

A PERSPECTIVA DA TERAPIA ANTISENSE NO TRATAMENTO DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Diogo Yoshimi de Alencar Makiyama¹; Valéria Miranda Avanzi¹; Adriana Fiorini²; Bruna Polacchine da Silva³

RESUMO: Sabe-se que a carcinogênese é um processo de origem genética, que inicia-se a partir de uma única célula mutada. Considerando a fisiologia da formação de um tumor maligno, a célula cancerosa tem alto poder de proliferação, perde a capacidade de aderência, invade tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e se espalha pelo organismo, estabelecendo-se e proliferando-se em locais distantes de sua origem, onde produz tumores secundários: as metástases. São inúmeros os tratamentos do câncer, entre eles está a terapia antisense. O papel principal desta terapia que faz-se utilização de oligonucleotídeos é inibir a tradução de uma proteína alvo, expressa defeituosamente quando um oncogene ou um anti-oncogene possui uma mutação, por complementariedade de ligação do oligonucleotídeo na molécula de mRNA. O presente estudo, teve como objetivo, avaliar e comparar diferentes metodologias relacionadas ao tratamento do câncer. Embora todos dos tratamentos obter sua eficácia, considera-se aquele que se após a fase mais ampla e delicada da pesquisa, for comprovado o pleno sucesso do tratamento, ele deverá ser adotado por toda a vida do paciente.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer; Terapia anti-sense; Terapia gênica

INTRODUÇÃO

Sabe-se que a carcinogênese é um processo de origem genética, que inicia-se a partir de uma única célula mutada. Para se tornar uma célula cancerosa, uma célula normal deve acumular mutações em muitos e diferentes genes. Essas mutações são, então, transmitidas às células descendentes. Por isso, o câncer pode ser considerado uma doença genética no nível da célula (KREUZER, 2002).

O tratamento preciso do câncer ainda esta longe de ser aplicável clinicamente. Vários estudos vêm sugerindo novas técnicas de tratamento, no entanto, por ser uma doença multifatorial, estes procedimentos nem sempre são eficientes.

O sequenciamento do genoma humano e a descoberta da função de vários genes têm auxiliado a introdução de novos métodos de intervenção do material genético, usando técnicas de biologia molecular. Métodos de terapia molecular como a terapia utilizando oligonucleotídeos antisense e a terapia do RNA interferente, siRNA, constituem um dos avanços mais recentes desta área.

O papel principal da terapia antisense utilizando oligonucleotídeos é inibir a tradução de uma proteína alvo, expressa defeituosamente quando um oncogene ou um

¹ Discentes do curso de Biomedicina. Departamento de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá, Paraná. Diogo_biomed@hotmail.com; valeriaavanzi@hotmail.com

² Pesquisadora Post-doc. Institut National de la Recherche Agronomique – INRA. Jouy en Josas, França. adriana.fiorini@inra.jouy.fr

³ Docente do curso de Biomedicina. Departamento de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá, Paraná. bruna.polacchine@cesumar.br

anti-oncogene possui uma mutação, por complementariedade de ligação do oligonucleotídeo na molécula de mRNA.

O alvo principal de silenciamento da expressão gênica seriam genes que codificam proteínas responsáveis pela carcinogênese, as quais podem incluir os genes *Bcl-2*, *H-ras* e *PKC-Alpha*. As proteínas codificadas por estes genes têm sido implicadas com o desenvolvimento, crescimento, e/ou manutenção de diversos outros tipos de câncer e tendem a estarem envolvidas nos sistemas de mensagens envolvendo sinalização anti-apoptose, sinalizando e/ou regulando a proliferação celular. No momento, o principal foco da terapia antisense na oncologia envolve o uso de aproximadamente 20 nucleotídeos (oligonucleotídeos) sintetizados para serem complementares a um RNAm específico na direção "sense" ou seja, 5' para 3' (KURRECK, 2003).

Quando introduzido em uma célula, o oligonucleotídeo anti-sense se hidridiza com o RNAm correspondente, formando um heteroduplex (HO e PARKINSON, 1997; CROOKE, 2000), inibindo a tradução de uma proteína. Uma das explicações mais que existem para as conseqüências da formação do heteroduplex é que o RNAm do heteroduplex então é clivado pela enzima RNase H, enquanto que o oligonucleotídeo antisense permanece intacto. A introdução de um gene que codifica uma cópia de RNA anti-sense de um oncogene poderia, por exemplo, reduzir ou impedir a expressão do oncogene e reverter a sua atividade tumorigênica.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi apresentar algumas informações a respeito do funcionamento dos oligonucleotídeos antisense no tratamento do câncer e discutir algumas das aplicações utilizadas até o momento.

DESENVOLVIMENTO

A identificação de genes que conferem um crescimento anormal de células neoplásicas e o entendimento dos mecanismos genéticos responsáveis por sua ativação são pré-requisitos em qualquer procedimento genético utilizado para a terapia do câncer. Conseqüentemente, estratégias que resultam em inibição específica da expressão gênica dos genes envolvidos com o câncer são ferramentas que permitem explorar as bases moleculares da regulação do crescimento e também oferecer uma oportunidade para o desenvolvimento de estratégias para a eliminação seletiva de células neoplásicas (CALABRETTA, 1991).

Oligonucleotídeos antisense são sequências curtas, normalmente de 13-20 bases de DNA única fita (oligodeoxinucleotídeo) ou RNA (oligonucleotídeo) complementares a uma fita de RNA (revisão em BIROCCIO *et al.*, 2006). Estas sequências são desenhadas para se hibridizarem por pareamento em transcritos de mRNA e, portanto, prevenir a expressão de um gene em particular e subsquentemente seu produto protéico. Após a ligação de um oligonucleotídeo antisense ao seu alvo de mRNA, o recrutamento da enzima RNase H ocorre. Esta enzima reconhece o complexo mRNA-oligonucleotídeo antisense e cliva a fita de mRNA. Outros mecanismos de inibição podem ocorrer como um resultado de *splicing* e inibição da tradução protéica (BIROCCIO *et al.* 2006). A especificidade de um oligonucleotídeo antisense é baseada no fato que qualquer sequência de nucleotídeo de aproximadamente 13 bases no RNA e 17 bases no DNA é alvo de ser encontrada somente uma vez no genoma humano. Enquanto isto poderia teoricamente ser verdade, na prática, efeitos não específicos, como falsos alvos, poderão ocorrer.

Embora os estudos dos oligonucleotídeos na inibição da expressão gênica tenha iniciado a mais de 30 anos, muitos problemas-chave ainda precisam ser resolvidos em relação a sua aplicação prática, como: a seleção de um único agente não parece particularmente promissora devido as alterações multigenéticas; é preciso ainda selecionar um vetor adaptável para mediar estes oligonucleotídeos; é preciso otimizar a

concentração necessária para a transfecção em uma linhagem celular, etc. (SHEN *et al.* 2008).

O primeiro trabalho sobre a inibição da expressão gênica utilizando oligonucleotídeos antisense foi publicado por Zamecnik e Stephenson (1978). Estes autores sintetizaram um oligonucleotídeo de DNA (oligodeoxinucleotídeo) de 13 mer, complementar as sequências terminais 5' e 3' da subunidade 35S de RNA do Rous sarcoma vírus e mostraram que em células expostas a este oligômero, houve 99% de decréscimo da atividade de transcrição.

As estratégias estudadas até agora incluem microinjeção, difusão passiva, endocitose (endocitose mediada por receptores), pinocitose de fase fluida, endocitose adsorptiva e entrada mediada artificialmente (usando vetores como lipossomas, micro ou nanopartículas ou dendrímeros) (DAI *et al.*, 2006; ELOUAHABI E RUYSSCHAERT, 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os oligonucleotídeos antisense são ferramentas efetivas para reduzir qualquer expressão de um gene alvo de modo específico. Apesar dos inúmeros estudos, relacionados ao tratamento do câncer, há crescentes evidências de que a terapia antisense oligonucleotídeos pode trabalhar em uma maneira sequencial específica, o que nos fornece uma melhor resposta ao tratamento. Em comparação com as outras formas convencionais de tratamento, além da terapia antisense visar a restauração da apoptose, alterar percursos envolvidos na sinalização celular, proliferação, a terapia antisense prevalece devido aos seus oligonucleotídeos apresentarem baixo potencial limiar de toxicidade e seu método consistir no bloqueio da síntese de proteína, fato que ocorre durante o processo de oncogênese.

Embora promissora, a pesquisa ainda tem um longo caminho pela frente, são necessários testes clínicos longos utilizando doses muito altas aplicadas sistematicamente, de maneira que a droga chegue a todos os músculos, para se testar a segurança e a eficácia do medicamento. Entretanto, se após a fase mais ampla e delicada da pesquisa, for comprovado o pleno sucesso do tratamento, ele deverá ser adotado por toda a vida do paciente.

REFERÊNCIAS

BIROCCIO, A.; LEONETTI, C.; ZUPI, G. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene*, v. 2242, p. 6579–6588, 2003.

CALABRETTA, B. Inhibition of Protooncogene Expression by Antisense Oligodeoxynucleotides: Biological and Therapeutic Implications. **Cancer Research**. v. 51, p. 4505-4510, 1991.

CROOKE, S.T. Progress in antisense technology: the end of the beginning. **Methods Enzymol**. v. 313, p. 3-45. 2000.

DAI, H.; JIANG, X.; TAN, G.C.; CHEN, Y.; TORBENSON, M.; LEONG, K.W.; MAO, H.Q. Chitosan-DNA nanoparticles delivered by intrabiliary infusion enhance liver-targeted gene delivery. **Int J Nanomedicine**. v. 1, p. 507-522, 2006.

ELOUAHABI, A.; RUYSSCHAERT, J.M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. **Mol Ther**. v. 11, p. 336-347, 2005.

HO, P.T., PARKINSON, D.R. Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases. **Semin Oncol.** v. 24:187-202,1997.

KREUZER, H. M.ASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia.** 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

KURRECK, J. Antisense technologies, improvement through novel chemical modifications. **European Journal of Biochemistry,** v. 270, p. 1628-1644, 2003.

SHEN, H.M.; YANG, X.C.; YANG, C.; SHEN, J.K. Enhanced therapeutic effects for human pancreatic cancer by application K-ras and IGF-IR antisense oligodeoxynucleotides. **World J Gastroenterol.** v. 14, n. 33, p. 5176-5185, 2008.

ZAMECNIK, P.; STEPHENSON, M. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA.** v. 75, p. 280-284, 1978.