



Terapia Genética I

Fábio Terabe

Residente em Cirurgia Oncológica, Hospital do Câncer A.C. Camargo

O princípio básico da terapia gênica é a transferência de material genético (transgene) que confere efeito terapêutico direto, através do produto do transgene, ou indireto, como por exemplo, através da ativação de uma pró-droga.¹ Dentre as formas de terapia gênica estão: a inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos; a alteração fenotípica da célula para torná-la antigênica e a inserção de gene estranho a célula para torná-la susceptível a outras terapias.

O primeiro relato de terapia gênica ocorreu nos Estados Unidos em 1989. Em 1990, foi aprovado o primeiro estudo clínico utilizando um gene funcional (tratamento da deficiência de adenosina deaminase). Até maio de 2000, segundo dados do NIH e do FDA, foram desenvolvidos 464 estudos clínicos com terapia gênica, a maioria de Fase I, sendo 62% relacionados ao tratamento do câncer.^{2,3}

A terapia genética pode ser realizada no nível somático ou germinativo. A terapia genética somática envolve a modificação do genoma somente nas células somáticas. A terapia genética germinativa envolve a alteração de todas as células do organismo. Apesar da terapia germinativa ser usada experimentalmente, ainda não está disponível para seres humanos.⁴

A terapia gênica envolve as seguintes etapas:

- ✓ Pesquisa básica em genética molecular;
- ✓ diagnóstico clínico;
- ✓ comprovação e complementação do diagnóstico clínico pelo diagnóstico molecular;
- ✓ construção dos vetores;
- ✓ teste *in vitro* e *in vivo* para avaliar a eficiência e a segurança dos vetores;
- ✓ produção dos vetores;
- ✓ aplicação clínica e avaliação dos resultados.

Terapia Genética I
pg 1-4

Programação das
Reuniões
pg 2



GBETH Newsletter

É uma publicação semanal distribuída aos sócios do Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários.

Sede

R José Getúlio, 579 cjs 42/43
Aclimação São Paulo - SP
CEP 01503-001

E-mail

gbeth2003@yahoo.com.br

Grupo de Discussão
<http://br.yahoo.groups>

Editor

Erika Maria M Santos

Diretoria Presidente

Benedito Mauro Rossi

Vice-Presidente

Gilles Landman

Diretor Científico

Jose Cláudio C da Rocha

Secretário Geral

Fábio de Oliveira Ferreira

Primeira Secretária

Erika Maria M Santos

Tesoureiro

Wilson T Nakagawa

Conselho Científico

Beatriz de Camargo

Maria Aparecida Nagai

Maria Isabel W Achatz

Paulo Eduardo Pizão

Samuel Aguiar Jr

Conselho Fiscal

Titulares

André Lopes Carvalho

Gustavo Cardoso Guimarães

Stênio de Cássio Zequi

Suplentes

Fábio José Hadad

Mariana Moraes C Tiozzi

Milena J S F L Santos

Continuação Terapia Genética I

Escolha do vetor

A escolha do vetor é um aspecto fundamental da terapia genética. O vetor ideal deve preencher os seguintes requisitos: permitir a inserção de DNA de forma ilimitada; ser facilmente produzido; ser direcionado para tipos específicos de células; não permitir a replicação autônoma de DNA; permitir expressão gênica prolongada e não ser tóxico ou imunogênico.

A transfecção de DNA na célula pode ser obtida através de vários métodos físicos ou químicos, geralmente são métodos pouco eficientes. Dentre os métodos físicos estão a microinjeção direta (DNA/plasmídeo); a eletroporação *in situ* (uma alteração no campo elétrico leva a alteração da permeabilidade da membrana, permitindo a introdução do DNA) e a injeção balística de DNA (com a utilização de partículas de ouro ou tungstênio). Os métodos químicos envolvem a utilização de vetores lipossomais associados ao DNA; fostato de cálcio e dextran.¹

A utilização de vetores virais (transdução) é um método geralmente mais eficiente. Uma vez na célula, o vírus utiliza o metabolismo celular para completar o ciclo de replicação.¹

Para utilização de vetores virais é necessária a deleção de regiões genômicas dispensáveis para a introdução dos genes terapêuticos. A manipulação do genoma do vírus deve levar sua incapacitação de replicação no hospedeiro.¹

Os vetores virais utilizados são: retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associado e o herpes vírus. Os retrovírus são utilizados em diversos estudos clínicos e foram os primeiros a serem utilizados na terapia gênica. Este vetor tem uma integração estável ao genoma do hospedeiro, entretanto, requer replicação celular. Os lentivírus são membros da família retrovírus e não necessitam de replicação celular. Tem sido utilizados em modelos animais para o tratamento de doenças como as mucopolissacaridoses, a leucodistrofia e a doença de Parkinson.

Programação das Próximas Reuniões

Dia/Horário: Terças-feiras das 9 às 10 horas

Local: Sala de Reuniões da Pediatria

Data	Tema	Coordenador
26/08/2003	Guidelines dos Tumores Hereditários	Mariana Moraes

Os vetores adenovirais também não necessitam de replicação do DNA e permitem a inserção de grandes quantidades de DNA. Possui tropismo para tecidos neurais e respiratórios. Apresentam algumas desvantagens: tem uma expressão transitória (inferior a quatro semanas) e levam a respostas imunes. Os vetores adeno-associados necessitam de outro vírus para infectar a célula e podem carregar grande quantidade de transgene. Esses vetores têm tropismo por uma grande variedade de tecidos (SNC, fígado, pulmão, sistema vascular e hematopóietico), entretanto, pode ocorrer replicação viral incontrolada. Têm sido utilizados no tratamento da hemofilia B. Finalmente, o vírus do herpes simples possui um tropismo para células neurais e tem maior capacidade de carregamento de DNA.^{1,2,4}

Métodos de introdução do vetor no hospedeiro

Após a incorporação do DNA ao vetor é necessário introduzi-lo no hospedeiro. Existem métodos realizados *ex vivo* e *in vivo*. O método *ex vivo* é realizado com a coleta das células alvo, transferência do gene e transplante das células no hospedeiro. Neste método, tanto o tipo de célula transformada, como as condições do ambiente, são definidas. O método *in vivo* consiste na introdução do vetor diretamente no hospedeiro. Apesar de possuir maior facilidade técnica, o método *in vivo* não permite controle das células transformadas, o que pode levar a alteração de células indesejadas. O primeiro estudo clínico utilizando o método *in vivo* foi para o tratamento da fibrose cística.⁴

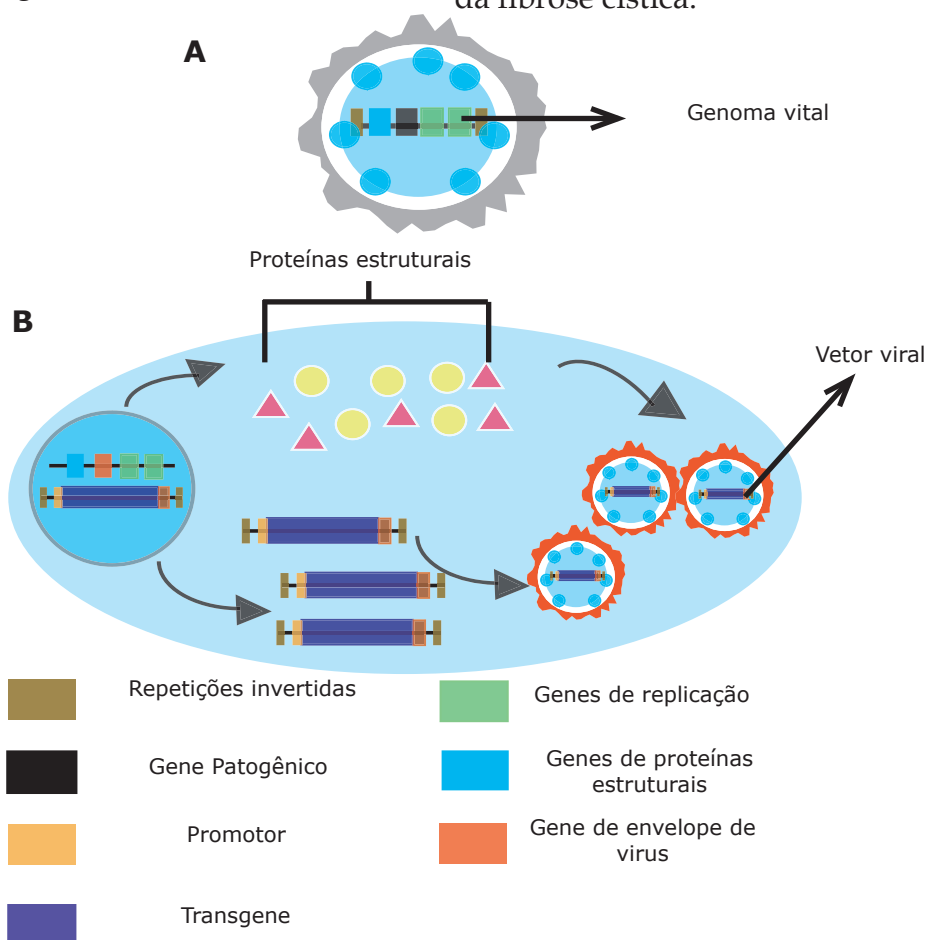


Figura 1. Convertendo vírus em vetor. a - diagrama esquemático de um vetor viral; b - um pacote contendo genes de proteínas estruturais e de proteínas que são necessárias para replicação do genoma do vetor é introduzido na célula. Genes patogênicos e seqüências necessárias para a formação do capsídeos são eliminadas.

Conseqüências adversas e obstáculos da terapia genética

Um dos grandes problemas da terapia genética é a resposta do sistema imune do hospedeiro. A resposta imune pode ser direcionada a nova proteína ou ao vetor. A resposta imune a proteína pode ocasionar sua inativação ou pode levar a uma resposta auto-imune aos tecidos transduzidos. A resposta imune ao vetor é dependente da dose do vetor e da variabilidade individual. O caso mais notório de resposta imune ao vetor ocorreu em 1999, quando um paciente de 18 anos que participava de um estudo clínico relacionado ao tratamento de uma deficiência de omitina transcarbamilase, foi a óbito por uma resposta inflamatória sistêmica. Esta reação foi atribuída ao vetor, um adenovírus.⁵

Outra conseqüência adversa da utilização de vetores virais na terapia gênica é a recombinação do genoma viral com seqüências do hospedeiro, o que pode levar a reativação, com replicação viral, e conseqüentemente destruição celular.⁵

A mutagênese causada pela integração viral é uma outra possível conseqüência adversa, apesar de Thomas et al⁵ considerarem que o risco do desenvolvimento de câncer ser desprezível, uma vez que o câncer é resultado de múltiplas mutações. Em 2002 foi descrito o desenvolvimento de uma doença linfoproliferativa *leukemia-like* em crianças que participavam de um estudo clínico para o tratamento de uma imunodeficiência severa.⁵

Um dos maiores obstáculos à terapia genética é a farmacocinética. Dentre os fenômenos que devem solucionados estão: a distribuição do vetor; a fração do vetor captada pelas células-alvo; o tráfego do material genético nas organelas celulares; a taxa de depuração ou degradação do DNA; o nível e a estabilidade do mRNA e da proteína que são produzidos; a compartimentalização intracelular da proteína e a destinação da proteína.

Além desses fatores, o direcionamento do transgene para as células-alvo é um outro obstáculo para a eficiência da terapia genética. O aumento da eficiência do vetor viral em infectar células específicas pode resultar na redução de respostas imunes devido a redução na quantidade necessária de vetor para atingir o efeito terapêutico. Algumas técnicas têm sido empregadas para aumentar o direcionamento do transgene: *pseudotyping* (alteração no tropismo do vetor pela substituição de proteínas receptoras), utilização de anticorpos bi-específicos e alteração dos genes do capsídeo.⁵

Referências Bibliográficas

- 1 - Gojo S, Yamamoto S, Patience C, LeGuern C, Cooper DKC. Gene therapy - its potential in surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 2002; 84: 297-301.
- 2 - Heo DS. Progress and limitation in cancer gene therapy. *Gen Med* 2002; 4 (Suppl): 52-5.
- 3 - Palmer DH, Chen MJ, Kerr D. Gene therapy for colorectal cancer. *Br Med Bull* 2002; 64: 201-25.
- 4 - Boulanger SC, Caty MG, Glick PL. Molecular biology for the pediatric surgeon. *J Ped Surg* 1999; 34: 917-30.
- 5 - Thomas CE, Ehhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Gen* 2003; 4: 346-58.