

## TERAPIA GÊNICA – UMA REVISÃO DE LITERATURA

JOSIVALDO EMERICK DA VEIGA<sup>1</sup>; NEUSA DE OLIVEIRA ARAUJO<sup>2</sup>; SERGIAN VIANNA CARDOZO<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas (Escola de Ciências da Saúde, Unigranrio); <sup>2</sup>Profissional Farmacêutica Autônoma; <sup>3</sup>Docente do Curso de Ciências Biológicas (Escola de Ciências da Saúde, Unigranrio), Rua Professor José de Souza Herdy, 1160. CEP 25071-200, Duque de Caxias, RJ. \* [sergianvc@gmail.com](mailto:sergianvc@gmail.com)

### RESUMO

Este estudo objetiva analisar a Terapia Gênica, um tratamento para doenças hereditárias que se caracteriza pela inserção de um gene fundamental dentro da célula humana a fim de conferir uma nova função ou melhorar os efeitos de um gene anormal. Há dois tipos de técnicas utilizadas na terapia gênica: a germinativa, que se caracteriza pela introdução do material genético nos espermatozoides ou óvulos (células germinativas), e a somática, pela qual se introduz o material genético em quaisquer outras células. Quando os genes estão alterados, as proteínas codificadas por eles são incapazes de desenvolver sua função biológica normal, dando origem às “desordens genéticas”. A Terapia Gênica é o meio de colocar a informação correta de volta nas células. De certa forma, funciona como um transplante de genes. A chave do sucesso da terapia gênica é a entrega do gene correto para as células que dele necessitam.

**Palavras-chave:** *Terapia Gênica, Genética.*

## GENE THERAPY – A REVIEW OF LITERATURE

### ABSTRACT

This study aims to analyze the Gene Therapy, a treatment for hereditary diseases characterized by the insertion of a key gene in the human cell in order to provide a new feature or enhance the effects of an abnormal gene. There are two types of techniques used in gene therapy: the germ, which is characterized by the introduction of genetic material in sperm or ova (germ), and somatic, "which introduces genetic material into any other cells. When genes are altered, the proteins encoded by them are unable to develop its normal biological function, leading to "genetic disorders". Gene Therapy is the means to put back the correct information in cells. In some ways, functions as a gene transplant. The key to successful gene therapy is delivering the correct gene to the cells that need it.

**Keywords:** *Genic Therapy, Genetic.*

### INTRODUÇÃO

A terapia gênica (TG) é um tratamento para doenças hereditárias que se caracteriza pela inserção de um gene funcional dentro da célula humana a fim de conferir uma nova função ou melhorar os efeitos de um gene anormal. Atualmente, 5% das crianças no mundo nascem com uma doença hereditária ou congênita e quase 40% dos adultos são geneticamente predispostos a desenvolver doenças comuns, como câncer, diabetes e doenças do coração, entre outras. Em países desenvolvidos, mesmo submetidos a melhores condições, 25% dos bebês com menos de um ano de idade são acometidos por doenças genéticas. O índice cai para 23% em crianças entre o primeiro e o quarto ano de vida (ZILLI, 2003).

Há dois tipos de técnicas utilizadas na terapia gênica: a germinativa, que se caracteriza pela introdução do material genético nos espermatozoides ou óvulos (células germinativas), e a somática, pela qual se introduz o material genético em quaisquer outras células (SOUZA, 2000).

Quando os genes estão alterados, as proteínas codificadas por eles são incapazes de desenvolver sua função biológica normal, dando origem às “desordens genéticas”. A Terapia Gênica é o meio de colocar a informação correta de volta nas células. De certa forma, funciona como um transplante de genes. A chave do sucesso da terapia gênica é a entrega do gene correto para as células que dele necessitam (CELESTE, 2007). Na maioria dos estudos de Terapia, um gene normal é colocado dentro do genoma para substituir um gene anormal, causador de alguma

doença. A molécula carreadora, denominada vetor, é usada para levar o gene terapêutico para as células-alvo do paciente. Atualmente, o vetor mais comum é o vírus, alterado geneticamente para carrear o DNA humano normal. Os cientistas têm tentado tirar vantagem da capacidade do vírus de infectar a célula humana, porém, no caso da terapia gênica, o genoma do vírus é modificado para remover os genes causadores de doença e inserir os de interesse terapêutico (DURBANO 2005).

O vetor viral, portanto, leva o material contendo o gene humano terapêutico para dentro da célula-alvo. A geração de uma proteína funcional, produto do gene terapêutico, restabelece a célula-alvo, o que pode representar a cura da doença. Condições ou desordens que surgem de mutações em um único gene são os melhores candidatos para terapia gênica. Infelizmente, desordens multigênicas ou multifatoriais, tais como doenças do coração, pressão alta, mal de Alzheimer, artrite e diabetes, seriam especialmente difíceis de serem tratadas usando essa terapia, pois são causadas por efeitos combinados de variações em muitos genes. Sendo assim este trabalho teve por objetivo descrever a aplicabilidade da terapia gênica em seu âmbito geral discutindo a difusão de diversos conceitos da terapia gênica.

## MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa teórica empregará o método bibliográfico, através da pesquisa a artigos de revista e da Internet, bem como livros pertinentes à temática abordada.

Para a melhor compreensão do objetivo da presente pesquisa, aquilatando-se seu real foco, faz-se necessário a correta utilização do método. Após a leitura e fichamento de textos especializados, procederam-se à análise, interpretação e discussão dos mesmos, incluindo-se nesse rol, a comparação dos dados levantados. De acordo com Severino (2002): "a indução ou o raciocínio indutivo é uma forma de raciocínio em que o antecedente são dados e fatos particulares e o conseqüente uma afirmação mais universal".

## REVISÃO DE LITERATURA

Durante muitos anos o diagnóstico genético foi baseado apenas em critérios clínicos e em teste bioquímicos de produtos genéticos ou da ausência de determinados genes. Os critérios clínicos são ambíguos e muita das vezes demora anos para desenvolverem, gerando longos períodos de incerteza. Os testes bioquímicos são geralmente

estudos caros, que requerem procedimentos invasivos, podendo ter resultados equívocos. Os métodos moleculares utilizados atualmente evitam esse grau de incerteza. Os avanços adquiridos na área de métodos diagnósticos genéticos impulsionaram também avanços na área de terapia gênica (NUNES, 2005).

A terapia gênica é uma estratégia terapêutica que utiliza a técnica de transferência de material genético para modificar o genoma da célula-alvo "in vivo", permitindo a expressão do gene transferido. Os conhecimentos adquiridos com a terapia gênica estimularam estudos em diferentes áreas da medicina. Em cardiologia há inúmeras aplicações da terapia gênica, mas essa fascinante terapêutica tem dificuldades e limitações (KRIEGER, 2001).

Nos últimos anos, a medicina decidiu enfrentar um novo desafio muito mais ambicioso com a ajuda da engenharia genética. A ciência entraria em uma nova fase: a da previsão de doenças. Ela começou quando a dupla de cientistas James Watson e Francis Crick decifrou a estrutura do DNA, em 1953. Já é possível saber se o DNA de uma pessoa acusa a predisposição a certos tipos de câncer e, a partir desta constatação, aplicar um tratamento preventivo no paciente. Num futuro que parece não estarem tão distante, várias outras doenças geneticamente programadas para aparecer poderão ser tratadas ainda antes de começar a se manifestar. Se aposta hoje em dia que, no século 21, com o mapeamento do DNA de um embrião recém-fecundado, será possível atacar males como a fibrose cística ou a síndrome de Down. Estas novas possibilidades acendem questões de fundo moral e ético em nossa sociedade. A genética não é destino nem tampouco justifica qualquer tipo de discriminação ou idéia preestabelecida. Pesquisas instigantes como a do biólogo molecular Dean Hamer, chefe do laboratório de bioquímica do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, sobre os genes que estão por trás do homossexualismo masculino e da tendência à promiscuidade, à depressão e à ansiedade vêm apenas acrescentar uma nova dimensão ao estudo do comportamento humano - além do que já se sabe sobre as regras da evolução das espécies, do papel do ambiente, das relações sociais e pessoais (BECKER, 2002).

O mapeamento do genoma humano permitirá o diagnóstico de doenças, muito antes delas se manifestarem. A grande vantagem do diagnóstico precoce de doenças como as cardiovasculares, osteoporose, Alzheimer, Parkinson e várias outras de fundo genético é o planejamento adequado do estilo de vida dos portadores destes genes defeituosos. A detecção

de genes que predisõem o indivíduo a estas doenças, muito antes da sua manifestação, poderá lhe orientar na escolha de dietas e tratamentos preventivos que adiem ou mesmo previnam a manifestação da doença.

O conhecimento do destino genético do indivíduo, como por exemplo, apresentar a osteoporose no início da terceira idade, poderá lhe orientar fazer uso, desde a juventude, de uma dieta rica em cálcio associada a ginástica e banhos de sol, fatores que podem eventualmente prevenir a manifestação desta doença. A consciência de que o indivíduo apresentará uma doença durante uma determinada fase de sua vida poderá lhe orientar também no planejamento da sua vida social. Por exemplo, sabendo-se que a doença de Alzheimer poderá lhe incapacitar tão cedo como aos 40 anos, seria irresponsabilidade iniciar a formação de uma família com filhos nos anos que antecedam a manifestação da doença. Estes fatos desencadeiam questionamentos éticos para quais nós ainda não estamos preparados para enfrentar.

“A terapia gênica, um dos produtos da biotecnologia, poderá contribuir para uma vida mais saudável e para o bem estar da sociedade” (GOMES, 1998). Esta terapia é um procedimento que consiste na introdução, no organismo humano, de novo DNA para desempenhar a função dos genes defeituosos presentes. No próximo capítulo, citaremos exemplos de terapias gênicas já em teste ou que já estão sendo utilizadas no mundo médico.

Com todos esses dados que vemos nas pesquisas genéticas atualmente, podemos tirar diversas conclusões, entre elas que se deve-se fazer ainda muitos trabalhos nesta área, pois genética aliada a terapia gênica nós ainda estamos descobrindo um novo horizonte.

A evolução da genética está sendo vista com muito otimismo, porém não sabemos que problemas éticos e morais que esses avanços podem acarretar. O ponto mais citado é o aspecto da eliminação de diversas doenças do homem.

Uma das mais recentes descobertas genéticas foi a que a inteligência seria resultante de herança genética (SERRA, 2004), se mais essa etapa for bem-sucedida, isso significa que, no futuro, os médicos poderão descobrir rapidamente se um recém-nascido é muito inteligente ou não. Indo mais longe: poderão ainda praticar "terapias" genéticas em embriões e, assim, melhorar seu quociente intelectual.

Obviamente, ninguém ousa apontar os fatores genéticos como os únicos responsáveis pela inteligência de um ser humano. Aspectos como ambiente, estímulos e oportunidades contam pontos para a construção de um Q.I. respeitável.

Mas, entre a própria comunidade científica norte-americana, há o temor de que a descoberta estabeleça algumas distorções médicas e sociais. E como ficam os bebês de inteligência mediana, terão os destinos já selados nas primeiras horas de vida? Isso, para não entrar na ansiedade dos pais, que não medirão esforços para conceber uma criança dentro dos novos patamares de exigência intelectual.

No campo das doenças, se um indivíduo tiver conhecimento de que alguma doença poderá afeta-lo com certa idade, seria irresponsabilidade a formação de uma família. Estes fatos desencadeiam questionamentos éticos, os quais nós ainda não estamos preparados para enfrentar. A questão não é se nós podemos mapear os genes humanos, mas sim como eles vão determinar a maneira como nós viveremos nossa vida. Como viveríamos se soubéssemos que estívéssemos prestes a apresentar uma doença fatal? Essa resposta cabe a cada indivíduo e depende muito de como cada um leva sua vida. Agora só nós cabe esperar e sermos otimistas com relação a um maior passo nas pesquisas biológicas.

### **IN VIVO OU EX VIVO**

Os procedimentos da terapia gênica *in vivo* consistem em transferir o DNA diretamente para as células ou para os tecidos do paciente (GUERRA, 1999).

Nos procedimentos *ex-vivo*, o DNA é primeiramente transferido para células isoladas de um organismo, previamente crescidas em laboratório. As células isoladas são assim modificadas e podem ser introduzidas no paciente. Este método é indireto e mais demorado, porém oferece a vantagem de uma eficiência melhor da transferência e a possibilidade de selecionar e ampliar as células modificadas antes da reintrodução.

### **ISOLAMENTO DO GENE**

“O isolamento de genes é um processo de domínio da comunidade científica devido ao grande desenvolvimento de técnicas de biologia molecular” (JUNIOR, 2004). Transferir um gene é transferir um pedaço particular de DNA. Portanto, é necessário antes de tudo, possuir “em mãos” o pedaço correto.

As enfermidades genéticas conhecidas estão ao redor de 5000, cada uma causada por uma alteração genética diferente. O primeiro passo para a terapia gênica é identificar o gene responsável pela enfermidade. Subseqüentemente, pelas técnicas de biologia molecular é possível

adquirir um pedaço de DNA que contém este gene. Esta primeira etapa é chamada de isolamento ou clonagem do gene. Qualquer enfermidade é candidata a terapia gênica, desde que o gene esteja isolado para a transferência. Graças ao progresso da biologia molecular esta primeira etapa é relativamente simples em comparação a alguns anos atrás. Tem sido possível isolar numerosos genes causadores de doenças genéticas e, se descobrem outros a cada semana.

### TRANSFERÊNCIA DE DNA PARA AS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Transferência gênica é um termo que inclui todos os procedimentos que visam à entrada de algum material genético (na forma de DNA ou oligonucleotídeos) em células alvo (BEYER, 2002)

O sistema mais simples seria, naturalmente, injetar o DNA diretamente (DNA desnudo) nas células ou nos tecidos do organismo a ser tratado. Na prática, este sistema é extremamente ineficaz: o DNA desnudo quase não apresenta efeito nas células. Além disso, essa tentativa requer a injeção em uma única célula ou grupos de células do paciente.

Por isto, quase todas as técnicas atuais para a transferência de material genético implicam o uso de vetores, para transportar o DNA para as células hospedeiras.

### VETORES

Para que se possa fazer expressar DNA exógeno numa população celular é necessário fazer com que este lá chegue, já que, em geral poucas células recebem e expressam DNA exógeno. Assim é necessário criar veículos que transportem e protejam o DNA até a sua chegada a uma população celular alvo. A estes veículos chamamos vetores. Ao longo do tempo foram surgindo vetores que se encaixam em duas famílias. Podemos encontrar os vetores virais e os vetores não virais. Como é claro, dentro de cada tipo de vetor viral encontra-se uma grande variedade de estratégias, o mesmo podendo-se dizer com relação aos vetores não virais; também óbvia é a existência de vantagens e desvantagens de parte a parte.

Segundo Zago (2006):

Vírus são vetores gênicos por excelência e vêm evoluindo há milhões de anos na natureza em associação com virtualmente todos os organismos, de bactérias até plantas e animais. Os sistemas biomoleculares específicos de transferência, recombinação e expressão gênica adotados pelos vírus constituem instrumentos poderosos para a construção de vetores mais eficientes e seguros, com indicações precisas

### *Vetores virais*

Como se pode imaginar, quem melhor que os vírus para promover a entrega genética às células. Esses pequenos organismos (se é que lhe podemos assim chamar) possuem como objetivo único da sua existência a entrega do seu material genético às células e promover a sua replicação de modo a iniciar um novo ciclo. Deste modo os vírus assumem-se como os melhores candidatos para promover a entrega genética. Quase todas as classes de vírus têm sido experimentadas para testar a sua eficácia para mediar transferência.

Em todos os vírus podemos encontrar uma componente genética que é essencial para a sua propagação. Os vetores virais são derivados de vírus por substituição dessa componente genética por genes terapêuticos. No entanto essa manipulação é morosa e dispendiosa, e nunca segura de um modo completo, pois encontra-se sempre presente o risco de os genes virais e potencialmente patogênicos não serem completamente removidos.

Os vetores virais podem ser divididos em duas categorias gerais – os que integram o seu material genético no genoma hospedeiro (integrantes) e aqueles que o não fazem (não integrantes). São três os tipos de vetores virais que possuem a capacidade de integrar o seu material genético no DNA genômico das células recipientes (retrovírus, lentivírus e vírus adeno-associados) e um que se mantém como epissoma (adenovírus). Os vetores virais baseados em retrovírus foram os primeiros a serem testados, contribuindo assim para o desenvolvimento do estudo e aplicação deste tipo de vetores de uma forma geral (GRAEFF & BRANDÃO, 1997).

Os retrovírus possuem três genes essenciais: o gene *gag* que codifica proteínas estruturais, *pol* que codifica a transcriptase reversa/integrase e o *env* que codifica uma glicoproteína do envelope viral. A idéia seria retirar os genes *gag* e *pol* deixando o *env*, para assim formar um vetor viral que transportasse o material genético conveniente, mas que não constituísse um risco para o

organismo. Os retrovírus também foram utilizados de um modo pioneiro através da modificação de proteínas do envelope, para assim se atingirem populações celulares diferentes. Por outro lado, a integração no genoma hospedeiro do transgene, implica que a sua transcrição fique sob o controle do respectivo promotor.

No entanto, os vetores baseados em retrovírus apresentam algumas desvantagens, sua incapacidade para transferir células que não estejam em processo de divisão, deixando de parte uma grande quantidade de células do organismo, como são exemplos: cérebro, pulmões e pâncreas, que não se dividem com tanta frequência. Também a sua capacidade de transporte de material genético se limita a 8 Kb e apresenta uma baixa eficiência na mediação de transferência *in vivo* por ser rapidamente inativado pelo sistema imunitário. No entanto protocolos baseados em retrovírus continuam a ser os mais utilizados para transferir células em processo de divisão, por exemplo, células tumorais.

Os lentivírus constituem outra forma de abordagem para o transporte de material genético. O vírus mais conhecido desta família é o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que faz parte da família dos retrovírus, mas que possui a capacidade invulgar de transferir células que não estejam em fase de divisão.

Talvez esta capacidade seja devida às proteínas acessórias que acompanham este tipo de vírus. *Tat*, *Ver*, *Nef*, *Vif*, *Vpu* e *Vpr* são os genes que crescem ao genoma destes vírus. A primeira geração de vetores produzidos a partir deste vírus foi conseguida com a substituição da proteína do envelope viral *env* pela proteína do vírus da estomatite vesicular G (VSVG). No entanto, este tipo de vetor mostrou um grande tropismo, uma desvantagem evidente, quando o que se pretende é que a transferência se faça de um modo dirigido. Foram experimentados com grande precaução pelo risco de poderem sofrer recombinação e gerar uma infecção idêntica à que o vírus HIV nativo provocaria.

Para minimizar este risco, muitos investigadores foram eliminando os genes acessórios possíveis deste vírus de modo a manter a sua capacidade de transferir células que se não estejam a dividir. Assim, produziu-se um vetor a partir de lentivírus que retém menos de 25% do genoma nativo durante a fase de construção e que apresenta menos de 5% na fase final de vetor (NUNES, 2008)

Mas tal como outros vírus integrantes, este tipo de vetor viral apresenta a desvantagem de integração não específica no genoma da célula hospedeira o que poderá levar à ativação de oncogênese, capacidade limitada de transporte de material genético de 8 kb e a falta de experimentação clínica.

Os vírus adeno-associados (VAA) são, não patogênicos, possuem DNA de cadeia única, que poderá constituir uma boa alternativa como veículo de entrega genética. Este vírus para se replicar necessita da presença de adenovírus (daqui a proveniência do nome de VAA) ou herpes vírus, que lhe fornecem a maquinaria proteica em falta. Os VAA possuem dois genes: *rep* e *cap*. O *rep* codifica a função replicativa e de integração enquanto que o *cap* codifica componentes estruturais do vírus (PEREIRA, 2002).

O vetor viral é produzido pela substituição dos genes *rep* e *cap* pelo gene terapêutico. Os vírus adeno-associados integram o seu material genético num local específico do cromossomo 19 sob a ação da proteína *rep*. No entanto, como o vetor não transporta este gene, não apresenta capacidade integrante. Uma vez mais, este vetor apresenta um grande tropismo, mas esforços têm sido feitos para restringir o tropismo pela inserção de certos resíduos na cápside deste vírus.

As maiores desvantagens que este vetor apresenta é a grande dificuldade de manufatura e a sua capacidade de transporte de material genético que se resume a 4,4 kb, além de pouca experiência clínica ter sido realizada com este tipo de vetor (GRAEFF & BRANDÃO, 1997).

Os adenovírus constituem a família de vírus tumorais que transportam DNA causando infecções benignas no trato respiratório em humanos. O seu genoma é composto por mais de uma dúzia de genes, sendo a transferência caracterizada pela manutenção do DNA episomal no núcleo de células com capacidade ou não de divisão. Além disto, este é o vetor viral de mais fácil produção para o uso comercial. O desafio com este tipo de vetor é a manutenção da expressão do transgene, que normalmente é mantida durante um período de tempo entre 5 a 20 dias após a transferência. No entanto, reconhece-se que a curta duração da expressão do transgene está diretamente relacionada com a resposta imunitária desencadeada. Apesar do referido, os vetores baseados em adenovírus são os mais estudados



em ensaios clínicos, talvez por possuírem uma elevada capacidade de transferência, quer *in vivo*, quer *ex vivo*.

Correntemente são os sistemas virais aqueles que demonstram a maior capacidade de entrega genética (eficiência normalmente superior a 90%), devido ao envolvimento das suas estruturas altamente especializadas para o efeito. Devido a este fato não será de estranhar, que 75% dos protocolos clínicos recentes envolvendo TG, usem vetores baseados em vírus recombinantes para a entrega de DNA.

No entanto, não existem ainda evidências de sucesso clínico para qualquer tipo de protocolo utilizado. A ineficácia da metodologia correntemente usada é atribuída às limitações da entrega genética mediada pelos vetores virais, que incluem toxicidade, restrição do endereçamento para certos tipos de células, capacidade limitada de transporte de material genético, produção e armazenamento, recombinação e altos custos. Além do mais, a toxicidade e imunogenicidade produzida pelos sistemas virais dificultam o uso rotineiro desses sistemas.

#### *Vetores não virais*

Tradicionalmente os métodos de entrega genética por vetores não virais podem ser classificados nas seguintes categorias: “físicos ou mecânicos e químicos” (GRAEFF & BRANDÃO, 1997). Contudo existem outros métodos que não se “encaixam” bem nesta classificação, como é a utilização de DNA livre. A adição de DNA livre não resulta em transferência de células *ex vivo*, embora apareçam resultados surpreendentes após a injeção de DNA livre em vários tecidos *in vivo*, especialmente músculo e pele. Existem algumas descrições da expressão do transgene passados vários meses após a injeção de um plasmídeo de DNA em músculo esquelético de rato, enquanto que na pele a expressão só é detectável durante alguns dias. Por conseguinte, a vacinação através deste método parece ser a aplicação mais promissora desta técnica de entrega genética. “Vetores não virais de transferência gênica são mais fáceis de manipulação, produção e purificação em larga escala do que os vetores virais” (COCO, 2009).

Dos métodos físicos, aquele que se afigura com uma concepção mais simples e mais apelativa é a injeção de DNA livre diretamente no núcleo celular através de microinjeção. No entanto, a maior e derradeira desvantagem deste método consiste na morosidade da microinjeção que só pode atingir uma célula de cada vez, o que

implica um trabalho laborioso que não se torna praticável para a entrega de DNA *in vivo*.

Apesar das contrariedades, várias técnicas têm sido apresentadas com o mesmo objetivo sem que seja necessária a aplicação da microinjeção. Uma das mais avançadas, designada por “gene gun”, utiliza um fluxo de alta pressão de hélio para introduzir no citoplasma partículas de ouro envolvidas por DNA. Um procedimento semelhante chamado “Intraject” ou “Jetgun” usa líquido sob alta pressão para a entrega genética nos espaços intersticiais. O bombardeamento com partículas, também designado como “entrega balística de partículas”, pode introduzir DNA em muitas células simultaneamente. Nesta técnica, partículas revestidas com DNA (compostas por metais como ouro ou tungstênio) são aceleradas a alta velocidade para penetrar as membranas celulares.

Este tipo de procedimento é aplicado em vacinação de DNA, onde uma expressão local do DNA administrado (em células epidermais ou musculares) é o bastante para desencadear uma resposta imunitária primária. No entanto, devido à dificuldade de controlar a via de entrada do DNA, este procedimento é aplicado majoritariamente em células aderentes em cultura, não sendo ainda usado de um modo sistemático.

“A eletroporação é outro método físico usado para a entrega de DNA” (GOMES, 1998). Este método é baseado na aplicação de impulsos elétricos para permeabilizar a membrana celular de um modo transiente, o que permitirá a incorporação de macromoléculas pelas células.

Este método foi usado pela primeira vez em 1982 para a entrega de DNA em células de mamífero. A incorporação intramuscular de DNA feita por este método resulta em níveis de expressão de um gene “repórter” várias vezes acima daqueles conseguidos com simples injeção intramuscular e cuja expressão pode ir até 9 meses. Comparada com outros métodos de entrega genética, a eletroporação é mais simples, segura e econômica. No entanto a sua aplicação *in vivo* é difícil, embora algum progresso tenha sido já feito em vários tecidos: pele, endotélio da córnea e músculo. (GRAEFF & BRANDÃO 1997).

Neste contexto salientam-se os resultados obtidos por Yin e Tang (*apud* BECKER, 2002) que conseguiram recuperação de ratos diabéticos com a administração de genes precursores da insulina por eletroporação.

Os métodos de entrega genética químicos operam fundamentalmente em três níveis: “Condensação e complexação de DNA, endocitose e

endereçamento/entrada para o núcleo” (SANTOS, 2000). As moléculas carregadas negativamente de DNA são normalmente condensadas e/ou complexadas com reagentes catiônicos antes da entrega genética. Esses complexos são incorporados pelas células, usualmente por endocitose, o que implica a subsequente libertação do endossoma e tráfego do DNA até ao núcleo. A endocitose é um processo com vários passos que envolvem ligação, internalização, formação do endossoma e posterior fusão com o lisossoma onde se verifica a degradação completa do seu conteúdo. O pH baixo e as enzimas presentes no endossoma, mas com maior incidência no lisossoma levam, norma geral, à degradação do DNA que se encontra associado com os complexos.

Finalmente, o DNA que consegue escapar endossoma e resistir às nucleases presentes no citoplasma, deverá conseguir dissociar-se do agente condensante, antes ou depois da entrada no núcleo. A entrada é feita, pensa-se, através do poro nuclear ou durante a divisão celular. Uma vez dentro do núcleo, a eficiência da expressão dever-se-á fundamentalmente ao sistema de expressão.

Dos métodos químicos mais usados *in vitro* para a entrega de DNA em células ou mesmo bactérias, salienta-se a precipitação do DNA com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (fosfato de cálcio). Este é o método mais versátil e fácil no conjunto de métodos de entrega de DNA, como tem sido demonstrado ao longo dos últimos 30 anos. No entanto, devido à formação dos precipitados este sistema não é efetivo para ser utilizado *in vivo*.

O princípio geral dos métodos químicos mais utilizados é baseado na formação de um complexo entre as cargas positivas existentes geralmente em polímeros ou lípidos catiônicos e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA. Outros protocolos para a transferência *in vitro*, incluem a utilização de polieletrólitos. De entre os polieletrólitos utilizados incluem-se os seguintes compostos: o dextrano-DEAE, poli-lisina, polietilenimina (PEI) e dendrímeros. Todos eles apresentam a capacidade para condensar DNA por interação electrostática entre os seus grupos carregados positivamente com as cargas negativas dos grupos fosfato das cadeias de DNA. O fosfato de cálcio tal como o dextrano-DEAE foram utilizados para mediar a transfecção *in vitro*. No entanto a transição da aplicação *in vitro* para *in vivo* destes métodos tornou-se inviável devido à citotoxicidade revelada. Assim, outros polieletrólitos mereceram a sua aplicação e estudo em TG. A poli-lisina começou a ser usada devido ao seu poder de condensar o DNA, levando a uma

diminuição do tamanho final do complexo para valores entre 30-100 nm de diâmetro, indo assim de encontro à descrição de vetor ideal (tamanho reduzido). Mas por outro lado, a polilisina, e outros polipeptídeos utilizados (por exemplo, poli-arginina e poli-histidina) são em geral tóxicos. No entanto a poli-L-lisina, em contraste com a poli-D-lisina, é biodegradável e logo menos tóxica. Mas com o advento de novos polímeros com maior densidade de carga, e logo, com maiores capacidades de condensação, a utilização da poli-lisina foi sendo pouco a pouco abandonada. A polietilenimina (PEI) possui das maiores densidades de carga apresentadas por polímeros catiônicos, apresentando de +1/44 Da, quando comparada com alguns lípidos catiônicos usados em transfecção; DOTMA<sup>-</sup>, +1/693 Da, DOTMA/DOPE<sup>-</sup>, +1/1450 Da. Assim, em geral, a complexação de DNA plasmídico com polímeros catiônicos com uma elevada densidade de carga resulta na formação de partículas com tamanhos reduzidos, o que poderá influenciar a eficiência da transferência. Por exemplo, complexos constituídos por PEI/DNA apresentam tamanhos entre 50-60 nm quando preparados numa solução não iônica, como glicose, enquanto que complexos compostos por DOTAP/DNA apresentam tamanhos superiores a 250 nm quando preparados nas mesmas condições experimentais. Além do mais, pensa-se que o aumento na transferência mediada por PEI está de alguma forma relacionado com a capacidade que este polímero catiônico possui em se comportar como uma “esponja protônica” em condições ácidas.

O perfil de protonação do PEI envolve uma aumento de 20% para 45% entre o pH 7 e 5, condições em tudo semelhantes às encontradas no processo de maturação do endossoma. Este efeito resulta numa maior dificuldade de acidificação tanto do endossoma como do lisossoma. Deste modo, os complexos podem permanecer durante maiores períodos de tempo no endossoma após endocitose, evitando uma rápida degradação pelo lisossoma, favorecendo deste modo a libertação do material genéticos destes organitos (GRAEFF& BRANDÃO, 1997).

A capacidade que o PEI apresenta para tamponar o meio do endossoma foi recentemente relacionada com a sua capacidade de conduzir o DNA plasmídico através da membrana nuclear, ultrapassando assim uma das principais barreiras para a entrega genética com sucesso.

Outra classe de polímeros catiônicos que estão a ser implementados como sistema de entrega genética são os dendrímeros de poliamidoamina

(PAMAM), compostos por polímeros catiônicos altamente ramificados. Os dendrímeros de PAMAM apresentam na sua superfície aminas primárias que têm a capacidade de associar, condensar e transportar DNA para uma grande variedade de tipos celulares, incluindo culturas primárias, sem que com isso induzam citotoxicidade significativa *in vitro*. A grande vantagem demonstrada por este sistema, é a facilidade de produção e a versatilidade apresentada na sua manufatura, podendo-se produzir polímeros desta natureza com vários tamanhos e densidades de carga superficial, o que simplifica o processo de transferência. Além do mais, o “efeito esponja” referido para a PEI também é característico deste polímero. Esta potencialidade dos dendrímeros faz com que estes se comportem como bases fracas, o que retarda a acidificação do endossoma, impedindo a maturação para lisossoma.

A redução do pH pode levar também ao “inchamento” (“swelling”) do dendrímero, provocando a ruptura da membrana do endossoma, uma das barreiras à entrega genética, permitindo a passagem do DNA para o espaço citoplasmático. Curiosas são as descrições feitas de que células transferidas com complexos dendrímeros-DNA resultam na integração do DNA no genoma hospedeiro, permitindo desta forma uma expressão permanente.

De todos os vetores não virais, o mais utilizado envolve a condensação do DNA com lipossomas catiônicos. A idéia da utilização de lipídeo catiônico como suporte para entrega genética remonta a meados dos anos 80.

Em 1986, Behr demonstra a capacidade que lipossomas catiônicos apresentam para a complexação e condensação de DNA; no ano seguinte Felgner e colaboradores (1987) propõem o uso de lipossomas catiônicos como transportadores eficientes para a entrega intracelular de material genético. O princípio utilizado é o mesmo para os polímeros e peptídeos catiônicos: os lipossomas catiônicos interagem de uma forma eletrostática com os grupos fosfato do esqueleto do DNA carregados negativamente levando à formação do lipoplexo. Desta interação resulta a condensação do DNA e, dependendo da quantidade de lipídeo relativamente à quantidade de DNA, proteção à degradação pelas DNases

#### EXEMPLOS DA APLICABILIDADE DA TERAPIA GÊNICA

##### *Projeto Genoma do Câncer*

Cientistas de algumas universidades e pesquisadores de um grande laboratório farmacêutico anunciaram uma descoberta do que pode vir a ser, em pouco tempo, a arma definitiva contra a doença. Essas notícias são aguardadas com euforia porque são poucas as doenças que causam tanto pânico e horror quanto o câncer (o espectro das dores insuportáveis, das mutilações e da morte).

Segundo VERJOVSKY (2006):

Uma nova estratégia criada por pesquisadores brasileiros promete melhorar a eficácia da terapia gênica contra o câncer. A técnica consiste em inserir dois genes num vírus que os ‘carrega’ para dentro das células cancerosas, que passam a produzir proteínas responsáveis por regular a sua proliferação. O novo método se mostrou mais eficaz do que o procedimento convencional, pois provocou morte rápida de várias células cancerosas humanas em cultura ou inseridas em camundongos, além de ser mais vantajoso economicamente.

A boa notícia é que as chances de vencer completamente diversos tipos de tumores cancerígenos com as armas disponíveis nos hospitais brasileiros nunca foram tão altas quanto agora. Praticamente 60% deles podem ser erradicados. Alguns tipos mais agressivos de câncer, que antes matavam os pacientes em questão de meses, já podem ser domados e suas vítimas seguem pela vida carregando uma doença crônica, mas sem perdas significativas na qualidade de vida e na capacidade de trabalhar.

A grande revolução na luta contra o câncer é espetacular, mas discreta. Sua história raramente é contada. Ela ocorre com mudanças no estilo de vida, com o diagnóstico precoce, com tratamentos tradicionais cada dia mais eficaz e com cirurgias menos invasivas e mutiladoras. São conquistas que, pouco a pouco, transformam o câncer em patologia possível de ser prevenida e mantida sob controle (BECKER, 2002).

Uma das frentes principais da batalha, que permitiu o salto nas taxas de sobrevivência dos portadores de câncer do Brasil, foi à luta pela detecção precoce da doença. Graças às campanhas de conscientização e aos avanços nos métodos de diagnóstico, o índice de cura para casos em estágio inicial no Hospital A.C. Camargo (centro de referência na América Latina para o tratamento da doença) pode chegar a 80%. Esse índice cai



violentamente - não chega a 20% - quando o tumor é descoberto em fase avançada.

No século XIX, acreditava-se que o câncer surgia em decorrência de contusões em determinadas áreas do corpo. É recente a descoberta de que as neoplasias, o nome técnico do câncer, que significa "crescimento doentio", são resultados de uma pane no processo de multiplicação celular. As células do corpo humano se multiplicam todo o tempo. Muitas vezes, algumas novas saem com defeitos. No organismo sadio, essas células defeituosas acabam sendo destruídas pelo sistema imunológico.

O câncer surge quando as células mutantes são invulneráveis aos ataques do sistema imunológico. Sem que nada as detenha, as células doentes multiplicam-se e formam um tumor. Mais recente ainda é a constatação de que a maioria dessas mutações acontece por interferência de fatores externos. Essa constatação é vital. Ela mostra que mesmo pessoas que nascem com propensão genética a desenvolver câncer em algum estágio da vida podem anulá-la adotando providências que impeçam o gene de dotar a doença.

Cigarro, álcool, sol, sedentarismo, alimentação inadequada e falta de higiene são co-fatores de pelo menos 70% de todos os casos de câncer. O tabaco do cigarro, os raios ultravioletas do sol e a ausência de vitaminas e substâncias antioxidantes na comida são desvios que podem ser corrigidos. Por isso, os médicos dizem que sete de cada dez tumores malignos podem ser prevenidos quando as pessoas descartam os hábitos danosos descritos acima.

No Brasil, há menos de dois anos, acreditava-se que a única forma de combater o câncer de próstata, o segundo mais freqüente entre os homens, era o diagnóstico precoce. Agora, já se fala em prevenção. A redução no consumo de carnes vermelhas acredita os médicos, ajuda a reduzir os riscos de manifestação da doença. Esse tipo de alimento defende indiretamente a produção de testosterona, o hormônio que acelera o aparecimento de câncer de próstata em pacientes com predisposição à doença. Em relação aos tumores de pulmão, sabe-se que em 90% dos casos a neoplasia está relacionada ao cigarro. Entre os que consomem dois maços de cigarros por dia, dobram os riscos de câncer de bexiga.

#### *Explicações preliminares*

Sabemos que o grande alicerce da genética refere-se aos processos de transcrição e tradução gênica, ou seja, o gene tem as informações necessárias

para a produção do RNA mensageiro, sendo que este, por sua vez estará apto, junto com outras estruturas, a construir uma proteína.

E são as proteínas as determinadoras de praticamente tudo, das estruturas às funções que nosso corpo desempenha.

Pode-se perguntar o seguinte: Se toda a célula de nosso corpo contém os mesmos genes, porque há diferença entre uma célula nervosa e uma célula muscular? Eis aí que entra a expressão gênica, ou seja, diferentes tipos de células manifestam diferentes tipos de genes.

Do mesmo modo que há diferença de expressão gênica de uma célula muscular para uma célula nervosa, há diferença de uma célula saudável para uma célula com fenótipo maligno. Por exemplo: num tumor maligno, certos genes não são expressos, enquanto outros são, e outros ainda sofrem mutações que alteram as suas propriedades.

Entender o processo de expressão dos genes é uma chave para desvendar todo o processo cancerígeno. O que muito se utiliza é um processo comparativo: estudam-se as expressões gênicas de genes individuais em situações distintas, quer seja em tecidos diferentes, o como é mais convincente ao PGH do Câncer, em células doentes e normais. Os cientistas também se preocupam com os marcadores de diagnóstico, os genes super expressos. Tais genes ficam próximos aos genes causadores de agentes cancerígenos, sendo que a presença deles nos dá uma grande possibilidade de desenvolvimento do câncer. Os genes que não são mais expressos também são alvo de terapia genética, pois se certos genes é que designam a normalidade de uma célula, poderíamos, talvez reimplantá-los e curar a célula. Portanto, descobrir um método eficiente identificar (como uma impressão digital) uma célula é uma das tarefas do estudo genético do câncer. "Uma diferenciação se faz necessária entre genética clássica ou mendeliana e a nova genética, porque muito do que se discute hoje em termos de implicações éticas, sociais e políticas dos usos e aplicações da informação genética" (CORREA, 2002)

#### **TÉCNICAS GERAIS DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO**

Antes de explicar como é articulado o Projeto Genoma Câncer, vamos dar uma introdução sobre as técnicas gerais de seqüenciamento genético.

Atualmente, as técnicas enfocam duas abordagens. A primeira delas corresponde ao seqüenciamento completo do genoma, como foi feito no seqüenciamento da *Xylella fastidiosa*, a

bactéria causadora da CVC (Clorose Variegada de Citros), popularmente conhecida como "amarelinho". Tal estratégia é eficiente quando se trata de genomas pouco extensos e não muito complexos. Tudo consiste, basicamente, na quebra da molécula de DNA diretamente do genoma em pedaços relativamente grandes. Os pesquisadores depois tratam de ordená-los, quebrá-los novamente e depois cloná-los. Depois disso, tais fragmentos são mandados às máquinas automáticas de seqüenciamento. Essas máquinas ordenam corretamente os pedaços, a partir de dados sobre as sobreposições das extremidades dos fragmentos, localizadas através de programas de computador que comparam as cadeias de nucleotídeos. O projeto internacional do Genoma Humano seguiu tal estratégia, conseguindo resultados precisos.

Porém, quando se trata de genoma humano, simplesmente quebrar o DNA para seqüenciá-lo representaria um trabalho em grande parte desnecessário, pois sabemos que apenas 3% dos bilhões de pares de bases formam genes, comandando a síntese do RNA e a produção das proteínas. Os outros 97% são os conhecidos DNA lixo, provavelmente resquícios evolutivos.

Partindo dessa constatação, os cientistas desenvolveram um segundo método, um método alternativo, que não exclui o anterior. Trata-se de fazer o processo "ao inverso", ou seja, no lugar de partimos da molécula de DNA, começamos o estudo a partir do RNA mensageiro pois neste sim temos certeza de estar trabalhando com cadeias nucleotídicas codificadoras de proteína.

Os pesquisadores, utilizando a enzima transcriptase reversa, constroem fragmentos de DNA sintéticos, os cDNA. A partir desses fragmentos obtêm-se seqüências, denominadas "etiquetas de seqüências expressas", em inglês *expressed sequenced tags*, ou ESTs.

## VACINA

Acredita-se que plantas transgênicas podem emergir como veículos baratos para vacinação de crianças de nações em desenvolvimento.

Estes pesquisadores consideram a banana como a primeira candidata a veículo de transporte da vacina por se tratar de um alimento sólido com o qual crianças de muitos países em desenvolvimento têm o 1º contato. A alface poderá ser a próxima candidata. Estes cientistas acreditam que este seja um meio economicamente viável de distribuir vacinas de alta tecnologia para os países em desenvolvimento..

Ultimamente, houve uma explosão de trabalhos publicados sobre genes que compõem o outro

lado da moeda, chamados de genes supressores de tumores. Eles são responsáveis por impedir que as células tumorais cresçam, mas quando sofrem mutação que os inativa, permite que as células malignas continuem se dividindo.

Até agora já foram descritos 10 genes supressores, que têm como produto, proteínas supressoras achadas desde o núcleo até a membrana plasmática da célula. Dentre estes, o mais estudado é o p53, que está, provavelmente, envolvido em 50% dos casos de cânceres humanos. Aparentemente, a proteína p53 normal consegue proteger o genoma contra agentes que danificam o DNA.

Quando tal lesão ocorre, esta proteína retarda a divisão celular até que o reparo do DNA seja feito. Caso o dano seja muito extensivo e irreparável, o p53 estimula a apoptose, que é a morte natural da célula.

## TUMORES UROLÓGICOS

Com a descoberta das novas técnicas de biologia molecular, as alterações celulares ocorridas no estudo do Câncer (carcinogênese) puderam ser estudadas mais profundamente. Atualmente, como conceito geral, admite-se que o processo carcinogênico é decorrente da inativação de genes que inibem tumores e/ou ativação de genes que promovem tumores.

Dependendo do tipo de tumor, a quantidade de genes alterados pode variar, desde um até vários genes envolvidos. Por exemplo, existe o caso da fibrose cística, onde a alteração de apenas um gene desencadeia a doença. Isto facilita muito a possibilidade de reparo, pois enfoca-se somente um determinado gene.

No caso dos tumores urológicos, já foram bem documentadas alterações gênicas nos tumores renais, tumores de via excretora, adenocarcinoma de próstata e tumores de testículo. Infelizmente, o número de genes envolvidos nestes tumores é grande, dificultando muito a possibilidade de terapia gênica. Algumas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de identificar algum gene que seja mais importante na oncogênese, para direcionar o reparo de um determinado gene. No adenocarcinoma de próstata, por exemplo, estão comprovadas as mutações nos cromossomos: 5, 6, 7, 8, 10, 13, 16, 17, 18 e do cromossomo Y, em porcentagens variadas em cada de tumor.

Também vários genes já foram estudados e computados como candidatos à indução do processo tumoral quando mutados.

Estudos já realizados, demonstraram que as células normais produzem proteínas de vigilância, como a p53 e a p21, que promovem o suicídio das

células quando elas apresentam degeneração maligna. Os genes que comandam a produção destas proteínas desaparecem nos pacientes com câncer da próstata, permitindo o crescimento descontrolado do tumor.

Pesquisadores da Universidade de Baylor, em Houston, utilizando um vírus transportador, conseguiram introduzir na cadeia de DNA de células cancerosas da próstata, os genes que produzem as proteínas p53 e p21. Com esta manobra, conseguiram retardar o crescimento de tumores implantados em camundongos e aumentaram de forma significativa a sobrevida destes animais (GOMES, 1998).

Outra modalidade de terapia genética bastante atraente vem sendo desenvolvida no Johns Hopkins Cancer Center, que recentemente iniciou os primeiros estudos em seres humanos. Células extraídas de tumores da próstata são inativadas e, em seguida, impregnadas por genes que produzem linfocinas, proteínas com capacidade de desencadear uma potente reação imunológica do organismo contra elementos malignos. Com isto se obtém uma vacina tumoral, que fornecida à indivíduos com câncer da próstata, produz uma reação específica que tende a destruir as células injetadas e o tumor prostático primitivo, formado por células semelhantes. Os resultados clínicos preliminares indicam que a terapia genética talvez venha a ter um papel relevante nos pacientes que permanecem com resíduos de tumor após o tratamento convencional.

#### **TERAPIA GÊNICA E A RESTENOSE**

O crescimento anormal das células da musculatura lisa, das paredes arteriais, desempenha um papel crítico no bloqueio das artérias em casos de doenças coronarianas. Este processo também ocorre nos casos de arteriosclerose ou re-entupimento de vasos que foram submetidos ao processo de angioplastia por balão ou cirurgicamente substituído por pontes. Este reespessamento das paredes arteriais é chamado de restenose e representa um grande problema no tratamento da arteriosclerose. A terapia gênica será um grande avanço para a cardiologia, porém é preciso solucionar alguns problemas técnicos antes de indicar este tratamento. Uma das dificuldades refere-se ao adenovírus que carrega a enzima de interesse, que é injetado entre os balões de um cateter. Atualmente, faz-se necessário bloquear a corrente sanguínea no local por 20 minutos, o que jamais poderia ocorrer no coração. Vislumbra-se, porém,

que este tratamento já será ministrado juntamente com o balão da angioplastia ou no momento da sutura de uma ponte.

#### **O MAL DE PARKINSON E O MAL DE ALZHEIMER**

A doença de Parkinson foi descrita em 1817, pelo médico inglês James Parkinson, com o nome de paralisia agitante, e é caracterizada por uma degeneração do sistema nervoso central, idiopática e progressiva. A doença tem incidência de 1 por mil habitantes, atingindo ambos os sexos e com predominância a partir dos 50 anos. O Mal de Parkinson atinge cerca de 2% das pessoas acima dos 65 anos e por isso pode ser considerada comum em idosos.

As características básicas das demências são o desenvolvimento de múltiplos déficits cognitivos e alterações de personalidade. Este quadro é geralmente crônico e progressivo que interfere diretamente na vida do indivíduo. No grupo das demências, a doença de Alzheimer é a mais comum (cerca de 50%), sendo a quarta causa de morte nos Estados Unidos, atingindo 1,5 a 2 milhões de americanos. No Brasil, estima-se que a doença atinja 1 milhão de pessoas. A prevalência aos 65 anos é de 5% e sobe para 20% aos 80 anos mas, isto não significa que pessoas com menos de 65 anos não tenham a doença.

O Mal de Parkinson e o Mal de Alzheimer são doenças de difícil tratamento, incurável e normalmente progressiva e lenta, que faz parte da vida de muitos brasileiros. Durante este tempo, o paciente se torna menos independente, necessitando cada vez mais de ajuda externa, fazendo com que os familiares tentem a ajudá-lo ao máximo, levando o paciente a ficar sem iniciativa, ocasionando um estado de dependência mental e invalidez crônica. Esta atitude dos familiares, embora justificada porque ninguém quer ver um familiar com dificuldade, não deve ser estimulada porque, deste modo, o paciente piora rapidamente. Existem exercícios que devem ser feitos com o paciente para melhorar sua qualidade de vida e manter um contato mais efetivo com seu grupo social como, por exemplo, exercícios para a expressão facial, exercícios para melhorar a pronúncia usando a língua e os lábios, exercícios que buscam conservar a atividade muscular e flexibilidade articular porque, sem atividade, os músculos tendem a atrofiar. O exercício físico regular tem efeito favorável sobre o funcionamento dos rins, vias urinárias e intestino, evitando a constipação intestinal. Com a melhora da parte física, o psiquismo do doente também melhora, porque ele evita o recolhimento

em si e continua a executar as atividades do mundo externo. Deste modo, o parkinsoniano deixa de ser um agente passivo e passa a ser um agente ativo no tratamento e melhora do seu quadro.

Um fator importante também no tratamento do parkinsoniano é o aspecto nutricional do doente, porque muitos idosos se alimentam exclusivamente de biscoitos e doces e a desnutrição piora as condições gerais do paciente.

A solidariedade e o convívio da família são de fundamental importância para que o tratamento tenha um melhor efeito. As associações de apoio também desempenham um papel de grande importância, à medida que orientam aos pacientes e à família para que possam aceitar melhor a situação e possam perceber que não são os únicos a terem o problema.

## LIMITES DA TERAPIA GÊNICA

As principais dificuldades enfrentadas por pesquisadores que lidam com terapia gênica são as seguintes:

### *Eficiência da transferência*

Um especialista em terapia gênica uma vez afirmou: a terapia gênica sofre de três problemas técnicos principais; a transferência, a transferência e a transferência (GOMES, 1998). Nos estudos de terapia gênica, a maior parte dos esforços é concentrada na procura de vetores que possam transferir o DNA de modo eficiente, principalmente para células desejadas. Nestes últimos anos foram inventados e testados uma grande variedade de vetores, alguns dos quais com chances de expressar o gene estranho em um tipo celular específico (como glóbulos brancos, células do músculo, das vias respiratórias, etc.). Alguns destes estão em vias de experimentação no homem e, a esperança é que apareçam resultados bons.

### *Duração da expressão*

A terapia gênica é praticamente inútil se a expressão do gene estranho não é mantida por um bom período de tempo. As pesquisas estão orientadas de maneira a desenvolver sistemas que apresentem uma expressão duradoura, de modo a submeter o paciente a um único tratamento, ou a tratamentos repetidos em períodos maiores (anos).

### *Segurança do procedimento*

Este é um problema particularmente evidente para os vetores virais. Alguns destes derivam de vírus perigosos como o HIV. É então necessário que antes do uso destes vetores sejam submetidos a critérios de segurança, particularmente no que concerne a presença de genes que podem determinar a patogenicidade do vírus utilizado para infectar (transferir o gene desejado) para as células do hospedeiro.

### *Reação imunitária*

Como toda substância estranha, o produto do gene novo, o gene propriamente dito ou seu vetor podem instigar uma resposta imunitária no organismo sob tratamento. Isto pode causar a eliminação das células modificadas geneticamente, ou a inativação da proteína produzida pelo gene novo. No desenvolvimento de estratégias novas de terapia gênica procura-se evitar respostas imunitárias ao vetor ou ao produto do gene introduzido. Trata-se de uma tarefa difícil e frequentemente empírica, mas isso é cada vez mais usado em inovações no campo da imunologia.

## EXPERIMENTAÇÃO DA TERAPIA GÊNICA

### *Situação atual*

No mundo inteiro, o número de protocolos de experimentação no homem (tentativas clínicas) de terapia gênica estão ao redor de 400. É importante destacar que mais de 90% dessas tentativas estão em fases muito precoces da experimentação. Porém as fases iniciais da experimentação permitem avaliar se há melhora clínica do paciente e se a técnica deverá prosseguir em estudos mais prolongados. As fases mais adiantadas da experimentação permitem avaliar possíveis efeitos tóxicos do tratamento e a efetividade da transferência gênica. Nas fases finais da experimentação se avalia a real efetividade do tratamento e, pode-se difundir a nova técnica.

Portanto podemos dizer que as aplicações clínicas da terapia gênica estão dando os primeiros passos. A esperança é que um grande número das tentativas alcance as fases mais adiantadas da experimentação.

### *Enfermidades a serem tratadas pela terapia gênica*

Inicialmente a terapia gênica se direcionou para o tratamento de enfermidades hereditárias de caráter monogênico. Porém, hoje se sabe que:

A maioria das doenças hereditárias não é determinada por um único gene. Portanto, as enfermidades de caráter monogênico representam apenas uma diminuta parcela das patologias em experimentação clínica da terapia gênica, totalizando 15% das tentativas (GRAEFF & BRANDÃO, 1997).

Grande parte das tentativas clínica concerne em tratamento de tumores e AIDS. Também nestas enfermidades, por razões distintas a transferência gênica constitui uma via terapêutica promissora.

#### *Resultados concretos da terapia gênica*

A despeito do entusiasmo pela terapia gênica e considerando a indubitável potencialidade desta técnica, se pode afirmar que, a exceção da imuno deficiência severa combinada (SCID), nenhuma doença genética tem sido tratada graças a tal terapia. O sucesso da terapia gênica no que se refere ao tratamento da imuno deficiência severa combinada (SCID) é indubitável, sendo que as experimentações foram realizadas por diferentes laboratórios, permitindo recuperar um número considerável de crianças afetadas com a doença. Pode parecer uma verificação desapontadora, sobretudo quando se pensa nos enormes esforços de pesquisa no campo da terapia gênica. Porém, apesar dos desafios técnicos excepcionais, é provável que as numerosas pesquisas e experimentações trarão nos próximos anos resultados terapêuticos. É uma questão de tempo, pois a terapia gênica como foi dito é uma ciência nova e necessita de tempo para se consolidar e se tornar efetiva.

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

As perspectivas para os próximos 20 anos é que todos os genes humanos tenham sido mapeados e identificados e os mecanismos genéticos de cada uma das doenças terão sido descritos. Com isso, será possível tornar a medicina mais preventiva, e o diagnóstico e a terapia serão mais específicos e efetivos, integrados ao aconselhamento genético dentro do serviço médico. A expectativa é que a metodologia genética venha a ser uma abordagem básica para promover a saúde e controlar as

doenças, e a terapia gênica, como método universal na prevenção de doenças e no desenvolvimento de tratamentos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYER, Nance. **Terapia gênica**. Ciência e saúde coletiva; São Paulo; N. 1, V. 7, p. 109-116, Março 2002. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232002000100010&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-81232002000100010&script=sci_arttext)>. Acesso em 01 de Agosto de 2009.

BECKER, C. **Angiogênese induzida por VEGF em ratos submetidos ao transplante celular**: Estudo em modelo de isquemia/reperfusão no coração. São Paulo, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, 2002.

BOCCHI, Edimar Alcides; **Células tronco no tratamento das doenças cardiovasculares**. Revista da sociedade de cardiologia do Rio grande do sul; São Paulo. N.4, P.1 – 9, Janeiro 2009. Disponível em <<http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2004/04/artigo02.pdf>>. Acesso em 15 de agosto de 2009.

CELESTE, Maria Emerick; **Avanços e impactos para a saúde**. Abril 2007. Disponível em: <[http://www.ghente.org/publicacoes/novas\\_tecnologias/informacao\\_tecnologica\\_patenteamento.pdf](http://www.ghente.org/publicacoes/novas_tecnologias/informacao_tecnologica_patenteamento.pdf)>. Acesso em 9 Setembro 2009.

COCÔ, Monique. **Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina**, Arquivo Bras. Oftamol; São Paulo; N. 40, p. 560-566, janeiro 2009. Disponível em <<http://www.abonet.com.br/abo/724/560-566.pdf>>. Acesso em 20 de abril de 2009.

CORRÊA, Marilena. **O Admirável projeto humano**. Revista saúde coletiva: Rio de Janeiro. N 12, p. 277 – 299, Março 2002. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/physis/v12n2/a06v12n2.pdf>>. Acesso em 17 de agosto de 2009.

DURBANO, João Di Monaco; **Aplicações dos organismos geneticamente modificados**. Núcleo de Difusão de Biotecnologia. Março 2005. Disponível em: <[http://www.bioinfo.ufpb.br/difusao/pdf/aplicacoes\\_dosogms.pdf](http://www.bioinfo.ufpb.br/difusao/pdf/aplicacoes_dosogms.pdf)>. Acesso em 12 maio 2009.



GOMES, Geraldo. **Engenharia Genética, Deontologia, Clonagem**. São Paulo: Oliveira Mendes, 1998.

GRAEFF, Frederico; BRANDÃO, Marcus. **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Lemos, 1997.

GUERRA, Adriano Ribeiro. **As bases da terapia gênica**. Revista de biologia da UFV; Viçosa, V.40, N.2, p. 173-174. Agosto 2000. Disponível em: < <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/TG112.htm> >. Acesso em: 14 de março 2009.

JUNIOR, José Marciel Rodrigues. **É possível uma vacina auxiliar no controle da tuberculose?** Jornal de pneumologia. N. 40, P. 378 – 376, Abril de 2004. Disponível em < [http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/2004\\_30\\_4\\_13\\_portugues.pdf](http://www.jornaldepneumologia.com.br/PDF/2004_30_4_13_portugues.pdf) >. Acesso em 17 de Abril de 2009.

KRIEGER, José Eduardo; **Terapia Gênica uma medicina nova**, Revista de Saúde da USP. Setembro 2001. Disponível em: < <http://www.incor.usp.br/conteudo-medico/geral/terapia%20genica.html> >. Acesso em 12 agosto 2009.

NUNES, Juliano. **A arte de influenciar pessoas**. Revista IESDE; N. 40,P.13-27, Setembro 2005. Disponível em < <http://ambiors.spaceblog.com.br/r11422/Genetica> >. Acesso em 11 de agosto de 2009.

PEREIRA, Nuno Miguel Penacho. **Vetores em terapia gênica**. Jornal on line de biociências. Abril de 2002. Disponível em < <http://www1.ci.uc.pt/rnam/artigos/001.htm> >. Acesso a pagina 12 maio de 2009.

SANTOS, Rita Maria Paulina dos. **Dos Transplantes de Órgãos à Clonagem**. Rio de Janeiro: Forense, 2000.

SERRA, Floriano. **A Terceira Inteligência**, Butterfly Editora, 2004.

SOUZA-JÚNIOR, M. T. **Mamão Transgênico**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. n. 13 p. 132-137, 2000.

VERJOUSKY, Marina; **Novo vírus torna terapia gênica mais eficaz**. Portal do envelhecimento, Setembro 2006. Disponível em < <http://www.portaldoenvelhecimento.net/artigos/artigo1770.htm> >. Acesso em 10 de outubro 2009.

ZAGO, Fabio Pereira. **Terapia gênica**. Revista de Biotecnologia ciência & desenvolvimento, Viçosa. V. 38, N. 38, P. 162-163, Março 2006. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/BIO240/TG105.htm>> . Acesso em 7 março de 2009.

ZILLI, Alexandra. **Conselho de informações sobre biotecnologia**. Julho 2003. Disponível em: <[http://www.cib.org.br/apresentacao/terapia\\_genica\\_alexandra\\_zilli\\_word.pdf](http://www.cib.org.br/apresentacao/terapia_genica_alexandra_zilli_word.pdf)>. Acesso em 16 outubro 2009.



Recebido em / Received: 2009-12-09

Aceito em / Accepted: 2010-05-03