quatro fases (33). Entre 2002 e 2005, a seguir à descoberta de iRNA em células humanas por Thomas Tuschl, foram pequenas empresas de biotecnologia que apostaram no potencial destas moléculas, procurando tirar vantagem do seu *know-how* em terapias baseadas em ácidos nucleicos para se tornarem líderes na área. O próprio Tuschl, juntamente com alguns colegas, fundou nesta altura a Alnylam Pharmaceuticals, onde procurou concentrar a propriedade intelectual destas tecnologias, de modo a financiar o seu próprio desenvolvimento de fármacos. A Ribozyme Pharmaceuticals (Sirna Therapeutics), Atugen (Silence Therapeutics) e Protiva (Tekmira) são outros exemplos de empresas que apostaram no estudo e desenvolvimento destas terapêuticas.

Por seu lado, as grandes companhias farmacêuticas viam o iRNA apenas como uma ferramenta de investigação. Este paradigma alterou-se quando algumas grandes empresas, como a Novartis e a Merck, começaram a mostrar interesse no iRNA como agente terapêutico. O caso dos anticorpos monoclonais, que constituiu uma chamada de atenção para as grandes farmacêuticas (já que ficaram a perder face à inovação das pequenas empresas de biotecnologia) e a iminente queda de várias patentes, foram os principais fatores a desencadear esta mudança. Começou então uma grande competição por acesso e controlo de propriedade intelectual de iRNA, com investimentos de 2,5 a 3,5 mil milhões de dólares por parte da “Big Pharma”.

Entre 2008 e 2011, as grandes farmacêuticas fizeram uma exacerbada propaganda desta tecnologia, criando expectativas irrealistas. Além disso, os mercados financeiros não souberam valorizar devidamente a inovação trazida pela tecnologia do iRNA; o que foi agravado pela crise na economia global e consequente contenção de custos na área da saúde, sobretudo no mundo ocidental. Com problemas de expiração de patentes, dificuldades na aprovação de novos fármacos, diminuição de produtividade e perda de confiança nas suas capacidades inovadoras, as grandes farmacêuticas foram as primeiras a restringir os seus investimentos na área.

Este retrocesso teve, no entanto, um impacto positivo, uma vez que as restrições

financeiras levaram a um maior escrutínio científico e a aumento de qualidade da ciência. (33). Assiste-se hoje a um reinvestimento no estudo do iRNA como meio de diagnóstico e terapêutica, com uma valorização do mercado, que cresceu de 9,3 para 11,7 mil milhões de dólares entre 2012 e 2013 e se espera que alcance os 38,8 mil milhões em 2018 (34). Pela sua prevalência, impacto socioeconómico e terapêuticas pouco eficazes, doenças neurodegenerativas, como a de Alzheimer e a de Parkinson têm sido alvo de investimento por parte das empresas (34).

## **7. ALZHEIMER**

### **7.1. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO SOCIOECONÓMICO**

A doença de Alzheimer é classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença crónica não-transmissível (35), sendo a mais comum das patologias neurodegenerativas e constitui uma das principais causas de demência (23). Estima-se que 44 milhões de pessoas em todo o mundo tenham Alzheimer ou uma demência associada (36), número que deverá duplicar até 2050, tendo em conta que o principal fator de risco para a doença é o envelhecimento e que se verifica uma tendência de crescimento do segmento da população com mais de 65 anos de idade, sobretudo nos países desenvolvidos (37).

Os custos totais com a doença de Alzheimer são muito elevados, sobretudo pela necessidade de cuidados sociais (cuidados profissionais, domiciliários, lares). Os cuidados de saúde constituem uma pequena percentagem do total, não só pelo baixo índice de diagnóstico, como pelas opções terapêuticas limitadas e pela pouca utilização de intervenções baseadas em evidência existente (17).

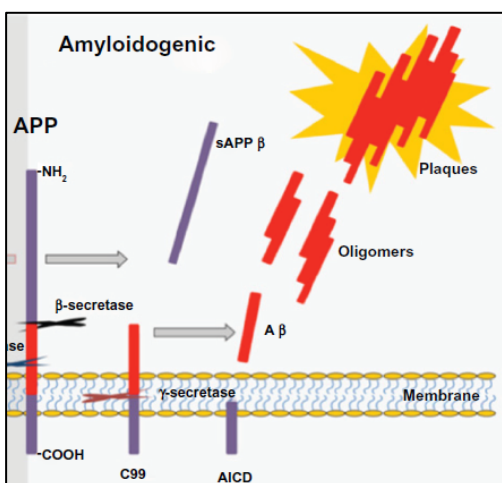
### **7.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

A doença de Alzheimer parte de um processo fisiopatológico subclínico, progredindo para senescência (declínio cognitivo relacionado com a idade). Segue-se uma fase de declínio cognitivo leve, durante a qual a capacidade para executar a maioria das atividades diárias permanece intacta. A progressão da doença culmina num estágio final de demência, com perda parcial ou total da autonomia (37).

A principal característica da doença de Alzheimer é a perda de memória, com perda progressiva de memória episódica, de recordações de momentos e locais e dos contextos a eles associados. Está também associada a um declínio cognitivo e degradação de habilidades motoras, podendo ser acompanhada de depressão, alucinações e delírios (37).

### 7.3. FISIOPATOLOGIA

A doença de Alzheimer pode ser classificada em dois tipos: esporádica (SAD – *Sporadic Alzheimer Disease*) e familiar (FAD – *Familial Alzheimer Disease*). A forma esporádica é a mais comum, correspondendo a 90% de todos os casos de Alzheimer, e afeta doentes com mais de 65 anos de idade. O seu principal fator de risco é a presença do alelo  $\epsilon 4$  do gene da apolipoproteína E (APOE). A forma familiar é rara e manifesta-se em doentes mais jovens, com idades entre os 40 e os 50 anos, estando relacionada com a presença dos genes APP (*Amyloid Precursor Protein*), PS1 (*Presenilin 1*) e PS2 (*Presenilin 2*) (38).



**Figura 5** – Clivagem sequencial da APP pelas enzimas  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase, com formação do peptídeo A $\beta$  e, conseqüentemente, de placas amiloides. Adaptado de (38).

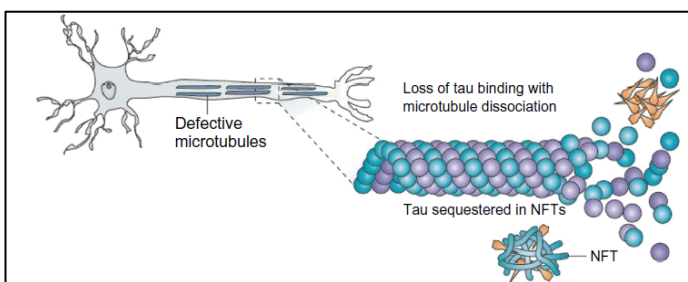
A fisiopatologia da doença envolve a acumulação e agregação do peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) e da proteína tau hiperfosforilada, que originam deposição de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, respetivamente (39).

O peptídeo A $\beta$  é formado a partir de uma proteína precursora amiloide (APP), através de uma clivagem sequencial pelas enzimas  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase (Figura 5). A enzima BACE1 ( $\beta$ -secretase cleaving enzyme) tem um papel importante nesta clivagem, sendo encontrada em elevada quantidade no cérebro de doentes com a forma esporádica de

Alzheimer, o que sugere que a sua sobreexpressão pode levar ao aparecimento ou agravamento da doença (40). O peptídeo A $\beta$  atua na regulação de atividades neuronais e a sua acumulação está relacionada com uma depressão sináptica (41). A APOE, proteína transportadora de lípidos, promove a deposição de A $\beta$  e diminui a sua depuração, tendo sido associada aos estágios mais tardios da doença (42).

A proteína tau é uma proteína associada aos microtúbulos do citoesqueleto da célula, exercendo uma ação na sua estabilização. O seu

grau de fosforilação é regulado ao longo do desenvolvimento celular, sendo maior nos neurónios fetais e diminuindo com a idade. A formação das placas neurofibrilares está relacionada com alterações ao nível da tau, e inclui hiperfosforilação da proteína, alterações



**Figura 6** – Proteína tau hiperfosforilada não se liga aos microtúbulos, sendo sequestrada para emaranhados neurofibrilares. Adaptado de (38).

conformacionais e, por fim, polimerização (43) (Figura 6).

A deposição de placas de A $\beta$  e emaranhados neurofibrilares afeta a comunicação entre alguns grupos de neurónios, o que leva a falhas no seu funcionamento e, em último caso, morte neuronal. Esta acumulação ocorre sobretudo no córtex entorrinal, hipocampo e prosencéfalo basal, áreas do cérebro responsáveis pela memória e capacidades cognitivas (44).

#### 7.4. TERAPÊUTICAS BASEADAS EM iRNA

A terapêutica atual para o Alzheimer baseia-se na utilização de agentes não modificadores da doença, que atuam sobretudo na diminuição dos sintomas e progressão da doença. Os principais fármacos utilizados são inibidores da colinesterase (donepezilo, rivastigmina, galantamina) e antagonistas do recetor N-metil-D-aspartato (NMDA) (memantina), por se acreditar que a falta de memória e declínio cognitivo associados à doença se devem a níveis anormais dos neurotransmissores acetilcolina e glutamato, detetados nos cérebros de doentes em estudos *post-mortem*.

De facto, verificou-se que valores reduzidos de acetilcolina na fenda sináptica estão relacionados com uma perda progressiva de neurónios colinérgicos e uma reduzida libertação do neurotransmissor a partir dos mesmos, o que poderá ser causa dos principais sintomas da doença de Alzheimer. Assim, os inibidores da colinesterase irão atuar a nível desta enzima catalisadora da hidrólise da acetilcolina, inibindo a sua ação, que leva a um aumento dos níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica, promovendo, conseqüentemente, uma melhoria na progressão da doença.

O glutamato é um neurotransmissor excitatório, ativador do recetor NMDA, também envolvido nos processos de memória e aprendizagem. Pensa-se que os níveis elevados de glutamato presentes nos cérebros de doentes com Alzheimer são responsáveis por disfunção celular e morte neuronal. A memantina atua por inibição não competitiva do recetor NMDA, reduzindo os sinais excitatórios anormais das células nervosas e a sua função, promovendo uma melhoria dos sintomas da doença (45).

Pelo seu perfil fisiopatológico e sintomático, e pelo impacto socioeconómico que tem, a doença de Alzheimer constitui um alvo atrativo para a procura de terapêuticas alternativas e inovadoras, com vista a alvos até agora “*undruggable*” como é o caso das tecnologias baseadas em iRNA.

### 7.4.1. miRNA

Como referido anteriormente, são hoje conhecidos vários genes e mutações causadores da doença de Alzheimer. Os miRNA dirigidos a estes genes têm um potencial valor terapêutico, uma vez que medeiam a repressão da expressão da proteína causadora de doença. Ao identificar quais os miRNA que regulam a expressão de proteínas específicas, podemos mimetizá-los ou inibi-los, controlando a expressão da doença (22).

Neste sentido, foram já realizados vários estudos que permitem concluir acerca da influência da desregulação de miRNA específicos na patogénese do Alzheimer e como podem estes ser considerados alvos terapêuticos.

O miR-107 existe no córtex cerebral e a diminuição da sua expressão foi correlacionada com um aumento da enzima BACE1 e, conseqüentemente, com a da evolução da doença (46). O miR-124a também está relacionado com a enzima BACE1 e, assim como o miR-107, regula outros processos do metabolismo da APP. Este aspeto prova a capacidade de um único miRNA influenciar vários componentes de uma via metabólica e, como consequência, o potencial de levar a efeito aditivos (16).

A família miR-29 tem, também, como alvo o RNAm da BACE1, e a sua diminuição está relacionada com o desenvolvimento de uma forma esporádica de Alzheimer. O miR-29b regula também uma família de proteínas pró-apoptóticas, que se pensa estarem envolvidas na patogénese da doença por promoverem a morte neuronal (46).

APP é ainda alvo de regulação pela família miR-106, sendo que os miR-106a e miR-106b se ligam diretamente ao RNAm da referida proteína, inibindo a sua expressão (16). Foi também demonstrado que o miR-106 tem um papel na promoção do ciclo celular e na depuração do peptídeo A $\beta$  por mecanismos mediados por autofagia (47).

A família miR-146 é composta pelos miR-146a e miR-146b que se encontram, respetivamente, sobre e subexpressos no cérebro de doentes com Alzheimer. Ambos os miRNA estão associados a moléculas reguladoras do sistema imunitário, como a IL-1, o que pode estar associado à progressão da doença (47).

Estes exemplos são a prova do papel importante que os miRNA desempenham na doença de Alzheimer e constituem base de estudo para potenciais alvos terapêuticos.

### 7.4.2. siRNA

Uma vez que a produção de A $\beta$  depende da atividade da BACE1, uma potencial estratégia terapêutica consiste na inibição da ação desta enzima, mediada pelo mecanismo de siRNA. Os primeiros ensaios que utilizaram esta abordagem *in vivo* foram realizados em

ratos, e consistiram na utilização de lentivírus para transporte e transferência do gene codificante de um siRNA cujo alvo era o RNAm da BACE1. Este gene foi expresso no hipocampo do animal e os resultados demonstraram uma melhoria na integridade neuronal e o impacto direto desta tecnologia na patologia. Um exemplo de uma estratégia com vetor não-viral consistiu na administração extracerebral de lipossomas contendo shRNA. Estes lipossomas foram estabilizados com uma molécula de polietilenoglicol, que se ligava a um recetor específico na barreira hematoencefálica, permitindo o transporte através da mesma (48).

Um outro modo de reduzir a formação das placas amiloides consiste no silenciamento da expressão da APP, proteína precursora do peptídeo A $\beta$ . Assim, uma investigação utilizando vírus do *Herpes simplex* como sistema de transporte de shRNA dirigido contra a APP num modelo de rato, mostrou uma redução de 50% na expressão de A $\beta$  (49). No entanto, há que ter em atenção que a APP tem funções fisiológicas importantes, que poderão ser afetadas pelo uso desta técnica (48).

Apesar destes e outros resultados promissores, mais estudos serão necessários para concluir acerca da efetividade e segurança destas tecnologias.

## 8. PARKINSON

### 8.1. EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO SOCIOECONÓMICO

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum dependente da idade (50). Estima-se que 6,3 milhões de pessoas sofram desta condição em todo o mundo, o que corresponde a pouco menos do que 1% da população mundial (51).

Os custos socioeconómicos associados à doença de Parkinson são elevados. O impacto económico do Parkinson passa não só pelos custos diretos (terapêuticas farmacológicas e intervenções médicas, condições especiais de alimentação e mobilidade, cuidadores especializados ou familiares/amigos), mas também pelos custos indiretos, respeitantes à perda de produtividade devida à morbilidade relacionada com a doença (como, por exemplo, interrupção de trabalho, reforma antecipada). Por este motivo, os custos associados ao Parkinson são, inclusivamente, considerados desproporcionados em relação à sua prevalência (52).



## 8.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Do ponto de vista clínico, a doença de Parkinson caracteriza-se por disfunções motoras perceptíveis, como bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade postural. Estes sintomas são consequência da degeneração dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta*, região do cérebro diretamente relacionada com a coordenação dos movimentos. No entanto, com a progressão da doença, outras partes do cérebro podem ser afetadas, como giro do cíngulo, amígdala e regiões corticais superiores, resultando em manifestações psiquiátricas e demência (50).

## 8.3. FISIOPATOLOGIA

Também a doença de Parkinson pode ser de natureza esporádica ou familiar.

A forma esporádica é a mais comum e surge como consequência de uma insuficiente depuração da proteína pré-sináptica  $\alpha$ -sinucleína. A sua acumulação no cérebro leva à formação de corpos de Lewis, que são nocivos para os neurónios dopaminérgicos. Foi descoberto um polimorfismo na região promotora do gene da  $\alpha$ -sinucleína que aumenta a transcrição do gene, estando associado a um maior risco de desenvolvimento da doença (53).

Sabe-se também que o Parkinson é uma doença multigénica, e vários genes foram já associados à forma familiar da doença, nomeadamente os que codificam para as proteínas

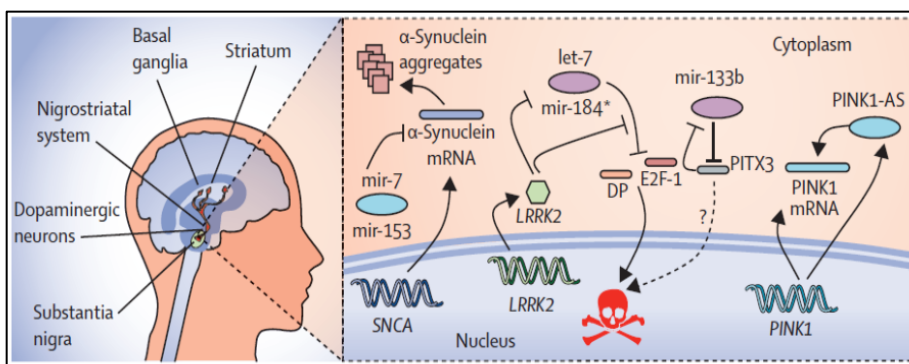


Figura 7 – ncRNA reguladores na doença de Parkinson. Adaptado de (61).

SNCA ( $\alpha$ -sinucleína), LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), parkina, DJ-1 e FGF20 (fibroblast growth factor 20) (Figura 7).

Mutações nestes

genes estão associadas ao desenvolvimento de Parkinson numa idade mais jovem e à apresentação de manifestações fenotípicas mais severas.

## 8.4. TERAPÊUTICAS BASEADAS EM iRNA

O tratamento da doença de Parkinson consiste atualmente na utilização de terapêuticas farmacológicas focadas no neurotransmissor dopamina (atuando ao nível do seu precursor L-dopa, dos seus recetores ou da inibição da sua degradação enzimática), ou de

fármacos anticolinérgicos.

O aumento do conhecimento em relação aos mecanismos fisiopatológicos da doença e a consciência do seu impacto económico, estimularam a aposta no desenvolvimento de terapêuticas baseadas em iRNA para o tratamento da doença.

#### 8.4.1. miRNA

O RNAm da  $\alpha$ -sinucleína tem uma sequência 3'-UTR muito conservada, o que sugere a sua importância no controlo pós-translacional do gene SNCA (16). Dois miRNA foram associados à regulação deste gene e consequente expressão da  $\alpha$ -sinucleína: miR-7 e miR-153. Estes miRNA são encontrados em grande quantidade no cérebro e têm uma ação aditiva (54). O miR-7 liga-se à sequência de nucleótidos 119-127 da extremidade 3'-UTR do RNAm da  $\alpha$ -sinucleína. Atua por diminuição da estabilidade da molécula de RNAm, diminuindo a expressão e acumulação da proteína e protegendo a célula da sua citotoxicidade (55). O miR-153 liga-se às bases 462-468 da extremidade 3'-UTR do RNAm, inibindo a tradução da proteína (50).

LRRK2 é um gene envolvido na promoção da inibição mediada por miRNA dos fatores de transcrição ELFI e DP, que têm um papel na regulação do ciclo celular. miRNA das famílias let-7 e miR-184\* reprimem normalmente a tradução destes fatores. Mutações no gene LRRK2 diminuem a ação destes miRNA e aumentam a expressão dos fatores ELFI e DP, levando à morte dos neurónios dopaminérgicos (16).

A parkina é uma ligase responsável pela ubiquitinação de proteínas destinadas a degradação pelo proteossoma. É codificada pelo gene PANK2, cujas mutações demonstraram ser responsáveis por uma forma autossómica recessiva de parkinsonismo juvenil (56). DJ-1 é uma proteína codificada pelo gene PANK7 e está envolvida na regulação da dinâmica mitocondrial e na resposta da célula ao stress oxidativo. Quando se ligam, estas duas proteínas mostram ter uma ação neuroprotetora aditiva. Descobriu-se que os miR34b e miR-34c se encontram em concentrações mais baixas do que o normal na doença de Parkinson, o que é acompanhado por uma diminuição da expressão da parkina e da DJ-1, demonstrando o seu papel na regulação da expressão destas proteínas e na viabilidade celular (50).

Pitx3 (*pituitary homeobox 3*) é um fator de transcrição necessário à diferenciação celular, que se encontra naturalmente em quantidade significativa nos neurónios dopaminérgicos (16). É alvo de regulação do miR-133b, através de um mecanismo de *feedback* negativo: o gene Pitx3 promove a transcrição do miR-133b, que reprime a

expressão do Pitx3, inibindo a diferenciação neuronal.

O FGF20 encontra-se expresso na *substantia nigra* e é responsável pela estimulação da maturação dos neurónios dopaminérgicos. Foi identificada uma mutação na região 3'-UTR do RNAm do FGF20 que se pensa estar associada à doença de Parkinson, uma vez que está localizada no local de ligação do miR-433, que está expresso em grandes quantidades no cérebro. Verificou-se que níveis aumentados de FGF20 correspondiam também a níveis mais altos de  $\alpha$ -sinucleína. Assim, uma diminuição na ligação do miR-433 ao RNAm FGF20, resulta numa sobreexpressão do fator e em níveis aumentados de  $\alpha$ -sinucleína (50).

#### 8.4.2. siRNA

A proteína  $\alpha$ -sinucleína tem constituído o principal alvo do desenvolvimento de terapêuticas baseadas em siRNA. Sapru *et al.*, por exemplo, utilizaram um shRNA associado a um lentivírus para silenciar a expressão de  $\alpha$ -sinucleína num modelo de ratos e obtiveram resultados positivos (26). Num outro estudo, siRNA quimicamente modificado através de 2'-O-metilação, foi administrado por difusão direta na *substantia nigra* de macacos. Os resultados demonstraram uma eficácia significativa e, sobretudo, um perfil de segurança promissor, não havendo deteção de inflamação dos tecidos nem alteração do número ou fenótipo dos neurónios dopaminérgicos (57).

## CONCLUSÃO

Apesar do interesse flutuante da Indústria Farmacêutica no desenvolvimento de tecnologias baseadas em iRNA, tem-se verificado, ao longo das últimas décadas, uma evolução no conhecimento dos seus mecanismos e um crescente entusiasmo no seu potencial como terapêutica para várias doenças. As doenças de Alzheimer e Parkinson constituem alvos atrativos para a utilização das tecnologias de miRNA e siRNA, uma vez que ainda são pouco conhecidos os processos fisiopatológicos que estão na sua origem e as terapêuticas atuais não permitem uma cura efetiva da doença.

As estratégias até agora desenvolvidas passam pela utilização de moléculas que aumentam ou diminuem a ação de miRNA endógenos (mimetizadores e anti-miRNA, respetivamente) ou pela criação em laboratório de siRNA propositadamente desenhados para silenciar genes específicos. Estudos pré-clínicos, realizados em modelos animais, têm mostrado resultados promissores, mas são ainda muitos os desafios clínicos e tecnológicos que têm impedido a utilização de terapêuticas baseadas em iRNA em humanos e, conseqüentemente, a sua chegada ao mercado. Atualmente, o maior desafio consiste no

desenvolvimento de vetores que permitam um transporte eficiente do fármaco até ao local pretendido, permitindo a obtenção de produtos mais seguros e eficazes.

O reavivar do investimento da indústria nestas tecnologias, traz uma nova expectativa quanto à evolução das estratégias de silenciamento génico no combate a doenças neurodegenerativas, constituindo uma esperança de cura para doentes em todo o mundo.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) AKHTAR, N. *et al.* - **Gene therapy: A review article.** 5:10 (2011) 1812–1817.
- (2) SOOFIYANI, S. R. *et al.* - **Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin.* ISSN 22285881. 3:2 (2013) 249–255. doi: 10.5681/apb.2013.041.
- (3) **Directive 2001/83/EC of the European Parliament.** Part IV, Annex I. Disponível na Internet: [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir\\_2001\\_83\\_cons/dir2001\\_83\\_cons\\_20081230\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_cons/dir2001_83_cons_20081230_en.pdf).
- (4) CARTHEW, RICHARD W. *et al.* - **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs.** *Cell.* 136:4 (2009) 642–655. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035.Origins.
- (5) ZHANG, Y. C. *et al.* - **Antisense Inhibition.** *Methods in Molecular Medicine.* 106:2005) 11–35.
- (6) SIOUD, M. - **RNA Interference: Mechanisms, Technical Challenges, and Therapeutic Opportunities.** Em *RNA Interference Challenges and Therapeutic Opportunities.* ISBN 9781588298874. p. 1–13.
- (7) GARFIELD, E. - **The 1989 Nobel Prize in Chemistry Goes to Sidney Altman and Thomas R. Cech for the Discovery of Enzymatic RNA- A comment.** *Essays of an Information Scientist.* 13:(1990) 266.
- (8) FIRE; MELLO - **Potent and specific genetic interference dsRNA 1998.** *Nature.* . ISSN 0028-0836. 391:February (1998) 806–811. doi: 10.1038/35888.
- (9) TUSCHL, T. *et al.* - **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** *Nature.* ISSN 0028-0836. 411:May (2001) 1–5. doi: 10.1038/35078107.
- (10) DAVIS, M. E. *et al.* - **Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles.** *Nature.* ISSN 0028-0836. 464:7291 (2010) 1067–1070. doi: 10.1038/nature08956.
- (11) KOUTSILIERI, E. *et al.* - **The therapeutic potential of siRNA in gene therapy of neurodegenerative disorders.** *Journal of Neural Transmission, Supplementa.* ISSN 03036995. 72 (2007) 43–49. doi: 10.1007/978-3-211-73574-9-7.
- (12) BATTISTELLA, M.; MARSDEN, P. - **Advances, Nuances, and Potential Pitfalls When Exploiting the Therapeutic Potential of RNA Interference.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* ISSN 00099236. 97:1 (2015) 79–87. doi: 10.1002/cpt.8.
- (13) CURTIS, H. J. *et al.* - **Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA.** *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* ISSN 17577004. 3:5 (2012) 617–632. doi: 10.1002/wrna.1122.

- (14) BEREZIKOV, E. *et al.* - **Mammalian Mirtron Genes**. *Mol Cell*. 28:2 (2007) 328–336. doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.028.Mammalian.
- (15) **Neurodegenerative diseases** - 2015. [Acedido a 28 abr. 2015]. Disponível na Internet:  
[http://ec.europa.eu/health/major\\_chronic\\_diseases/diseases/brain\\_neurological/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/brain_neurological/index_en.htm).
- (16) GOODALL, E. F. *et al.* - **Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration**. *Frontiers in cellular neuroscience*. ISSN 1662-5102. 7:October (2013) 178. doi: 10.3389/fncel.2013.00178.
- (17) WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO - **The Epidemiology and Impact of Dementia - Current State and Future Trends** Disponível na Internet:  
[http://www.who.int/mental\\_health/neurology/dementia/en/](http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en/).
- (18) **SCML - Neurodegenerative diseases** - 2015. [Acedido a 23 ago. 2015]. Disponível na Internet: [http://www.scml.pt/en-GB/santa\\_casa\\_neuroscience\\_awards/research\\_areas/neurodegenerative\\_diseases/general\\_information/](http://www.scml.pt/en-GB/santa_casa_neuroscience_awards/research_areas/neurodegenerative_diseases/general_information/).
- (19) YELAMANCHILI, S. V.; FOX, H. S. - **Defining larger roles for «tiny» RNA molecules: Role of miRNAs in neurodegeneration research**. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. ISSN 15378276. 29:6 (2012) 997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- (20) REGE, S. D. *et al.* - **Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases**. *ISRN neurology*. ISSN 2090-5505. 2013:2013) 375852. doi: 10.1155/2013/375852.
- (21) JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. - **MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential**. *Pharmacology and Therapeutics*. ISSN 01637258. 133:2 (2012) 142–150. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.002.
- (22) ROSHAN, R. *et al.* - **MicroRNAs: novel therapeutic targets in neurodegenerative diseases**. *Drug Discovery Today*. ISSN 13596446. 14:23-24 (2009) 1123–1129. doi: 10.1016/j.drudis.2009.09.009.
- (23) BOUDREAU, R. L. *et al.* - **RNAi medicine for the brain: Progresses and challenges**. *Human Molecular Genetics*. ISSN 09646906. 20:1 (2011) 21–27. doi: 10.1093/hmg/ddr137.
- (24) AHMED, O. *et al.* - **Delivery of siRNAs to Cancer Cells via Bacteria**. *Em RNA Interference Challenges and Therapeutic Opportunities*. p. 117–129.
- (25) RAO, D. D. *et al.* - **siRNA vs. shRNA: Similarities and differences**. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 0169409X. 61:9 (2009) 746–759. doi: 10.1016/j.addr.2009.04.004.
- (26) SEYHAN, A. A. - **RNAi: A potential new class of therapeutic for human genetic disease**. *Human Genetics*. ISSN 03406717. 130:5 (2011) 583–605. doi:

10.1007/s00439-011-0995-8.

- (27) VANNUCCI, L. *et al.* - **Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology.** *The new microbiologica.* ISSN 1121-7138. 36:1 (2013) 1–22.
- (28) MCMENAMIN, M. M.; WOOD, M. J. A - **Progress and prospects: Immunobiology of gene therapy for neurodegenerative disease: prospects and risks.** *Gene therapy.* ISSN 0969-7128. 17:4 (2010) 448–458. doi: 10.1038/gt.2010.67.
- (29) MA, Z. *et al.* - **Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice.** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* ISSN 0006291X. 330:3 (2005) 755–759. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.041.
- (30) HOWARD, K. - **RNA Interference from Biology to Therapeutics.** Springer, 2013
- (31) HORNING, V. *et al.* - **Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7.** *Nature medicine.* ISSN 1078-8956. 11:3 (2005) 263–270. doi: 10.1038/nm1191.
- (32) ARTZI, N. - **Are RNAi and miRNA therapeutics truly dead?.** 33:3 (2015) 141–144. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.12.005.
- (33) HAUSSECKER, D. - **The Business of RNAi Therapeutics in 2012.** 2012) 1–12. doi: 10.1038/mtna.2011.9.
- (34) **RNAi Drug Delivery: Technologies and Global Market - 2014.** [Acedido a 25 ago. 2015]. Disponível na Internet: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/rnai-drug-delivery-bio076b.html>.
- (35) **Alzheimer Portugal - 2011.** [Acedido a 30 jun. 2015]. Disponível na Internet: <http://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-30-16-doenca-cronica-nao-transmissivel>.
- (36) **Alzheimer's statistics - 2015.** [Acedido a 30 jun. 2015]. Disponível na Internet: <http://www.alzheimers.net/resources/alzheimers-statistics/>.
- (37) BENNETT, D. A. *et al.* - **Epigenomics of Alzheimer's disease.** *Translational Research.* ISSN 19315244. 165:1 (2015) 200–220. doi: 10.1016/j.trsl.2014.05.006.
- (38) CHEN, S. *et al.* - **Advances with RNA interference in Alzheimer's disease research.** *Drug Des Devel Ther.* ISSN 1177-8881. 7:2013) 117–125. doi: 10.2147/DDDT.S40229.
- (39) TAKATA, K.; KITAMURA, Y. - **Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Tangle Formation, Amyloid- $\beta$ , and Microglia in Alzheimer's Disease.** *Journal of Pharmacological Sciences.* ISSN 1347-8613. 118:3 (2012) 331–337. doi: 10.1254/jphs.11R10FM.
- (40) TAN, L. *et al.* - **Non-coding RNAs in Alzheimer's Disease.** *Molecular Neurobiology.* ISSN 0893-7648. October 2012 (2012) 382–393. doi: 10.1007/s12035-

012-8359-5.

- (41) PALOP, J.; MUCKE, L. - **Amyloid-beta Induced Neuronal Disease: From Synapses toward Neural Networks**. *Nature neuroscience*. 13:7 (2010) 812–818. doi: 10.1038/nn.2583.Amyloid-.
- (42) BERTRAM, L.; LILL, C. M.; TANZI, R. E. - **The genetics of alzheimer disease: Back to the future**. *Neuron*. ISSN 08966273. 68:2 (2010) 270–281. doi: 10.1016/j.neuron.2010.10.013.
- (43) AVILA, J. *et al.* - **Role of tau protein in both physiological and pathological conditions**. *Physiological reviews*. ISSN 0031-9333. 84:2 (2004) 361–384. doi: 10.1152/physrev.00024.2003.
- (44) GLAT, M. J.; OFFEN, D. - **Cell and gene therapy in Alzheimer's disease**. *Stem cells and development*. ISSN 1557-8534. 22:10 (2013) 1490–6. doi: 10.1089/scd.2012.0633.
- (45) HONG-QI, Y. *et al.* - **Current Advances in the treatment of Alzheimer's disease: focused on considerations targeting Alhabeta and tau**. *Translational Neurodegeneration*. ISSN 2047-9158. 1:1 (2012) 21. doi: 10.1186/2047-9158-1-21.
- (46) DELAY, C. *et al.* - **MicroRNAs in Alzheimer's disease**. *Neurobiology of Disease*. . ISSN 09699961. 46:2 (2012) 285–290. doi: 10.1016/j.nbd.2012.01.003.
- (47) BEKRIS, L. M. *et al.* - **MicroRNA in Alzheimer's disease: an exploratory study in brain, cerebrospinal fluid and plasma**. *Biomarkers*. ISSN 15378276. 18:5 (2013) 455–466. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- (48) NILSSON, P. *et al.* - **Gene therapy in Alzheimer's disease - potential for disease modification**. *Journal of cellular and molecular medicine*. ISSN 1582-4934. 14:4 (2010) 741–757. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01038.x.
- (49) HONG, C.-S. *et al.* - **Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo**. *Gene therapy*. ISSN 0969-7128. 13:14 (2006) 1068–1079. doi: 10.1038/sj.gt.3302719.
- (50) MA, L. *et al.* - **Advances with microRNAs in Parkinson ' s disease**. *Dove Press Journal*. ISSN 11778881. 2013) 1103–1113. doi: 10.2147/DDDT.S48500.
- (51) **About Parkinson's** - 2015. [Acedido a 7 ago. 2015]. Disponível na Internet: <http://www.epda.eu.com/en/pd-info/about-parkinsons/?Opentab=c0,2>.
- (52) MATEUS, C.; COLOMA, J. - **Movement Disorders Parkinson's Disease Health Economics and Cost of Illness in Parkinson's Disease**. 2013) 6–9. doi: 10.17925/ENR.2013.08.01.6.
- (53) KABARIA, S. *et al.* - **Inhibition of miR-34b and miR-34c enhances  $\alpha$ -synuclein expression in Parkinson's disease**. *FEBS Letters*. ISSN 00145793. 589:3 (2015)



319–325. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.014.

- (54) DOXAKIS, E. - **Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153**. *Journal of Biological Chemistry*. ISSN 00219258. 285:17 (2010) 12726–12734. doi: 10.1074/jbc.M109.086827.
- (55) JUNN, E. *et al.* - **Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 0027-8424. 106:31 (2009) 13052–13057. doi: 10.1073/pnas.0906277106.
- (56) COUNE, P. G.; SCHNEIDER, B. L.; AEBISCHER, P. - **Parkinson ' s Disease : Gene Therapies**. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012) 1–16.
- (57) MCCORMACK, A. L. *et al.* - **Alpha-Synuclein Suppression By Targeted Small Interfering Rna in the Primate Substantia Nigra**. *PLoS ONE*. ISSN 19326203. 5:8 (2010) 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0012122.
- (58) MACK, G. S. - **MicroRNA gets down to business**. *Nature biotechnology*. ISSN 1087-0156. 29:5 (2011) 459. doi: 10.1038/nbt0607-631.
- (59) KASAHARA, Y. *et al.* - **Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory**. Em *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Elsevier Inc., 2010 Disponível na Internet: [https://books.google.pt/books?id=uDyO8rxCg3QC&pg=PA207&lpg=PA207&dq=mirna+sirna+difference+table&source=bl&ots=Kb4mPOpTGp&sig=\\_QFiONGutiWKDH955buzT3w52E4&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CGUQ6AEwC2oVChMljZelMoy3xwIVhTcUCh3VGgki#v=onepage&q=mirna sirna difference table& p. 207](https://books.google.pt/books?id=uDyO8rxCg3QC&pg=PA207&lpg=PA207&dq=mirna+sirna+difference+table&source=bl&ots=Kb4mPOpTGp&sig=_QFiONGutiWKDH955buzT3w52E4&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CGUQ6AEwC2oVChMljZelMoy3xwIVhTcUCh3VGgki#v=onepage&q=mirna sirna difference table& p. 207).
- (60) DAVIDSON, B. L.; PAULSON, H. L. - **Molecular medicine for the brain: Silencing of disease genes with RNA interference**. *Lancet Neurology*. ISSN 14744422. 3:3 (2004) 145–149. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00678-7.
- (61) SALTA, E.; STROOPER, B. DE - **Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders**. *The Lancet Neurology*. ISSN 14744422. 11:2 (2012) 189–200. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70286-1.

## QUADRO RESUMO miRNA vs siRNA

[Adaptado de (58) e (59)]

	miRNA	siRNA
<b>ORIGEM</b>	Deriva de um <i>loci</i> específico do genoma, distinto de outros genes	Deriva de RNAm, transposões, vírus ou DNA heterocromático
<b>SÍNTESE</b>	Processado a partir de transcritos longos em forma de ansa (miRNA nucleares primários)	Processado a partir de duplexes longos de RNA ou moléculas em forma de ansa extensas
<b>PRODUTO FINAL FUNCIONAL</b>	Duplex de miRNA único para cada molécula precursora de miRNA	Múltiplos duplexes de siRNA para cada molécula precursora de siRNA
<b>CONSERVAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS</b>	Sequências de miRNA estão bem conservadas em organismos relacionados	Sequências de siRNA endógenas raramente estão conservadas
<b>COMPLEMENTARIDADE COM O RNAm-ALVO</b>	Não tem complementaridade total, pelo que um único miRNA pode ligar-se a centenas de RNAm-alvo	100% de complementaridade com o alvo, pelo que silencia genes específicos
<b>LIGAÇÃO AO ALVO</b>	Extremidade 5' do miRNA para especificidade de ligação ao alvo	Todas as bases da sequência de siRNA contribuem igualmente para a sua especificidade
<b>LOCAIS-ALVO</b>	miRNAs ligam-se mais frequentemente à extremidade 3' não traduzida dos transcritos alvo	siRNAs formam duplexes complementares em qualquer parte da molécula de RNAm