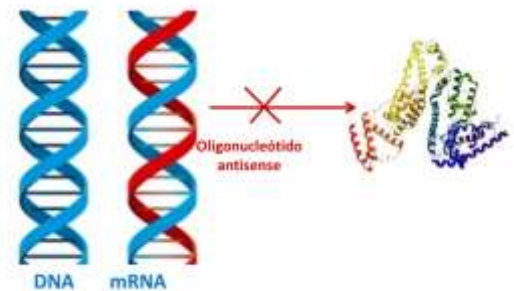


OPÇÕES TERAPÊUTICAS ATUAIS IIB/V: TERAPIA ANTISENSE

A **terapia antisense** baseia-se no uso de **oligonucleótidos** (pequenos fragmentos de ácido nucleico (13-25 nucleótidos), **antisense**, complementares a uma sequência específica de um gene, tendo por objetivo a sua ligação ao mRNA do mesmo e evitar assim a produção de uma proteína mutada.

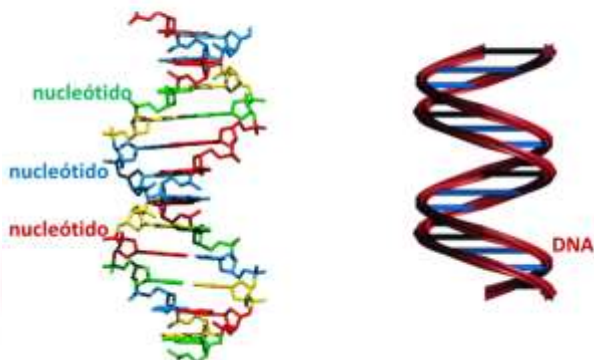


Terapia antisense



O QUE SÃO OS NUCLEÓTIDOS?

Nucleótido → Ácido nucleico



Os nucleótidos são as unidades que constituem o DNA e o RNA. São constituídos por uma **base azotada**, uma **pentose** (açúcar cíclico com 5 átomos de carbono) e um grupo fosfato, unidos por ligações covalentes (fortes). As bases azotadas dividem-se em **purinas** (adenina e guanina) e **pirimidinas** (timina, citosina e uracilo).

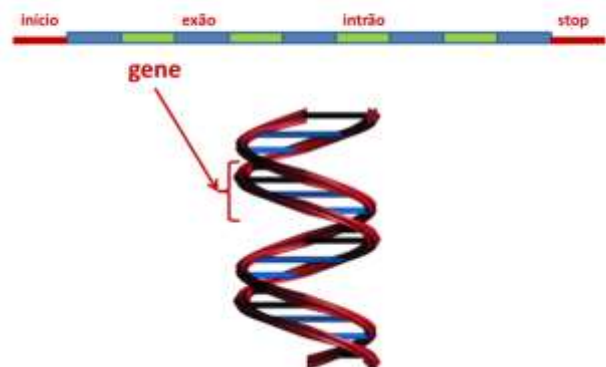
Assim, existem 5 nucleótidos diferentes no DNA e RNA: adenina, guanina, timina, citosina e uracilo.

Uma longa cadeia de muitos nucleótidos forma um **ácido nucleico**. No ácido desoxirribonucleico (**DNA**) a pentose é a desoxirribose, enquanto no ácido ribonucleico (**RNA**) é a ribose.

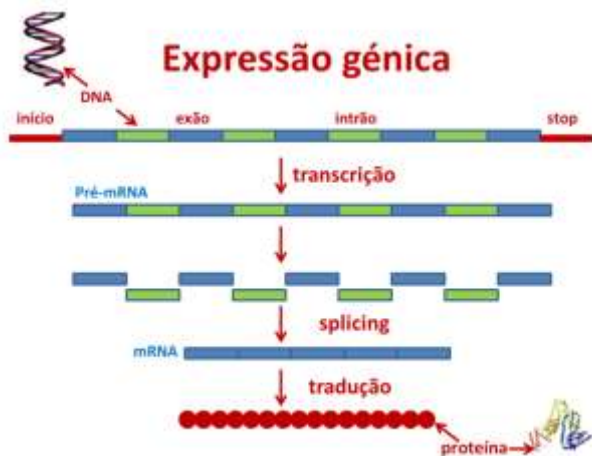
Ambos (DNA e RNA) contêm a informação genética para a síntese de todas as proteínas celulares.

Um **gene** é uma longa cadeia de DNA, na qual é possível distinguir exões e intrões. Os exões são as regiões codificantes que vão fornecer a informação para a síntese de uma proteína, enquanto os **intrões** são regiões não codificantes, que se intercalam no gene.

Gene: exões + intrões



COMO SE DÁ A TRANSFERÊNCIA DA INFORMAÇÃO CONTIDA NO DNA PARA QUE OCORRA A SÍNTESE DAS PROTEÍNAS?



De forma muito resumida, uma vez que este processo é muitíssimo mais complexo, esta transferência de informação desde o DNA até à formação de uma proteína ou processo de **expressão gênica** realiza-se com a intervenção de diferentes tipos de RNA.

A sequência de DNA de um gene é transcrita e forma-se o **RNA mensageiro (mRNA)**. A uma determinada base de DNA, purina ou pirimidina, corresponde outra complementar de RNA. As bases vão-se ligando umas às outras o que origina a formação de uma cadeia à medida que o DNA é “lido”.

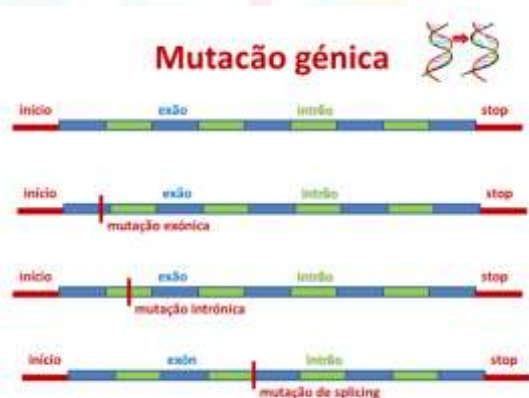
Desta forma, o **RNA contém a informação genética do DNA** que é necessária para a formação da proteína. Seguidamente, com recurso a uma maquinaria celular específica, a cadeia de RNA dá origem à formação uma cadeia de aminoácidos, ou seja, a uma proteína.

No processo de formação do mRNA, os intrões são eliminados, num processo denominado **splicing**, mantendo-se no mRNA apenas os **exões**, cuja informação é utilizada para síntese da proteína.

O QUE ACONTECE QUANDO EXISTE UMA ALTERAÇÃO OU MUTAÇÃO NA SEQUÊNCIA DE DNA?

Uma mutação num gene dará lugar a uma proteína anómala. Se a proteína em causa tem um papel importante no metabolismo vai ocorrer um **erro inato do metabolismo (EIM)**.

AS MUTAÇÕES ACONTECEM NOS EXÕES OU TAMBÉM PODEM OCORRER NOS INTRÕES DO DNA?



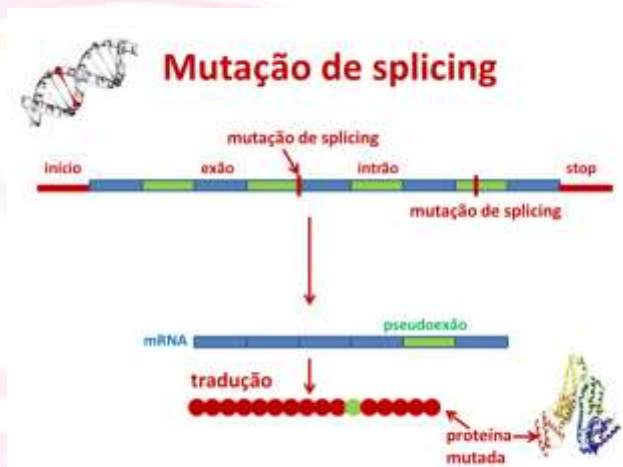
As mutações podem acontecer em qualquer ponto da sequência de DNA, com consequências diferentes de acordo com o seu maior ou menor efeito sobre a síntese da proteína.

Quando, numa de zona de splicing de um intrão, ocorre uma **inserção** (é incluído um nucleótido que não devia estar na cadeia normal de DNA), ou uma **deleção** (falta algum nucleótido que devia estar na cadeia normal de DNA) de um ou mais nucleótidos, ou surge uma substituição de uma base, pode acontecer que um ou mais intrões não sejam eliminados e que, portanto, se expressem no mRNA como se fossem exões, dando lugar a proteínas anómalas devido a mutações de **splicing**.

AS MUTAÇÕES DE SPLICING SÃO CAUSA FREQUENTE DE EIM?

Constituem aproximadamente 10% das mutações descritas nas bases de dados dos genes humanos.

Algumas estão localizadas nas **junções exão-intrão** e outras no **interior dos intrões**, e podem provocar o aparecimento de sequência anómalas correspondentes a intrões ou **pseudoexões (falsos exões)** no mRNA, com graves consequências na formação da proteína. Estão descritas com frequência em **acidémias orgânicas, doenças lisossomais, defeitos congénitos da glicosilação e deficiências de tetrahydrobiopterina**.



Apresentam a desvantagem de que, em certas ocasiões, não se detetam numa análise mutacional de rotina, pelo que podem não ser identificadas e complicar o estudo genético dos doentes que as têm.

Recentemente tem vindo a ser estudada a utilização de **oligonucleótidos** antisense para corrigir a função génica através da eliminação da sequência intrónica ou pseudoexão.

O QUE SÃO OLIGONUCLEÓTIDOS?

São pequenos fragmentos de ácido nucleico (13-25 nucleótidos) que se podem utilizar como **agentes terapêuticos** ou também para estudar a **função de um gene**.

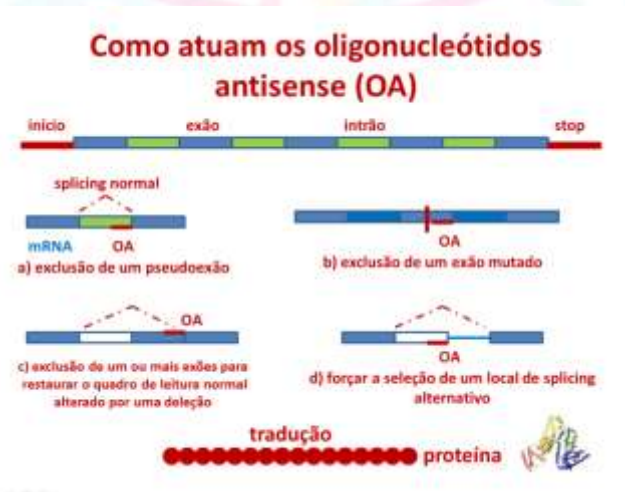
PORQUE SE CHAMAM OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENSE ?

Porque são desenhados para que sejam **complementares** a uma sequência específica de um gene, ou seja, para que tenham a capacidade de se ligar a uma determinada sequência de RNA mensageiro (mRNA), evitando assim a expressão da informação anómala, isto é, a produção de uma **proteína anómala**.

COMO ATUAM OS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENSE?

Podem atuar :

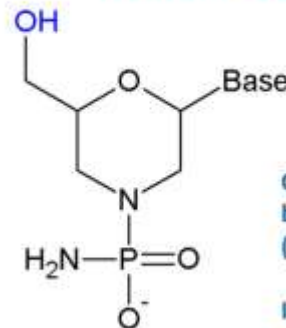
- Excluindo um pseudoexão** originado por uma mutação num local de junção exão-intrão
- Induzindo a **“eliminação”** ou **“silenciamento”** de exões que contêm uma mutação.
- Saltando um ou mais exões** que flanqueiam uma deleção de forma a alterar a leitura do mRNA eliminando a zona mutada.
- Forçando a seleção de **um local de splicing alternativo**.



QUE PROBLEMAS APRESENTA A TERAPIA ANTISENSE?

- Os oligonucleótidos apresentam instabilidade devido à sua rápida degradação por nucleases (enzimas que existem nas células normais e cuja função é digerir as cadeias de ácidos nucleicos). Este problema tem sido ultrapassado com o desenvolvimento de oligonucleótidos modificados, como os **derivados de morfolino**, que são muito estáveis “in vivo”, apresentam grande afinidade para o alvo e potente atividade biológica.
- A administração dos oligonucleótidos antisense requiere sistemas de transporte que sejam capazes de libertá-los intracelularmente, onde devem desempenhar a sua função. Alguns deles, como os péptidos, podem desencadear uma resposta imune (ativação do sistema imune que nos defende de agentes potencialmente nocivos) que se deve evitar. O tratamento realiza-se mediante uma **administração continuada**, de modo, que esta reação imunológica deve ser evitada.
- A maioria dos oligonucleótidos antisense acabam por acumular-se no fígado e no rim, o que é importante para os EIM que afetam principalmente estes órgãos, como as acidúrias orgânicas, aminoacidopatias, doenças lisossomais e peroxissomais.
- Há que considerar o possível efeito tóxico da administração a longo prazo dos oligonucleótidos em doses altas e repetidas, uma vez que os doentes têm de ser tratados ao longo da vida.

Unidade de morfolino



Os oligómeros de morfolino bloqueiam pequenas regiões (≈25 bases) do RNA.

Impedem ou modificam a expressão da proteína

QUAL É O ESTADO ATUAL DESTA TERAPIA?

Estado atual da terapia antisense



Cultura de fibroblastos

Acidémias propiônica e metilmalônica, deficiência da fosfomanutase (CDG-1a), Niemann-Pick C, homocistinúria (CblE)



Fase clínica: distrofia muscular de Duchenne
albinismo tipo I.

Modelos animais



Aplicou-se com êxito em **linhas celulares de doentes** em cultura e em **modelos animais** em diferentes doenças metabólicas.

Na **distrofia muscular de Duchenne** está a ser utilizada em ensaios clínicos em humanos, embora a sua administração seja feita diretamente no músculo.

São necessários oligonucleótidos de nova geração com melhor afinidade para o alvo, melhor bioestabilidade e farmacocinética (tempo de vida média no corpo humano, velocidade de eliminação...) otimizada.

Também está a ser investigada a sua aplicação em doenças infecciosas e no cancro.

QUAIS AS VANTAGENS E AS DESVANTAGENS DA TERAPIA ANTISENSE?

O mRNA é transcrito no seu ambiente natural e ao abrigo dos mecanismos celulares de controle da expressão. Neste aspeto, esta intervenção é mais fácil do que a terapia génica clássica.

Por outro lado, o facto de se basear na modulação do processo de splicing, faz com a terapia antisense seja **específica para um gene e um tipo de mutação**, o que requer o seu desenvolvimento e otimização de forma individualizada.

Considerando que os EIM são **doenças raras**, esta situação dificulta a realização de ensaios clínicos para os quais é necessário um grande número de indivíduos. São necessários **estudos multicêntricos** para a fase III dos ensaios clínicos.



Projeto: As Doenças Metabólicas Raras em Português, um projeto APCDG & Guia Metabólica.

Apoio económico: "Para ti, sempre: um CD de música, uma vida CDG", coordenado pela APCDG em 2014 e realizado em conjunto com famílias, amigos e profissionais CDG.

Coordenação da tradução: Vanessa Ferreira (Associação Portuguesa CDG e outras Doenças Metabólicas Raras, APCDG, Portugal), Mercedes Serrano e Maria Antónia Vilaseca (Guia Metabólica).

Tradução: Sandra Catarina Alves Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética Humana. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Porto, Portugal



Passeig Sant Joan de Déu, 2 08950
Esplugues de Llobregat
Barcelona, Spain
Tel: +34 93 203 39 59
www.hsjdbcn.org /
www.guiametabolica.org
© Hospital Sant Joan de Déu. All rights reserved.