

Tecnologia de RNA de interferência (RNAi) como ferramenta para estudar a expressão gênica e com potencial na terapia gênica

O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo natural desencadeado por moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNA) no qual pequenos RNAs não codificantes (sncRNA) silenciam pós-transcricionalmente a expressão de genes ao neutralizar moléculas alvo de RNA mensageiro (mRNA).¹

Os sncRNAs que medeiam o silenciamento da expressão gênica podem ser endógenos, os *small interfering RNAs* (siRNA), ou exógenos, os micro RNAs (miRNA), e diferem na sua origem, processamento, mecanismo de ação e moléculas alvo. Os siRNA têm como precursores RNAs longos de cadeia dupla, ao passo que os miRNAs têm como precursores transcritos primários do genoma, sintetizados pela RNA polimerase II, originando miRNAs primários (pri-miRNA) com estrutura em gancho de cabelo que são depois processados no núcleo em miRNAs precursores (pre-miRNAs) e exportados para o citosol. Tanto siRNA como miRNA são clivados sucessivamente no citosol pela endonuclease *Dicer* originando fragmentos de 21-25 pb de dsRNAs fosforilados a 5' e com saliências de dois nucleótidos a 3'. Cada fragmento é depois associado a uma proteína argonauta (Ago), processo em que as duas cadeias da molécula de RNA são separadas e uma delas desprezada. A cadeia de RNA que permanece ligada à proteína (cadeia guia) é complementar ao mRNA do gene a ser silenciado e, em conjunto com a Ago e outras proteínas, forma o complexo RISC responsável pela indução do silenciamento do gene alvo. O silenciamento da expressão gênica ocorre por inibição da tradução do mRNA alvo: quando mediado por siRNAs, a ligação do RISC ao mRNA alvo resulta na sua degradação, devido à atividade nucleolítica da Ago; já o miRNA atua por repressão da tradução sem degradar o mRNA alvo, visto existir um emparelhamento incompleto entre o miRNA e o mRNA, mas sim por bloquear a ligação do ribossoma ao mesmo.¹⁻⁴

O RNAi pode ser explorado como ferramenta de silenciamento de genes, tendo diversas áreas de aplicação desde a ciência básica e investigação, à medicina, farmacologia molecular, indústria agrícola ou biotecnologia.⁵ Das várias aplicações possíveis, destacam-se o estudo da expressão gênica e a terapia genética. Relativamente ao estudo da expressão gênica, a introdução de dsRNA com sequência complementar ao gene a ser estudado numa célula ou organismo induz o mecanismo de RNAi provocando uma supressão parcial (*knockdown*) da expressão do gene de interesse, o que permite investigar a sua função através das diferenças fisiológicas ou fenotípicas observadas. Além disso, a possibilidade de silenciar apenas parcialmente a expressão de um gene possibilita o estudo de genes sem os quais o normal desenvolvimento e funcionamento celular é impossível.^{5,6}

O potencial terapêutico do RNAi tem sido também recentemente explorado, servindo como opção alternativa quando o tratamento convencional se mostra insatisfatório e tendo como base a indução do mecanismo de RNAi através da introdução de pequenos dsRNAs. Alguns dos fatores a ter em conta são o vetor utilizado, a eficácia da redução da expressão gênica e a toxicidade. A toxicidade pode ser resultado do próprio modo de introdução dos RNAs, de reações imunológicas ao RNA exógeno ou do reconhecimento indevido do alvo a silenciar (*off-target effect*).⁴ Contudo, progressos têm sido feitos e diversos ensaios clínicos em fase III estão a decorrer neste preciso momento com resultados promissores na terapia contra cancro, doenças inflamatórias, infecciosas, imunes, hereditárias ou ainda neurodegenerativas.^{4,6,7} Em 2018, foi aprovado pela FDA o primeiro fármaco de RNAi: *Patisiran* reduz os níveis de expressão da proteína de transporte transtiterina cuja acumulação, devido a má conformação, é manifestação da Amiloidose Hereditária, uma doença genética debilitante e muitas vezes fatal.⁷

Abreviaturas:

dsRNA – *double-stranded RNA*

sncRNA – *small non-coding RNA*

RISC – *RNA-Induced Silencing Complex*

FDA – *United States Food and Drugs Administration*

Referências:

1. Saurabh, S., Vidyarthi, A. S. & Prasad, D. RNA interference: Concept to reality in crop improvement. *Planta* **239**, 543–564 (2014).
2. Agrawal, N. *et al.* RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 657–85 (2003).
3. Olina, A. V., Kulbachinskiy, A. V., Aravin, A. A. & Esyunina, D. M. Argonaute Proteins and Mechanisms of RNA Interference in Eukaryotes and Prokaryotes. *Biochem.* **83**, 483–497 (2018).
4. Bobbin, M. L. & Rossi, J. J. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **56**, 103–122 (2016).
5. Abdurakhmonov, I. Y. RNA Interference – A Hallmark of Cellular Function and Gene Manipulation. *RNA Interf.* (2016). doi:10.5772/62038
6. Voorhoeve, P. M. & Agami, R. Knockdown stands up. *Trends Biotechnol.* **21**, 2–4 (2003).
7. Mullard, A. FDA approves landmark RNAi drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 613–613 (2018).