ARTIGO DE REVISÃO

Aplicação de microRNAs na prática clínica*

Application of microRNAs in the clinical practice

Mateus Mendonça Vargas[1], Renata Stolf-Moreira[2]

**Recebido da Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR.*

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A regulação da síntese proteica é essencial para o bom desempenho da função celular; um dos recursos usados no controle desse processo são os microRNAs, pequenos fragmentos de RNA que silenciam o RNA mensageiro. Portanto, mudanças na expressão dessas substâncias estão envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças. Dessa forma, estudam-se maneiras de usar os microRNAs como ferramentas diagnósticas e terapêuticas. O objetivo deste estudo foi rever na literatura os microRNAs e suas perspectivas na área médica.
CONTEÚDO: A biogênese dos microRNAs e sua aplicação na prática clínica, enfatizando a Oncologia, Psiquiatria e Cardiologia.
CONCLUSÃO: Apesar de muitos microRNAs não terem sua função ainda estabelecida, o conhecimento do progresso já feito é fundamental para compreender os avanços terapêuticos e diagnósticos que estão se revelando.
Descritores: Doenças cardiovasculares, MicroRNAs, RNA neoplásico, Transtornos mentais.

SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The regulation of protein synthesis is essential for a good cellular function; one way to control this process is through microRNAs, small fragments of RNA which can silence the messenger RNA. Therefore, alterations on the expression of these molecules are involved in the pathophysiology of several diseases. Thus, ways to use microRNAs as diagnostic and therapeutic tools are being studied. The objective of the present study is to review literature on microRNA and its perspectives in medicine.
CONTENTS: MicroRNAs biogenesis and its applications in the clinical practice, focusing on Oncology, Psychiatry and Cardiology.
CONCLUSION: Even though many microRNAs function is not well established, the knowledge of the progress done is critical to understand the diagnostic and therapeutic advances that are being revealed.
Keywords: Cardiovascular diseases, Mental disorders, RNA neoplasm, MicroRNAs.

INTRODUÇÃO

O dogma central da Biologia Molecular se baseia na informação contida na molécula de DNA, sendo essa expressa na forma de proteínas por meio de dois processos: a transcrição que converte a informação do DNA em uma forma mais acessível, o RNA mensageiro (RNAm) e por meio da tradução converte a informação contida no RNA em proteínas[1]. No entanto, para o bom funcionamento celular é necessário que a quantidade de proteína expressa por esse mecanismo seja controlada, para isso a célula possui diferentes mecanismos como fatores de transcrição e supressão, proteínas que desestabilizam o RNAm ou que reorganizam sequências de DNA próximas a genes[2].
Nos últimos 15 anos, descobriu-se que alguns RNAs também auxiliam no controle da tradução. Esses RNAs foram inicialmente chamados de microRNAs e agem ligando-se ao RNAm, diminuindo sua expressão[3]. Desde então, inúmeras pesquisas buscam compreender melhor suas funções e como manipulá-los. Fire e col.[4] conseguiram introduzir determinados RNAs em uma célula e, assim, inibir a expressão de alguns genes. Hoje, os microRNAs são divididos em três grupos, de acordo com sua forma de inibir o RNAm ou a proteína a que estão associados, sendo eles o microRNA, o endo-siRNA, e o pi-RNA. Destes, o mais bem caracterizado na literatura é o microRNA, ou miRNA[5].
O miRNA é um filamento único de RNA, em média 22 nucleotídeos, proveniente da transcrição de íntrons ou de regiões do genoma não-codificantes[6]. Já foram identificados mais de 3500 miRNAs, dos quais 695 foram encontrados em humanos[5]. Como regulam a expressão gênica, é fundamental para diversas funções celulares, como a diferenciação tecidual, o ciclo celular, a proliferação e a apoptose[7], o que permite inferir que defeitos nesse sistema estão relacionados a uma gama de doenças como câncer, alterações neuropsiquiátricas e neurodegenerativas, problemas cardíacos entre outros[8,9].
Além da participação na etiopatogenia de vários distúrbios, os miRNAs ainda podem contribuir como ferramenta de diagnóstico e de prognóstico; além de abrir um novo caminho para terapêuticas na área médica[10,11]. Cabe ao clínico, dessa forma, conhe-

1. Graduando de Medicina da Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR, Brasil.
2. Professora Doutora do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR, Brasil.

Apresentado em 19 de março de 2012.
Aceito para publicação em 01 de outubro de 2012.
Conflito de interesses: Nenhum

Endereço para correspondência:
Mateus Mendonça Vargas
Av. Robert Koch, 60 – Vila Operária
86038-440 Londrina, PR.
Fone: (43) 3371-2395
E-mail: mateusvargas@hotmail.com

© Sociedade Brasileira de Clínica Médica

cer os avanços realizados nessa área para futuramente aplicá-los na prática.

O objetivo desta pesquisa foi mostrar alguns estudos recentes de miRNAs que envolvem a área da saúde.

DESENVOLVIMENTO

Biogênese e mecanismo de ação

Os genes que contem os microRNAs são transcritos, na maioria dos casos, pela RNA polimerase II, gerando o miRNA primário (pri-miRNA) com algumas centenas de nucleotídeos[5,7] e como os RNAm é acrescido uma cauda de poliadenosinas na porção 3' e um "cap" de 7-metilguanosina na porção 5'[2]. Essa primeira estrutura gerada contém regiões em que os nucleotídeos se pareiam e regiões não pareadas que formam alças[8]. Ainda no núcleo, a Rnase III-tipo Drosha quebra locais de pareamento do pri-miRNA, liberando uma estrutura similar a um grampo de cabelo denominado miRNA precursora (pre-miRNA), que possui aproximadamente 70 nucleotídeos[2,5]. Proteínas relacionadas com o transporte nuclear como a exportina-5 e a Ran-GTP transportam o pré-miRNA para o citoplasma[6,12]. Em seguida, a alça (região não pareada) é removida pela enzima DICER, formando somente um duplex de RNA com 22 pares de nucleotídeos que irão se associar com a proteína Argonaute (Ago). Para finalizar, o complexo proteico denominado RISC separa o duplex, permanecendo o miRNA maduro associado a Ago e a outra metade é degradada. Acredita-se que a instabilidade termodinâmica da região 5' seja a responsável por definir qual metade será o miRNA maduro[5] (Figura 1).

Existem duas maneiras pelas quais os miRNAs silenciam o RNAm: a primeira ocorre quando há uma complementaridade perfeita ou quase perfeita das bases do miRNA com a do RNAm, caso isso ocorra a enzima RISC, que nesse caso estará associada à proteína Argonaute, quebrará a fita de RNAm em duas[7], após a clivagem o miRNA permanece intacto e continua exercendo seu papel modulador[12]. Entretanto, esse mecanismo não é observado com frequência em células de animais, sendo a principal forma de controle da expressão gênica em plantas[6]. A segunda, mais comum nos animais, acontece quando há um pareamento imperfeito entre o miRNA e o RNAm, embora os passos não estejam elucidados. Acredita-se que o complexo miRNA, Ago-2 e RISC transporte o RNAm para compartimentos citoplasmáticos chamados corpos de processamento que é composto por proteínas que possuem afinidade com a Ago-2 e que armazenam e degradam o RNAm; outros estudos, todavia, mostram que o miRNA e suas proteínas associadas possam atuar no controle da tradução do RNAm, impedindo a ligação dos ribossomos ao RNAm, ou interrompendo a tradução após seu início, ou decompondo o "cap" de 7-metilguanosina na porção 5' que funciona como uma proteção contra os mecanismos de processamento[7,8].

É importante ressaltar também que como o miRNA é uma molécula pequena, cada um deles pode apresentar vários RNAm alvos e alguns RNAm necessitam de vários miRNA para inibição. Supõe-se que 30% dos genes de animais sejam alvo de miRNAs[6]. Desta forma, a sub ou superexpressão de um miRNA pode culminar em grandes disfunções celulares, consequentemente teciduais e sistêmicas.

Câncer

Por regularem a expressão gênica, os miRNAs também participam da modulação de oncogenes, genes que ativam o ciclo celular, e supressores tumorais, os quais suprimem a divisão celular[8], sendo mais um fator na patogênese dos tumores.

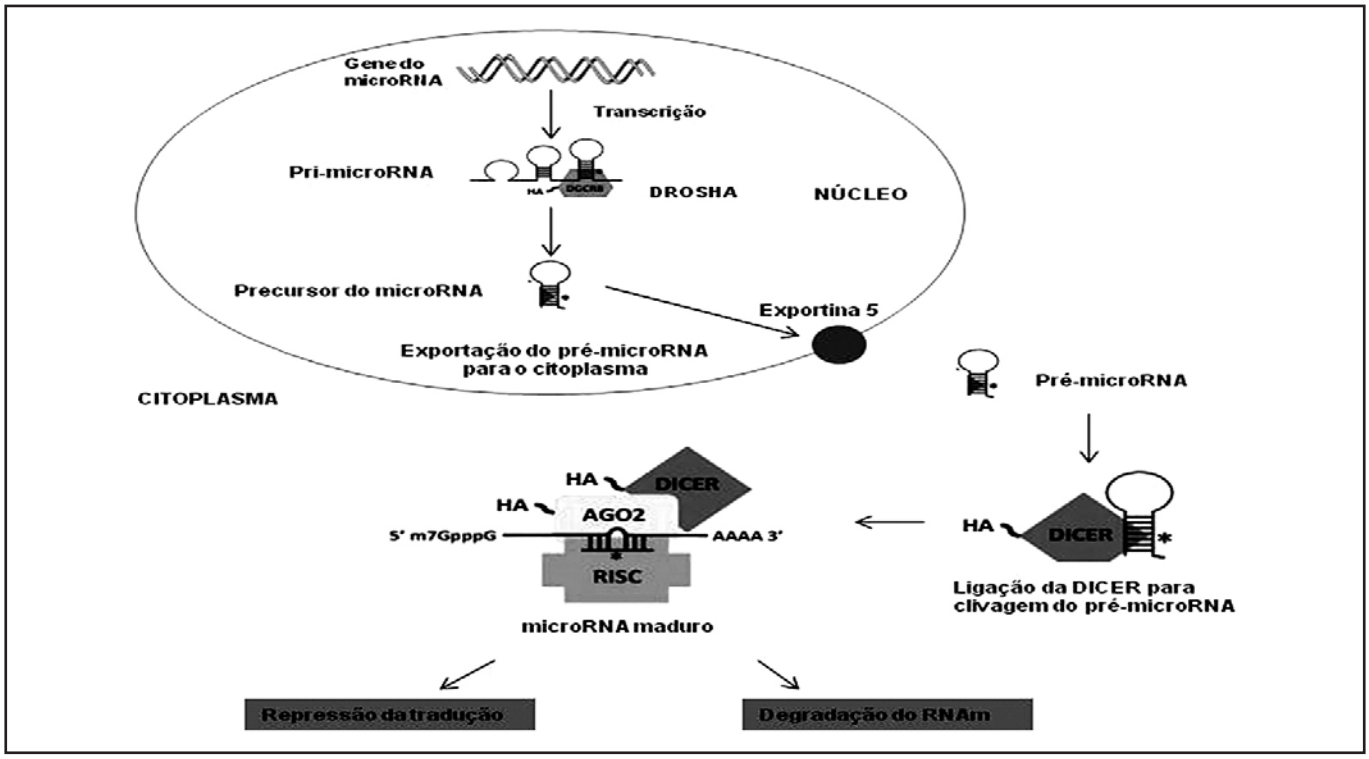

Figura 1 – Processo de formação do microRNA.

As primeiras evidências do envolvimento dos miRNAs em câncer foram feitas por Calin e col.[13], que ao estudar a região 13q14, frequentemente deletada em casos de leucemia linfocítica crônica, perceberam que essa era responsável pelos genes de 2 miRNAs, o miR-15a e o miR16-1, que inibiam a expressão de um oncogene, posteriormente identificado como o antiapoptose BCL-2[2].

Da mesma forma que descrito acima, estudos mostraram que em células cancerígenas a quantidade de miRNA está diminuída[7]. No câncer de pulmão, um dos mais agressivos, foi constada a diminuição de miRNA let-7 que modula a ação dos oncogenes RAS e MYC[8], demonstrou-se também que a superexpressão desse miRNA resultava na inibição do crescimento do câncer[10].

Com relação ao câncer de mama, também foi observada redução de alguns miRNA, como miR-17-5p e o miR145[14]. A menor expressão de miR-126, miR-206 ou miR-335 se relacionam com menor sobrevida, uma vez que nessa neoplasia quanto maior for a discrepância na expressão dos miRNAs, maior o número de linfonodos comprometidos e a invasão vascular. Observou-se também que alguns subtipos do câncer de mama têm uma íntima relação com o estrógeno, este quando ligado ao seu receptor (tipo E_2) desencadeia reações intracelulares que diminuem fatores de transcrição de miRNA, favorecendo o crescimento do tumor[15].

Certos miRNAs, no entanto, têm uma ação oncogênica e sua expressão está aumentada em tumores, pois modulam negativamente supressores tumorais; como é o caso do miR-221 no gliobastoma, do miR-372 e do miR-373 em neoplasia de células testiculares e do miR-221, miR-222 e miR-146 nos tumores de tireoide[8].

Vale ressaltar que como cada tecido apresenta um perfil proteico único, há um padrão de RNAm próprio; dessa forma um mesmo miRNA pode ter papéis opostos, a exemplo do miR-115 que se encontra diminuído no câncer de mama e aumentado no linfoma de células B[2].

Observou-se também que cânceres de cólon e pulmão com mal prognóstico apresentavam perda da heterozigose do braço longo do cromossomo 14, onde está o gene da enzima DICER[10,16]. Com a perda dessa enzima, a produção de miRNA fica prejudicada, gerando uma subexpressão de miRNAs com função supressora tumoral como o let-7, este reduzido associa-se a piores prognósticos de câncer de pulmão e maiores chances de metástase em câncer de mama[15].

Substâncias com o potencial de reduzir ou induzir microRNA estão sendo estudadas como possíveis terapêuticas para o câncer[2]. Em ratos, já foi possível suprimir a expressão de miRNAs com a infusão, por via venosa, de um oligonucleotídeo conjugado com colesterol que continha uma cadeia complementar a um miRNA, a essa nova classe de moléculas deu-se o nome de antagomirs[6].

Doenças psiquiátricas

Estão relacionadas com alterações concomitantes de vários circuitos de sinalização, dessa forma, busca-se nos miRNAs fórmulas que consigam explicar a disfunção na expressão de vários genes e consequentemente encontrar novas terapêuticas[17].

Um estudo desenvolvido por Zhu e col[18], usando bioinformática demonstrou que o miR-346 e o miR-566 estavam relacionados a modulação de diversos genes presentes na esquizofrenia. Após essa primeira investigação, mediu-se os níveis do miR-346 do cérebro de pacientes psiquiátricos e controles e percebeu que estes estavam diminuídos tanto em pacientes esquizofrênicos quanto em pacientes bipolares. O gene desse miRNA é um íntron do gene GRID1, que codifica uma das subunidades do receptor de glutamato, que também está diminuído na esquizofrenia e no transtorno bipolar[17].

O receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) também é controlado por miRNA; e verificou-se que alterações genéticas nesse receptor estavam associadas a baixos níveis de miR-219 e essa condição estaria associada a alterações comportamentais[19].

Outra forma de ação dos miRNAs é no controle do *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), uma substância importante na neuroplasticidade e que se encontra em níveis alterados na depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia[17]. O BDNF tem sua expressão diminuída pelo miR-30a, miR-134 e miR195. Já o miR-132 regula positivamente o BDNF e potencializa os receptores NMDA. Foram encontrados níveis reduzidos de miR-132 no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos e bipolares o que juntamente com a ação do miR-129 ajuda a elucidar porque a via do glutamato está diminuída nessas patologias[20].

Os conhecimentos do papel dos miRNAs em doenças psiquiátricas ainda é restrito e algumas pesquisas da área apresentam resultados conflitantes, dessa forma são necessários maiores estudos para uma melhor compreensão do assunto.

Cardiologia

Cada tecido expressa uma variedade de miRNAs que possibilitará a célula exercer as funções a qual foi estabelecida. Nas células cárdicas o miR-1, miR-133a e o miR-208 têm papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção da função cardíaca[9,21]. Sabe-se também que miRNAs podem permanecer por longos períodos estáveis no plasma. Assim, compararam-se amostras de sangue de pacientes que haviam sofrido infarto agudo do miocárdio (IAM), de pacientes cardiopatas sem IAM recente e de indivíduos sadios, constatou-se que nos pacientes com IAM e nos cardiopatas sem IAM os níveis de miR-1, miR-133a, miR-499 eram significativamente maiores que os do controles, porém o miR-208a só foi encontrado no plasma de pacientes com IAM. Na sequência estabeleceu-se a especificidade e sensibilidade do miR-208 como biomarcador de IAM, obtendo os valores de 100% e 90,9%, respectivamente[22]; além de diagnóstico, este também possui capacidade prognóstica: níveis muito elevados correlacionam-se com menor fração de ejeção do ventrículo esquerdo e maior possibilidade de gerar insuficiência cardíaca e de mortalidade em 6 meses[23]. A vantagem do uso de miR-1 e miR-133 estão na sua detecção precoce no sangue periférico (pico em 156 minutos), mais rapidamente que a troponina I, no entanto podem ser detectados em outras ocasiões, como nas lesões de musculoesquelético[23].

Foi encontrada uma disfunção de miRNAs também na hipertrofia não maligna do coração, uma resposta patológica à hipertensão arterial, isquemia cardíaca, valvopatias e desordens endócrinas[24]. O miR-21 se encontra aumentado nessas condições, pois este favorece a replicação de fibroblastos por inibir a proteína Sprouty, que impede que o fator de crescimento do fibroblasto modifique a membrana celular e gere seu efeito[25]. Em ratos, demonstrou-se que a superexpressão do miR-195 era suficiente para gerar a hipertrofia do miócito cardíaco[24]. Por outro lado, a expressão do

miR-1 e miR-133 apresenta uma relação oposta com a hipertrofia por regularem cascatas de sinalização nos sarcômeros, quando inibidos por antagomirs sustentam a hipertrofia[21,23].
O miR-1 é um miRNA muito expresso nas células precursoras do coração, agindo na diferenciação do tecido. No entanto, em excesso torna-se um fator pró-arrítmico, pois silenciam canais iônicos como o GJA1, KCNJ2, HCN2 e HCN4. Estes últimos estão envolvidos na hiperpolarização de células cardíacas, mantendo assim seu ritmo; o HCN2 é regulado também pelo miR-133[24].

Outras aplicações

Os miRNAs apresentam íntima relação com o sistema imune, sendo que as vias de sinalização de receptores *Toll-like* e de citocinas são reguladas negativamente por miRNAs, ao passo que outros miRNAs podem ativar receptores *Toll-like*[6]. Os miRNAs também estão envolvidos na produção de anticorpos, na diferenciação de linfócitos T e na produção de linfócitos B[26]. Dessa forma, essas substâncias participam do controle tanto da imunidade inata quanto da adaptativa.
Devido a essa regulação da imunidade, miRNAs estão envolvidos em doenças autoimunes[6]. Vários estudos realizados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) não constataram as mesmas alterações em miRNAs, porém todos os estudos observaram uma diferença no padrão dos miRNAs dos portadores de LES em relação aos controles[26]. Na artrite reumatoide (AR) e na osteoartrite foram identificados miRNAs expressos em quantidades anormais; o miR-146a, que induz uma resposta pré-inflamatória, foi encontrado em níveis aumentados no líquido sinovial de ambas as doenças e no sangue periférico de portadores de AR[27].
Os vírus utilizam dos mecanismos inibitórios dos miRNA para regularem a replicação de seu DNA e escaparem dos mecanismos de defesa[6]. O miR-21 age na degradação de RNAm de proteínas virais expressos no início do ciclo e que funcionariam como antígenos, e o miR-LAT inibe a apoptose de neurônios infectados pelo vírus do herpes. Igualmente, o organismo humano utiliza miRNAs para inativar partículas virais e inibir sua replicação[7].
O metabolismo de lipídeos também sofre regulação por microRNAs, desse grupo destaca-se o miR-33 que modula a proteínas carreadoras de ácidos graxos para a mitocôndria, controlando assim o processo de β-oxidação. O transporte de colesterol é outro alvo desses miRNA; o ABCA1, um transportador de colesterol para fora da célula tem sua expressão diminuída pelo miR-33, diminuindo os níveis de HDL colesterol, contudo esse mecanismo não foi comprovado em humanos, nos quais parece haver uma regulação da proteína NPC1que age juntamente com a ABCA1 no efluxo de colesterol. Dessa forma, acredita-se que o uso de um inibidor do miR-33 possa agir na prevenção ou tratamento de doença coronariana e esteatose hepática[28].
Dentre as aplicações práticas dos miRNAs, o uso como biomarcador para diagnóstico e prognóstico de doenças apresenta grandes perspectivas. Graças ao seu tamanho e proteínas associadas, esta molécula é estável em fluidos como sangue e urina e alterações de seus níveis têm obtido resultados compatíveis com as condições clínicas do paciente, especialmente em cânceres[10,15].
Como medida terapêutica, investiga-se a utilização de antagomirs, que são fitas de RNA complementares ao miRNA alvo que geram um efeito bloqueador; ou infusão de partículas semelhantes à miRNAs, os iRNAs que possuem a capacidade de penetrar nas células e inibir os RNAm específicos. Entretanto, essas alternativas podem gerar diversos efeitos colaterais, pois antagomirs e iRNAs podem associar-se, com uma complementaridade parcial, a alvos inesperados e desencadear reações adversas, além disso, essas moléculas podem provocar respostas imunes, gerando inflamação e morte tecidual[6].

CONCLUSÃO

O genoma humano contem centenas de miRNAs, porém as funções fisiológicas e patológicas deles só estão sendo elucidados agora[6]. As recentes descobertas possibilitam inúmeras aplicações práticas em diversos setores. Já foram identificadas formas de diagnóstico e prognóstico baseadas nessas moléculas, e terapêuticas estão sendo testadas em animais.
Embora os avanços possuam grandes perspectivas na área da saúde, são necessárias mais pesquisas a fim de encontrar marcadores mais sensíveis e específicos e avaliar a segurança do uso de miRNA em humanos. É inegável, no entanto, que as aplicações dessas substâncias apresentem um grande potencial no campo da saúde humana, cabendo aos profissionais da área conhecer e atualizar-se sobre as tecnologias a respeito dos miRNAs.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Francisco Enguita do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa pela sua colaboração no embasamento teórico dos autores.

REFERÊNCIAS

1. Lewin B, (editor). Genes VIII, 8th ed. Pearson Prentice Hall: Upper Saddle River; 2008. p. 988.
2. Dalmay T. MicroRNAs and cancer. J Intern Med. 2008;263(4):366-75.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin14. Cell. 1993;75(3):843-54.
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998;391(6669):806-11.
5. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):126-39.
6. Yang M, Mattes J. Discovery, biology and therapeutics potential of RNA interference, microRNA and antagomirs. Pharmacol Ther. 2008;117(1):94-104.
7. Bushati N, Cohen SM. microRNA Functions. Annu Rev Cell Dev Biol. 2007;23:175-205.
8. Amaral BA, Nonaka CFW, Freitas RA, et al. MicroRNAs – Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. Odontologia Clínica-Científica. 2010;9(2):105-09.
9. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. Eur Heart J. 2010;31(6):659-66.
10. Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. Cancer Sci. 2005;96(2):111-5.
11. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. Int J Cancer. 2011;128(3):608-16.

12. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524-9.
14. Klinge CM. Estrogen regulation of MicroRNA expression. Curr Genomics. 2009;10:169-83.
15. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. Mol Oncol. 2010;4(3):230-41.
16. Young J, Leggett B, Ward M, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 occurs in advanced colorectal carcinomas. Oncogene. 1993;8(3):671-5.
17. Miller BH, Wahlestedt C. MicroRNA dysregulation in psychiatric disease. Brain Res. 2010;1338:89-99.
18. Zhu Y, Kalbfleisch T, Brennan MD, et al. A MicroRNA gene is hosted in an intron of a schizophrenia-susceptibility gene. Schizophr Res. 2009;109(1-3):86-9.
19. Deng Z, Sobell JL, Knowles JA. Epigenetic alterations in schizophrenia. Focus. 2010;8:358-65.
20. Mellios N, Huang HS, Grigorenko A, et al. A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. Hum Mol Genet. 2008;17(19):3030-42.
21. Catalucci D, Latronico MVG, Condorelli G. MicroRNAs control gene expression: importance for cardiac development and pathophysiology. Ann N Y Acad Sci. 2008;1123:20-9.
22. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. Nucleic Acids Res. 2011;39(16):7223-33.
23. Salic K, De Windt LJ. MicroRNAs as biomarkers for myocardial infarction. Curr Atheroscler Rep. 2012;14(3):193-200.
24. Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. Clin Sci. 2008;114(12):699-706.
25. Lim J, Wong ES, Ong SH, et al. Sprouty proteins are targeted to membrane ruffles upon growth factor receptor tyrosine kinase activation. Identification of a novel translocation domain. J Biol Chem. 2000;275(42):32837-45.
26. Thai TH, Christiansen PA, Tsokos GC. Is there a link between dysregulated miRNA expression and disease? Discov Med. 2010;10(52):184-94.
27. Alevizos I, Illei GG. MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2010;6(7):391-8.
28. Fernández-Hernando C, Suárez Y, Rayner KJ, et al. MicroRNAs in lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 201;22(2):86-92.