



APLICAÇÃO DE SILECIAMENTO GÊNICO COMO TRATAMENTO PARA O MAL DE ALZHEIMER: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

Flávia Caroline Bergamasco¹, Marcela Funaki dos Reis²

RESUMO: O Mal de Alzheimer é uma doença caracterizada pela perda episódica de memória e o seu tratamento é possível apenas utilizando a terapia gênica. Para verificar os avanços no tratamento para esta doença este estudo teve como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre o uso da técnica de terapia gênica por silenciamento gênico via RNA de interferência sobre os genes que atuam na patogênese do Mal de Alzheimer. A doença tem origem genética e neste caso não há cura ficando os tratamentos convencionados limitados a manutenção da qualidade de vida. Foi verificado que o método capaz de verdadeiramente curar a doença pode ser a terapia gênica por silenciamento dos genes implicados no Mal de Alzheimer via RNA de interferente. O mecanismo empregado pelo RNA Interferente (RNAi) é de silenciamento pós-transcricional, ou seja, o gene será transcrito normalmente, porém não conseguirá ser traduzido, pois antes o RNA mensageiro (RNAm) sofrerá clivagem pela enzima argonata complexada, o que conduz a não expressão das proteínas responsáveis pela formação da placa amiloide. Neste sentido é possível que esta tecnologia possa ser aplicada para o tratamento de portadores do Mal de Alzheimer impedindo a manifestação precoce dos sintomas.

PALAVRAS-CHAVE: Doença Neurodegenerativa; Mal de Alzheimer; RNA Interferente; Terapia Gênica.

1 INTRODUÇÃO

A doença conhecida como Mal de Alzheimer é caracterizada pela perda de memória episódica. O nome Mal de Alzheimer vem do psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer, que foi o primeiro a descrever em 1906 os sintomas e efeitos neuropatológicos da doença através da análise de lâminas do tecido cerebral de sua paciente, onde foi confirmado nas análises o acúmulo de uma substância incomum no córtex cerebral (OLIVEIRA et al; 2005).

A doença tem diferentes graus de manifestação e pode ser classificada como ligeira a tendência a letargia e perda de espontaneidade a reação a estímulos, moderada, quando o paciente necessita de auxílio para tarefas mais complexas e se tem a incapacidade de realizar tarefas diárias simples sem supervisão, e grave onde nesta fase se tem a perda da capacidade lingüística, perda da deglutição que podem até levar o indivíduo a morte (MARTINS, 2010). As principais áreas cerebrais atingidas são o córtex cerebral e hipocampo, região responsável pela formação de memória (NUSSBAUM, 2008).

O RNAi foi identificado em 1990 em plantas transgênicas em um experimento, onde foi feita uma super-expressão de genes para a produção do pigmento que promoveria uma coloração mais intensa de violeta escuro em petúnias. O gene responsável identificado foi "chalcone" e adicionado na planta, onde se obteve como resultado uma co-supressão que gerou o silenciamento provocando a produção de plantas brancas, sendo então observada a capacidade de moléculas interferirem na expressão do gene alvo, e o seu mecanismo foi descrito em helmintos *Caenorhabditis elegans* como mecanismo celular natural de silenciamento pós-transcricional (WATSON, 2009).

O Mal de Alzheimer é uma doença de origem genética, e os genes implicados nesta patologia estão relacionados à expressão da proteína precursora amilóide, que é uma proteína transmembrana e a sua super expressão seria o centro da patogênese da doença (NUSSBAUM, 2008). Essa proteína é clivada pelas enzimas secretases formando duas isoformas, a Ab-40 atóxica e a Ab-42 neurotóxica, onde a Ab-42 tem uma maior expressão em portadores de Alzheimer. Ambas isoformas protéicas formam as placas amilóides que são responsáveis pelo Mal de Alzheimer. Outros genes que podem estar envolvidos e quando alterados contribuem na patologia da doença são os responsáveis pela expressão das presenilinas (PSEN 1 e PSEN 2), que funcionam como cofatores das enzimas secretases para a clivagem de derivados de proteínas precursoras amilóide, levando o aumento da Ab-42 (NUSSBAUM, 2008). Além disso, o alelo E4 do gene APOE é também considerado um fator de risco, onde a expressão do alelo é dose dependente, ou seja, quanto maior o número de alelos E4 expressos mais precoce é o início do Mal de Alzheimer (NUSSBAUM, 2008). Atualmente foi descoberto outro fator envolvido no desenvolvimento do Mal de Alzheimer que é a proteína EP2, a presença dessa proteína dificulta a ação das células da micróglia, que é a responsável pela limpeza do cerebral (KNAPTON, 2014).

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá- PR.

² Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR – Maringá-PR



Sendo uma doença de origem genética o Mal de Alzheimer não tem cura, apenas tratamentos que visam a garantia da qualidade de vida dos portadores. Nesse sentido, a alternativa médica que visa o tratamento da doença se encontra no uso de terapia gênica. A terapia gênica trata-se de um conjunto de técnicas de Engenharia Genética que busca corrigir, substituir ou mesmo silenciar genes que atuam no processo de formação de doenças genéticas. Nesta perspectiva a terapia gênica via silenciamento gênico é a técnica mais atual e promissora que se utiliza pequenas moléculas de Ácido Ribonucléico (RNA) para inibir a expressão de genes causadores de doenças genéticas. Assim, este estudo teve como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre o uso da técnica de terapia gênica por silenciamento gênico via RNA de interferência sobre os genes que atuam na patogênese do Mal de Alzheimer.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a elaboração da revisão bibliográfica foram definidos os descritores utilizados para a pesquisa em bases de dados *online* nos sites como NBCI, Capes Periódicos, Scielo e HigWire. Como critério para delimitação no uso das publicações foi estabelecido o período que compreende os dez últimos anos, exceto para artigos históricos e fundamentais para construção da revisão bibliográfica. Os artigos selecionados passaram por fichamento para a construção das citações e foram utilizados para a construção deste estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Mal de Alzheimer é caracterizada pela perda de memória episódica e esta doença esta associada a super expressão de genes que promovem a deposição da proteína amilóide que se acumulam no tecido cerebral formando placas e conduzem a atrofia do tecido cerebral, Figura 1 (JELLINGERA, STADELMANN, 2001; NHI, 2015). Para que exista a possibilidade de tratamento a descoberta dos genes implicados na doença e o seu mapeamento nos 46 cromossomos humanos é fundamental para conhecer o mecanismo de expressão, as proteínas envolvidas, além de encontrar os locais passíveis de serem alterados. Neste sentido houve progresso neste campo com genes e proteínas mapeados e a fisiologia do processo elucidado (Quadro 1).

Atualmente os tratamentos convencionais para a doença são limitados a garantia de qualidade de vida dos pacientes e são baseados em inibidores das colinesterases, memantina, ou até mesmo as abordagens terapêuticas alternativas, além de apresentarem diversos efeitos colaterais ao paciente não são eficientes e se limitam em apenas em retardar a evolução natural da doença. Assim, a terapia gênica seria o único meio passível de realmente tratar a doença.

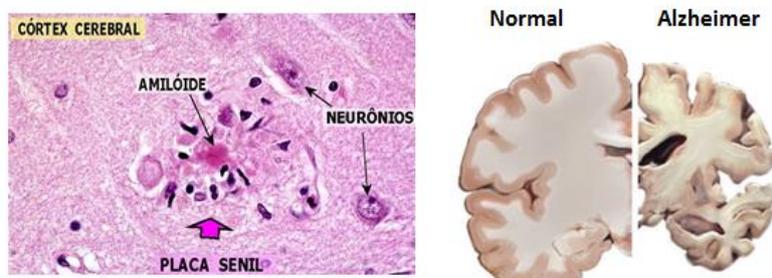


Figura 1. A. Tecido cerebral com Alzheimer evidenciando placa amiloide. B. Corte transversal do cérebro comparando a condição norma e com Alzheimer.

Fonte: Queiroz, Paes; NHI (2015)

Quadro 1: Genes e Proteínas Associadas a Suscetibilidade ao Mal de Alzheimer.

GENE	PROTEÍNA	FUNÇÃO NORMAL	PAPEL NA DOENÇA	MAPA	% NA DOENÇA
APP	PROTEÍNA BETA AMLÓIDE	Desconhecida	Componente das placas senis	21q21.3	1-2%
PSEN1	PRESENILINA 1	Desconhecida	Participa da clivagem anormal da proteína beta amilóide	14q24.3	50%
PSEN2	PRESENILINA 2	Desconhecida	Participa da clivagem da proteína beta amilóide	1q42.1	1-2%
APOE	ALIPROPOTEÍNA E	Participa do transporte lipídico entre tecidos e células	Componente das placas senis	19q13	-



PTGER2	E2	Receptor que pertence a família de receptores acoplados a proteína G	Impedem o funcionamento da micrógliia, que é a responsável pela limpeza no cérebro	14q22	-
--------	----	--	--	-------	---

Fonte: Thompson e Thompson: Genética Médica / NCBI

O princípio da técnica é bastante simples (Figura 2), primeiramente deve ser adicionado um RNAs, que deve conter uma sequência específica para um gene-alvo, sintetizado artificialmente, ao ser inserido na célula por um método de transferência de genes, a enzima Dicer, vai clivar o RNA como mecanismo de defesa da célula e como consequência da clivagem serão gerados os Small Interfering RNA (siRNA) usados na defesa contra vírus (BARBOSA, LIN, 2004, WATSON, 2009). Esses fragmentos irão se associar ao complexo protéico, assim a enzima Argonauta irá direcionar o siRNA para o gene alvo formando um complexo (siRNA+RNA mensageiro (RNAm)+Argonauta), onde o RNAm é inativado por clivagem, levando ao silenciamento pela Argonauta complexada (BARBOSA, LIN 2004).

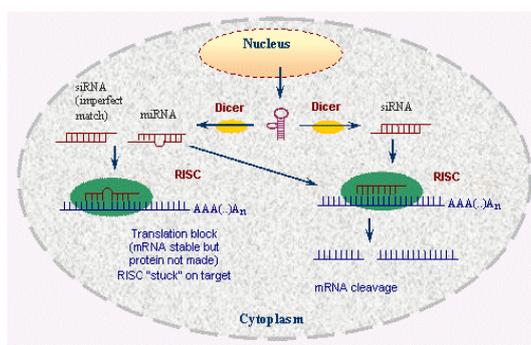


Figura 2 – Esquematização simplificada da via RNAi, que é baseada em dois passos, o primeiro o RNAs é processado em siRNA pela enzima Dicer. No segundo passo, o siRNA hibridiza com o RNAm alvo e leva o silenciamento do gene através da degradação do RNAm alvo.

Fonte: NCBI (2015)

Existem estratégias para a entrada do RNAi na célula-alvo, através de injeções endovenosas de siRNA modificados, e conjugados a molécula de colesterol, com isso se tem o prolongamento da meia-vida do siRNA na circulação através da ligação a lipoproteínas que são resistentes a filtração renal e protegem contra as mudanças plasmáticas, porem não é seletivo e acaba ativando todos os receptores de colesterol presentes em todas as células (FRANÇA et al, 2010). Outra forma seria a ligação de siRNAs a aptâmeros, que são pequenos pedaços de RNA, que ligam a células-alvo específicas, esses aptâmeros são sintetizados quimicamente e se ligam a receptores celulares específicos (FRANÇA et al, 2010). Recentemente esta sendo relatado a introdução na célula-alvo utilizando siRNA ligado a proteínas de fusão FAB de imunoglobulina e protamina, onde a porção FAB é responsável para determinar a especificidade da célula, onde a incorporação do siRNA seria por endocitose (FRANÇA et al, 2010). Existe estudos com o uso de vetores virais para a introdução de shRNAs em organismos, porem os vetores virais trazem riscos devido a sua patogenicidade levando a restrições em relação a dose de vírus que pode ser administrada, e estes vírus também podem sofrer mutações (FRANÇA et al, 2010).

Estudos recentes mostram a aplicação da terapia em ratos transgênicos que produzem altos níveis de placas beta-amiloides, que se acumulam na região do hipocampo, onde foi observado após a injeção de vetores para a super-expressão do gene a melhora no desempenho dos ratos portadores da doença, porem os efeitos benéficos ficaram restritos apenas a melhora da memória associativa, pois o vírus utilizado na técnica ter preferência por uma população de células neuronais específica (FURTADO et al., 2014). Na técnica foi usado o vetor do tipo lentivírus, onde o RNA mensageiro do gene foi isolado e inserido no vetor, em seguida o lentivírus foi injetado nos ratos com Alzheimer, e a super-expressão do gene resultou em melhora nos ratos que passaram pela terapia (FURTADO et al., 2014). Nesse sentido o bloqueio ou o silenciamento por meio do RNAi dos genes e proteínas envolvidas no mecanismo genético da Doença de Alzheimer seria um alvo de terapia gênica promissor.

Perante isso é de extrema importância informar essa possível forma de tratamento alternativa para o Mal de Alzheimer antes mesmo do aparecimento dos primeiros sinais e sintomas, e mostrar a aplicação da terapia via RNAi para impedir o desenvolvimento e até mesmo progressão da doença. Proporcionando um envelhecimento populacional de forma saudável aos idosos que possuem pré-disposição genética para a doença, evitando se que os mesmos sejam afetados pelo Mal de Alzheimer.



4 CONCLUSÃO

Apesar da existência de diversos estudos com a aplicação do RNAi em doenças genéticas, não se obteve ainda aplicabilidade dos experimentos em seres humanos, devido a fatores de segurança e éticos envolvidos, pois apesar de suas inúmeras vantagens a técnica de RNAi apresenta obstáculos, dentre eles é fazer com que as moléculas atinjam as células cerebrais específicas, pois o cérebro possui uma barreira natural contra a entrada de diversas substâncias. O problema a ser enfrentado pela técnica seria o efeito da resposta imune desencadeada, sendo necessária a utilização de baixas concentrações de vetores e também o silenciamento de alvos indesejados com a complementaridade parcial.

Dentre as vantagens da técnica como o silenciamento de genes causadores de doenças genéticas, dentre elas o Mal de Alzheimer, pode ser citada a extrema seletividade e potência da técnica via RNAi sobre os genes-alvo, que vem contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, além de possibilitar que essas moléculas sejam rapidamente projetadas, sendo também considerada como um processo relativamente simples.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, Angela Silva; LIN, Chin Jia. Silenciamento de Genes Com RNA Interferência: Um Novo Instrumento Para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 48, n. 5, p.612-619, 9 set. 2004.

FRANÇA, Natalia Regine de et al. Interferência por RNA: Uma Nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Bras Reumatol**, São Paulo, v. 50, n. 5, p. 695-709, 2010.

FURTADO, Cristina Moreira. Terapia Gênica Recupera Memória de ratos com Alzheimer: Um novo passo em direção a cura. **Nanocell News**, v.1, n. 11, p. 1-3, 13 maio. 2014.

JELLINERA, Kurt A.; STADELMENNB, Christine. Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease, **Journal of Alzheimer's Disease**, n. 3, p. 31–40, 2001.

KNAPTON, Sarah. **Has Stanford University found a cure for Alzheimer's disease?** 2014. Disponível em: <<http://www.telegraph.co.uk/news/science/science-news/11280504/Has-Stanford-University-found-a-cure-for-Alzheimers-disease.html>>. Acesso em: 01 jul. 2015.

MARTINS, Patrícia Andreia Gabriel. **Abordagem Farmacogenômica na Doença de Alzheimer: variações genéticas associadas a CYP2D6**. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Coimbra, 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **RNA Interference (RNAi)**. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRnai.shtml>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

NACIONAL INSTITUTE ON AGING. Alzheimer's Disease, **NIH Publication**, n. 15-6423, 2015.

NUSSBAUM, Robert L. Bases Moleculares, Bioquímicas e Celulares das Doenças Genéticas. In: NUSSBAUM, Robert L.; MCLNNES, Roderick R.; WILLARD, Huntington F. **Thompson e Thompson: Genética Médica**. 7. ed. São Paulo: Conhecimento Sem Fronteiras, 2008, Cap. 12, p. 299-303.

OLIVEIRA, Maria de Fátima et al. Doença de Alzheimer Perfil Neurológico e Tratamento. **O Portal dos Psicólogos**, p.1-21, abril. 2005.

QUEIROZ, Luciano S.; PAES, Rogério A. **Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem**. Acesso em 19 de Ago de 2015. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/bineualzheimer.html>>.

WATSON, James. O RNA Interferente Regula a Ação dos Genes. In: WATSON, James. **DNA recombinante**. 3. ed. Porto Alegre: Artimed, 2009. Cap. 9. p. 219-238.