

José Miguel Costa Leme de Abreu Pereira

Terapia Genética: Métodos e Aplicações



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2015

José Miguel Costa Leme de Abreu Pereira

**Terapia Genética: Métodos e
Aplicações**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2015

José Miguel Costa Leme de Abreu Pereira

Terapia Genética: Métodos e Aplicações

Declaro que o presente trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material bibliográfico utilizado se encontra devidamente referenciado.

O aluno:

José Miguel Costa Leme Abreu Pereira

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da
Professora Doutora Catarina Lemos

RESUMO

Nos últimos anos, uma grande evolução na área da biotecnologia tem vindo a permitir o desenvolvimento de um método terapêutico completamente inovador, a terapia genética, com uma forma de encarar a patologia totalmente diferente da convencional. Este método baseia-se na transferência de genes e sequências regulatórias para células alvo, possibilitando a expressão de proteínas essenciais ou inibindo a expressão de proteínas que de outro modo seriam nocivas, de forma a corrigir deficiências hereditárias ou adquiridas.

Para transportar os genes para as células alvo usam-se diversas estratégias, destacando-se a utilização de vetores, virais e não virais. Os vetores virais, derivados de adenovírus, retrovírus ou vírus adenoassociados, cada qual com as suas especificidades, que o torna mais ou menos apropriado para uma determinada intervenção, são os mais frequentemente usados e os mais eficientes, existindo, contudo, alguns receios quanto à sua utilização. Os não virais, devido, nomeadamente, a uma menor imunogenicidade, abrem perspectivas de serem mais previsíveis e seguros.

A transferência dos genes ou sequências pode ocorrer *in* ou *ex vivo*. Pode ser feita em diferentes fases do ciclo celular e em células somáticas ou células germinais, sendo nestas menos comum. O gene terapêutico pode ou não ficar integrado de forma permanente no genoma da célula alvo.

Após o primeiro ensaio clínico com sucesso, efetuado em 1990 para o tratamento da deficiência na adenosina desaminase, vários ensaios clínicos de terapia genética com resultados promissores foram realizados mundialmente por diversas equipas. Existem alguns tratamentos em fases finais de avaliação e um já aprovado para ser comercializado.

Palavras-chave: terapia genética, vetores, transferência genética, gene terapêutico, transgene.

ABSTRACT

In the last years, a great progress in biotechnology has allowed the development of a completely new therapeutic approach, gene therapy, which has an entirely unconventional new way of approaching pathology. This method relies on the transfer of genes and regulatory sequences to target cells, allowing the expression of essential proteins or inhibiting the expression of other proteins that would otherwise be harmful, in order to correct inherited or acquired deficiencies.

To transfer genes into target cells several strategies are used, specially the usage of viral and nonviral vectors. Viral vectors, derived from adenoviruses, retroviruses or adeno-associated viruses, each one with its specificities, which makes it more or less suitable for a given intervention, are more frequently used and are the most effective. Nevertheless, there are some concerns about their use. The non-viral, mainly due to lower immunogenicity, open perspectives of being more predictable and secure.

The transfer of genes or sequences can occur *in* or *ex vivo*. This can be performed in different phases of the cell cycle, and in somatic cells or germ cells, being less common in the last ones. The therapeutic gene may or may not be permanently integrated in the genome of the target cell.

After the first successful trial, carried out in 1990 for the treatment of the adenosine deaminase deficiency, several gene therapy clinical trials with promising results have been carried out worldwide by various teams. There are treatments on the final stages of evaluation and there is one already approved to be commercialized.

Keywords: Gene therapy, vectors, genetic transfer, therapeutic gene, transgene.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só foi conseguida devido ao apoio de várias pessoas, às quais não posso deixar de agradecer.

Inicialmente, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Catarina Lemos, por me ter acompanhado e auxiliado na elaboração desta monografia, sempre com imensa disponibilidade, dedicação, paciência e empenho, e por toda a simpatia que demonstrou para comigo.

Aos meus Pais, por todo o apoio e ensinamentos que me deram ao longo dos anos, que me tornaram na pessoa que sou hoje.

À Raquel, pela paciência, apoio e disponibilidade transmitidos ao longo da elaboração desta monografia.

Aos meus Amigos, por me terem sempre apoiado e ajudado ao longo dos anos.

Por fim, à Universidade Fernando Pessoa, por todos os excelentes e memoráveis momentos vividos, que me marcou e marcará para sempre.

Um sincero Obrigado a todos!

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. TERAPIA GENÉTICA	3
2.1. Diferentes mecanismos da terapia genética	4
ii.i.i. Introdução de gene em falta	4
ii.i.ii. Substituição do gene mutado	4
ii.i.iii. Inibição da expressão de um gene	7
ii.i.iv. Morte de células doentes	9
ii.i.v. Morte assistida de células doentes	11
ii.i.vi. Morte de células doentes recorrendo a oncólise	12
ii.i.vii. Morte de células doentes recorrendo a apoptose programada	13
2.2. Tipos de terapia genética	16
ii.ii.i. Terapia genética das células germinais	16
ii.ii.ii. Terapia genética das células somáticas	17

2.3. Transferência genética	18
ii.iii.i. Métodos físicos	18
ii.iii.ii. Método químicos	21
ii.iii.iii. Utilização de vetores	22
ii.iii.iii.i. Vetores virais	23
a) Vetores recombinantes de retrovírus	24
b) Vetores recombinantes de adenovírus	26
c) Vetores recombinantes de vírus adenoassociados (VAA)	28
ii.iii.iii.ii. Vetores não virais	30
a) Vetores baseados em lipossomas	30
b) Vetores baseados em dendrímeros	31
III. PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA TERAPIA GENÉTICA	33
3.1. Doenças hereditárias	34
iii.i.i. Fibrose cística	34
iii.i.ii. Hemoglobinopatias	34

iii.i.iii. Hemofilia	35
iii.i.iv. Distrofia muscular	36
iii.i.v. Diabetes <i>mellitus</i>	36
iii.i.vi. Imunodeficiências	37
3.2. Doenças adquiridas	38
iii.ii.i. Doenças infecciosas	38
iii.ii.ii. Doenças cardiovasculares	39
iii.ii.iii. Doenças do foro oncológico	40
iii.ii.iv. Doenças oculares	41
IV. PRINCIPAIS DESAFIOS	42
4.1. Desafios técnicos	42
4.2. Questões éticas	43
V. PERSPETIVAS PARA O FUTURO	44
VI. CONCLUSÃO	47
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Índice de Figuras:

Figura 1: Representação esquemática de uma das estratégias da terapia genética – introdução de gene em falta.	4
Figura 2: Representação esquemática da substituição de gene mutado.	5
Figura 3: Representação esquemática da composição de uma sequência para transferência genética, de forma a possibilitar uma expressão autorregulada da insulina.	6
Figura 4: Representação esquemática da inibição da expressão de um gene através da terapia genética.	7
Figura 5: Vetor plasmídico com anticorpos monoclonais de superfície responsáveis por encaminhar o vetor para as células tumorais presentes no cérebro do ratinho, com uma sequência de mRNA <i>antisense</i> do gene EGFR.	9
Figura 6: Representação esquemática da morte das células doentes através da terapia genética.	10
Figura 7: Representação esquemática da morte assistida das células doentes através da terapia genética.	12
Figura 8: Diversos mecanismos de eliminação seletiva de células doentes.	15
Figura 9: Terapia genética da linha germinal em mamíferos.	17

Figura 10: Terapia genética das células somáticas.	17
Figura 11: Microinjeção com recurso a uma micropipeta, diretamente no núcleo celular.	19
Figura 12: Representação de um método de transferência genética que utiliza microbolhas com ultrassons.	21
Figura 13: Distribuição em percentagem dos protocolos referentes aos tipos de vetores existentes.	23
Figura 14: Preparação de um vetor retroviral.	26
Figura 15: Preparação de um vetor recombinante de adenovírus.	28
Figura 16: Vetores baseados em lipoplexes.	31
Figura 17: Distribuição em percentagem dos ensaios clínicos realizados mundialmente até 2012.	33

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de vetores virais.	29
Tabela 2: Tratamentos com base em terapia genética em fases finais de avaliação.	45

Índice de Abreviaturas:

- AAV – Vírus adenoassociado
ADA – Deficiência na adenosina desaminase
Apo E – Apolipoproteína E
CCR5 – Recetor da quimiocina do tipo 5
CXCR4 – Recetor de quimiocina do tipo 4
cDNA – DNA complementar
CD – Citosina desaminase
CFTR – Regulador de condutância transmembranar da fibrose cística
Cl⁻ – Anião cloro
DGC – Complexo glicoproteico associado à distrofina
DMD – Distrofia muscular de Duchenne
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EBNA-1 – Antígeno nuclear 1 do vírus de Epstein Barr
EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico
EMA – Agência Europeia do Medicamento
FDA – *Food and Drug Administration*
Hb – Hemoglobina
HGF – Fator de crescimento do hepatócito
HIR – Recetor da insulina humana
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HSV-(1)-TK – Timidina cinase do vírus *Herpes simplex* do tipo 1
IL2RG – Recetor gama da interleucina 2
ITR – Redundâncias de terminal invertido
K⁺ – Catião potássio
Kb – Kilobases
LCA – *Leber's congenital amaurosis*
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LMO2 – *Lim domain only 2*
LTR – Repetições terminais longas
mRNA – RNA mensageiro

mTFR – Recetor da transferrina do ratinho

Na⁺ – Catião sódio

oriP – Origem de replicação plasmídica

OTC – Ornitina transcarbamilase

Prom – Promotor

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pDNA – DNA plasmídico

PBS – Local de ligação do iniciador (*primer*)

RNA – Ácido ribonucleico

Rb – Retinoblastoma

RP – Retinite pigmentosa

SCID-X – Imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossoma x

SV40 – Vírus símio 40

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

I. INTRODUÇÃO

Em 2003, o consórcio internacional de sequenciação do genoma humano publicou a sequência genética completa do genoma humano. Um marco importante na história, uma vez que permitiu estabelecer pela primeira vez maior parte das sequências codificantes de proteínas, muitas delas com papéis essenciais na regulação fisiológica (Collins et al., 2003).

Os genes codificam proteínas, que assumem variadíssimas funções, quer como enzimas, quer como outras moléculas complexas, coordenando toda a complexidade que constitui um ser vivo. A ausência ou alteração de um dos genes pode ser fatal para um indivíduo ou comprometer o seu normal funcionamento, com graves consequências para a sua integridade fisiológica. Essas anomalias podem ser adquiridas ou, mais vulgarmente, herdadas (Lander et al., 2001).

No final da década de 60 surgiram os primeiros estudos onde se reportava a utilização de ácido desoxirribonucleico (DNA) exógeno para correção de sequências do genoma corrompidas ou em falta, essenciais para o correto funcionamento do organismo. Estes investigadores estavam a lançar as fundações onde se viria a erguer a terapia genética (Friedman e Roblin, 1972).

Num artigo publicado na revista *Science*, em 1972, por Friedmann e Roblin, os investigadores propunham a possibilidade de se recorrer no futuro à utilização de DNA exógeno como agente farmacológico no tratamento de várias doenças hereditárias (Friedman e Roblin, 1972).

Desde então surgiu uma série de estudos e em 1990 a *Food and Drug Administration* (FDA) acabou por aprovar o primeiro ensaio clínico para o tratamento de uma imunodeficiência recessiva rara, a deficiência na adenosina desaminase (ADA). Esta doença caracteriza-se pela falta ou alteração de um único gene, responsável pela síntese da enzima ADA. A equipa do Dr. Anderson, recorrendo a um vetor retroviral com uma cópia funcional do gene, infetou as células em cultura. Esse retrovírus fornecia às células uma cópia do gene funcional. Este ensaio clínico possibilitou que o

paciente tivesse uma vida relativamente normal e gerou uma onda de entusiasmo que viria a estabelecer a terapia genética como uma terapêutica promissora no tratamento de diversas patologias (Blease et al., 1995).

Foram realizados vários ensaios clínicos com resultados promissores, nomeadamente no tratamento da leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), mieloma múltiplo, hemofilia, na doença da retina *Lebers Congenital Aumorosis* (LCA), entre outras.

Os genes terapêuticos, ou transgenes, podem ser transportados para o interior da célula, mais propriamente para o núcleo, através de diversos mecanismos. Embora o recurso a agentes virais seja o mais comum, existem outras formas de veicular os genes e mesmo dentro dos agentes virais existem diversas abordagens (Read e Strachan, 2010).

A terapia genética abre perspectivas excitantes como alternativa à terapêutica convencional, possibilitando potencialmente a solução para algumas das doenças hereditárias e adquiridas que acarretam graves consequências ao indivíduo, ou também em doenças adquiridas onde a adição de uma sequência ou gene permite acrescentar uma função não existente naturalmente no organismo, mas que pode desempenhar uma função importante (Cotrim, 2008).

Neste trabalho pretendeu-se fazer uma revisão bibliográfica sobre a terapia genética, os métodos e técnicas utilizados e as suas principais aplicações.

Como metodologia, realizou-se uma pesquisa bibliográfica extensiva dos artigos científicos mais recentes sobre o tema em estudo, utilizando o motor de pesquisa bibliográfica PubMed, recorrendo a diversas palavras-chave.

II. TERAPIA GENÉTICA

A ausência de uma proteína, a alteração da sua estrutura de forma prejudicial para o seu desempenho ou mesmo a desregulação da sua expressão, só pode ser colmatada na terapêutica convencional recorrendo ao fornecimento por via exógena da proteína anómala no seu estado ativo funcional, ou então de uma molécula que de forma direta ou indireta exerça uma função semelhante. Os insulínodépendentes, por exemplo, para colmatar a sua limitação de insulina, têm que a administrar diariamente.

Por outro lado, a terapia genética tem como principal objetivo, através da utilização de técnicas de DNA recombinante, atacar a doença na sua origem, ou seja, na sua base genética, de forma a curar ou corrigir uma condição causada por um alelo mutante, através da introdução de uma sequência de DNA, codificante ou não, como forma de tratamento farmacológico (Griffiths et al., 2005).

Para isso, os genes funcionais têm que ser identificados numa biblioteca de DNA genómico ou de DNA complementar (cDNA), isolados e clonados. Seguidamente, o gene desejado é introduzido num vetor específico para que ocorra o transporte do gene até à célula de interesse (Alberts et al., 2008).

O local onde irá ocorrer a transferência genética, o tecido alvo, assim como o facto de se pretender efetuar essa transferência *in vivo* ou *ex vivo* vão ser determinantes na escolha do vetor e do método mais adequado (Templeton, 2015).

Existem diversos mecanismos utilizados na terapia genética. A introdução de uma sequência codificante ou de sequências nucleotídicas que, quando expressas, originam sequências *antisense* (de sentido contrário ao do mRNA codificante), inibindo a expressão de genes prejudiciais para o indivíduo, são algumas das formas de intervenção terapêutica, mas existem outras (Read e Strachan, 2010).

2.1. Diferentes mecanismos de terapia genética

ii.i.i. Introdução de gene em falta

Algumas patologias são caracterizadas pela falta de um ou mais genes. Alternativamente, também pode existir o gene, mas não ser expresso, devido a alterações na sua região reguladora. A falta da proteína origina a doença.

Através da terapia genética podemos inserir na célula esse gene/genes em falta ou não expressos, para que ocorra a expressão normal da proteína, aliviando ou curando definitivamente os sintomas da doença (figura 1) (Read e Strachan, 2010).

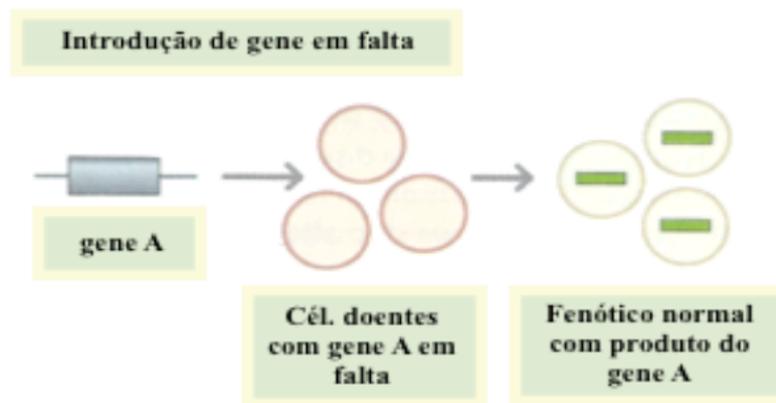


Figura 1: Representação esquemática de uma das estratégias da terapia genética: introdução de gene em falta (adaptado de Read e Strachan, 2010).

ii.i.ii. Substituição do gene mutado

Algumas doenças são provocadas, não pela ausência de um gene, mas sim pela presença de um gene mutado que não é capaz de expressar a proteína na sua forma funcional. Nestas situações pode ser inserido o gene sem a mutação, permitindo a expressão da proteína funcional (figura 2) (Read e Strachan, 2010).

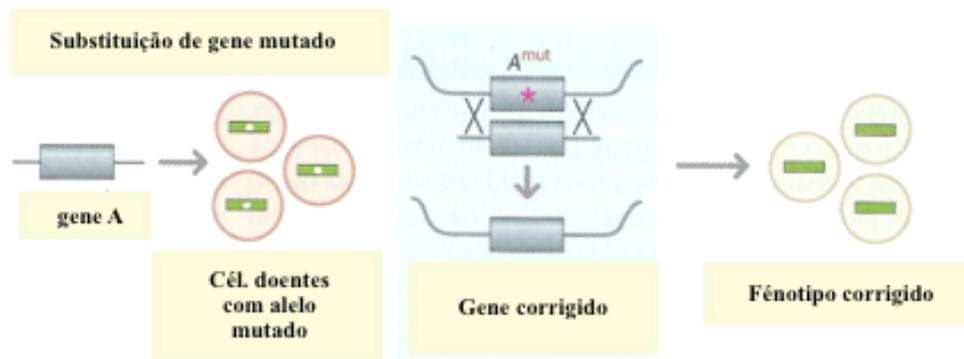


Figura 2: Representação esquemática da substituição de gene mutado (adaptado de Read e Strachan, 2010).

Em ambos os mecanismos descritos, introdução do gene em falta e substituição do gene mutado, para além das sequências codificantes da proteína, são inseridas sequências reguladoras como o promotor e os *enhancers*, essenciais para que ocorra a expressão e a sua correta regulação. O promotor é uma sequência nucleotídica responsável pela ligação da RNA polimerase, essencial para que se possa iniciar a transcrição do mRNA. Os *enhancers* são sequências nucleotídicas a montante ou jusante de um gene, às quais se ligam proteínas denominadas por fatores de transcrição, como os ativadores, que vão estimular a expressão desse gene em particular. Para além das sequências reguladoras da expressão do gene, podem ser inseridas outras sequências específicas responsáveis pelo processo fisiológico específico de cada intervenção terapêutica (Alberts et al., 2008).

Alam e os seus colegas recorreram a terapia genética para a correção da hiperglicemia provocada pela diabetes do tipo I em ratinhos. Para isso, o gene da insulina foi inserido e expresso no fígado dependendo da concentração de glucose no sangue. Com esse objetivo, foram transferidas para as células hepáticas de ratinhos várias sequências para além do gene da insulina propriamente dito, nomeadamente um *enhancer*, promotores de albumina e de insulina, 3 sequências de *glucose inducible response elements* (GIREs) e o gene da albumina humana, entre outros, de forma a criar uma solução mais próxima da fisiológica, na qual não só ocorre a expressão da insulina,

como ela é libertada para o sangue conforme as necessidades metabólicas do organismo do indivíduo (figura 3) (Alam et al., 2013).

Neste caso, as três sequências de GIREs, através da regulação da transcrição do mRNA do gene da insulina, são responsáveis pela libertação da insulina de modo dependente da concentração de glucose no sangue. O *enhancer* da alfa fetoproteína, proteína produzida especificamente no fígado, encontra-se associado com um promotor de albumina também específico do fígado, para potenciar a ação do promotor e para que responda aos fatores de transcrição presentes no fígado. Como este *enhancer* só se encontra funcional durante a fase fetal, é removida desta sequência o segmento que a desativa no estado adulto, para que continue a ocorrer a expressão. O *enhancer* traducional VEGF aumenta a eficácia da tradução do mRNA para proteína, pois a sua sequência facilita a entrada no ribossoma.

Além disso, neste estudo algumas sequências foram alteradas no próprio gene da insulina humana: a sequência de cDNA foi alterada na zona correspondente as duas junções da pré-pró-insulina onde usualmente ocorre o processamento proteolítico e maturação recorrendo a enzimas específicas das células beta do pâncreas, mas que se encontram ausentes no fígado. Esta modificação foi realizada de forma a possibilitar a clivagem da pré-pró-insulina pela furina no fígado, para permitir que a expressão e maturação da insulina ocorra de forma eficiente nas células hepáticas, que não é naturalmente o órgão de expressão natural da insulina (Alam et al., 2013).

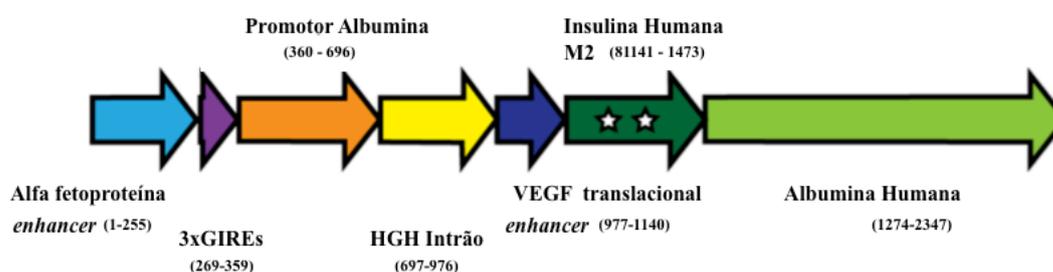


Figura 3: Representação esquemática da composição de uma sequência nucleotídica para transferência genética, desenhada de forma a possibilitar uma expressão autorregulada da insulina (adaptado de Alan et al., 2013).

ii.i.iii. Inibição da expressão de um gene

Se um gene mutado produz, não só uma proteína não funcional, como também prejudicial para a célula, pode-se recorrer a sequências oligonucleotídicas *antisense*, isto é, sequências de oligonucleótidos que se ligam ao DNA do gene, impossibilitando a sua transcrição, ou a RNA de interferência, sequências de RNA de cadeia simples, complementares ao mRNA transcrito, impedindo a sua tradução no ribossoma em proteína. Em ambos os casos não ocorre expressão do gene mutado (figura 4) (Read e Strachan, 2010).

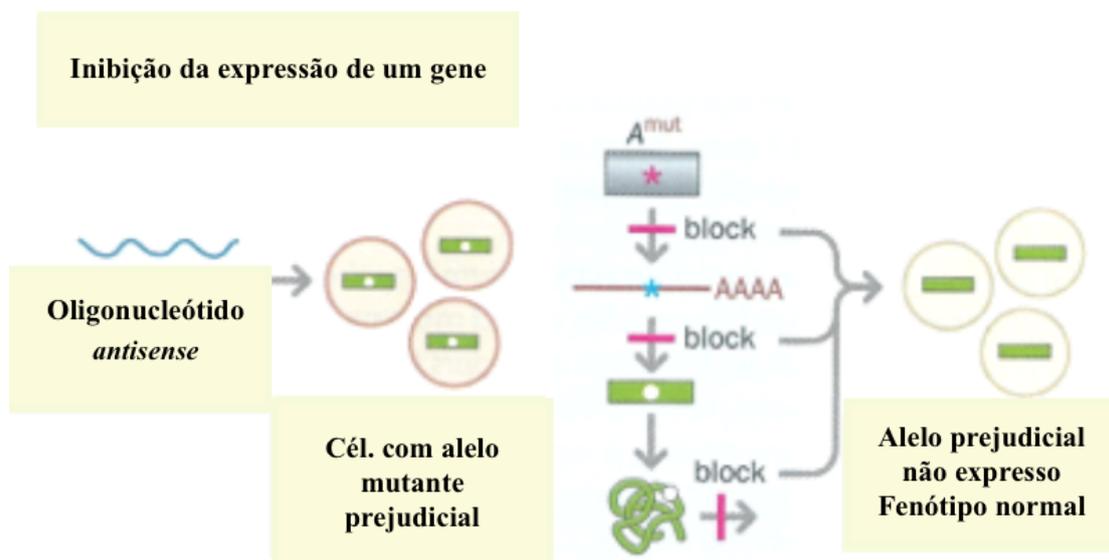


Figura 4: Representação esquemática da inibição da expressão de um gene através da terapia genética (adaptado de Read e Strachan, 2010).

Esta técnica é útil nas abordagens onde se tenta inibir a expressão de alguns genes com papéis importantes no desenvolvimento de certas patologias.

Para o tratamento de cancro no cérebro de ratinhos, Zhang e a sua equipa recorreram a plasmídeos que permitem a transcrição de mRNA *antisense* do fator de crescimento epidermal (EGFR). O EGFR estimula a proliferação celular e assume um

papel importante no desenvolvimento e progressão de tumores e encontra-se com expressão aumentada em células tumorais. O plasmídeo é veiculado no interior de um lipossoma com anticorpos de superfície específicos para o local onde a expressão da sequência é desejada, para que exerça a sua função apenas nas células tumorais. Neste caso os anticorpos de superfície são específicos para o recetor da transferrina do ratinho (mTFR), permitindo ultrapassar a vasculatura tumoral, e o recetor da insulina humana (HIR), que facilita a entrada através das membranas plasmática e nuclear das células tumorais do cérebro (Zhang et al., 2002).

O plasmídeo utilizado, com um tamanho de 11.0 Kb, possui 700 nucleótidos de uma sequência *antisense* do EGFR, correspondente aos nucleótidos 2317 a 3006 do mRNA do EGFR humano. A transcrição é assegurada por um promotor do vírus símio 40 (SV40). O plasmídeo também expressa o antigénio nuclear 1 do vírus de Epstein Barr (EBNA-1) e uma origem de replicação plasmídica (oriP), que permite apenas um ciclo de replicação epissomal por cada ciclo mitótico (figura 5). A sequência *antisense* transcrita emparelha com o mRNA endógeno, reduzindo de forma significativa a expressão da proteína EGFR em cerca de 79%, dificultando desta forma a proliferação das células tumorais (Zhang et al., 2002).

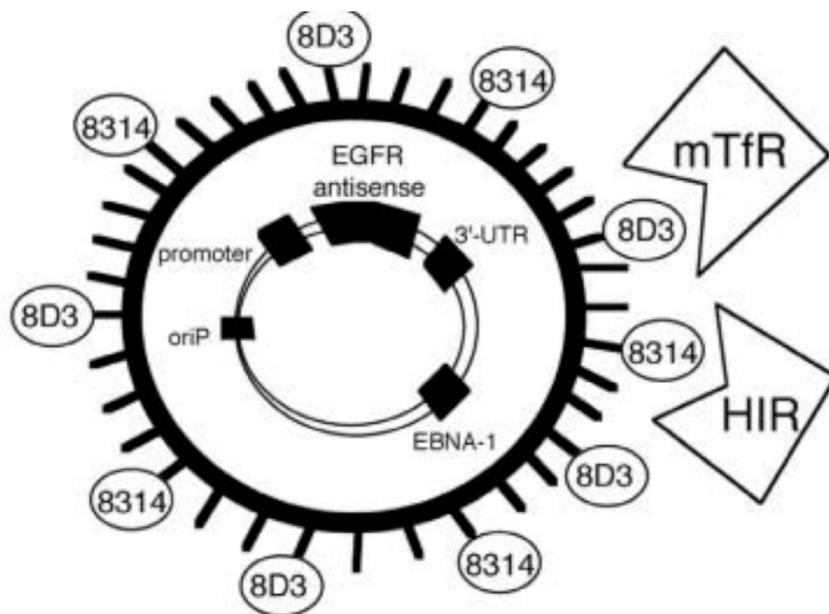


Figura 5: Vetor plasmídico com anticorpos monoclonais de superfície responsáveis por encaminhar o vetor para as células tumorais presentes no cérebro do ratinho, com uma sequência de mRNA *antisense* do gene EGFR (adaptado de Zhang et al., 2002).

ii.i.iv. Morte de células doentes

Se existir a necessidade de provocar a morte de uma célula, quer por ela estar infetada com um vírus, para evitar a transmissão para outras células, quer no caso de células tumorais, para evitar a sua propagação para o resto do corpo, poderemos veicular um gene que, quando expresso, produz uma proteína tóxica para a célula, provocando desta forma a sua morte, ou, alternativamente, pode ser veiculado nas células doentes um gene que codifica uma proteína que, quando metabolizada ou ativada por exposição a uma radiação ou composto químico, forma um produto tóxico para a célula, provocando a sua morte (figura 6) (Read e Strachan, 2010).

Num ensaio clínico de fase I para o tratamento do cancro da próstata humano foi transferido um conjunto de genes suicidas, nomeadamente o da citosina desaminase (CD) e o da timidina cinase do vírus *Herpes simplex* do tipo 1 (HSV-(1)-TK), enzimas

que, uma vez na presença de 5-fluorocitosina e ganciclovir, respectivamente, geram metabolitos tóxicos para a célula, no primeiro caso um antimetabolito da pirimidina, e no segundo um antimetabolito da desoxiguanosina trifosfato. Estes antimetabolitos vão impossibilitar a divisão celular dessas células, uma vez que, sendo análogos de intermediários da replicação, bloqueiam o processo ao ocuparem o lugar deles (Freitag et al., 2002).

A expressão dos genes apenas em células neoplásicas permite que as pró-drogas sejam tóxicas apenas nesse local, pois só aí se encontram presentes as enzimas que as metabolizam e as ativam na sua forma tóxica, conferindo alta especificidade a este método, por oposição aos métodos atuais de quimioterapia que não conseguem ser tão específicos e seletivos, com inúmeros efeitos secundários (Freitag et al., 2002).

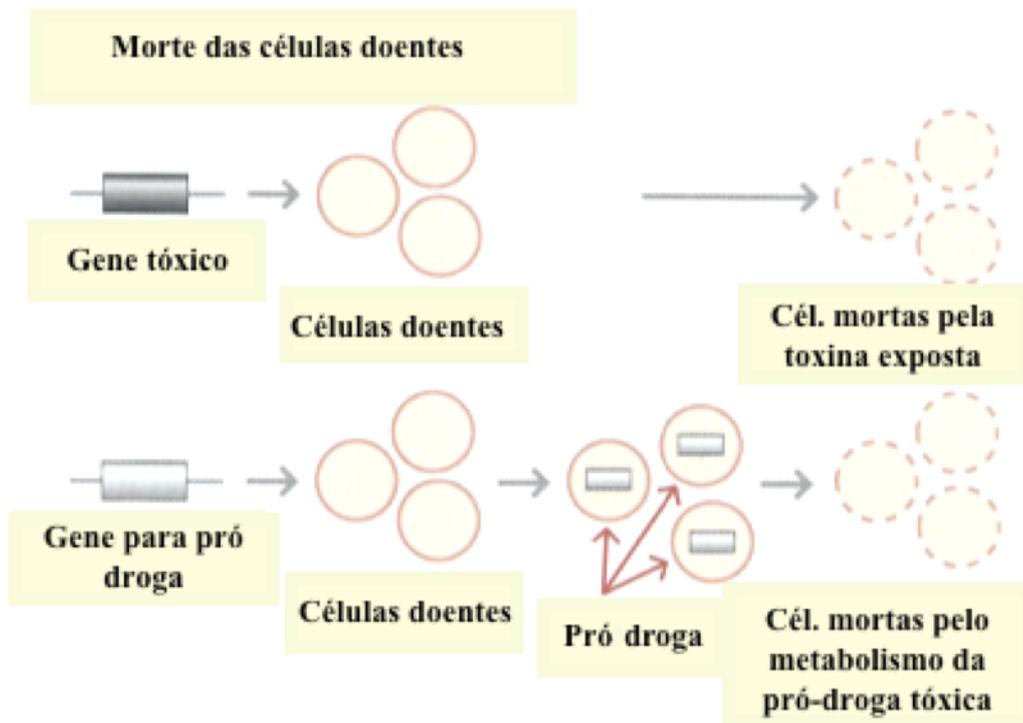


Figura 6: Representação esquemática da morte de células doentes através da terapia genética (adaptado de Read e Strachan, 2010).

ii.i.v. Morte assistida de células doentes

Nesta situação a morte não é provocada diretamente pela expressão de um gene, mas sim através do sistema imune do próprio indivíduo.

Existem duas estratégias diferentes, numa delas um gene, quando expresso, produz proteínas de superfície estranhas ao sistema imune e desta forma gera uma resposta imunitária, e a célula é eliminada. A outra estratégia consiste na expressão de um gene de uma citocina, molécula sinalizadora do sistema imune que serve para mediar respostas imunitárias. A expressão pode ocorrer na superfície da célula doente a eliminar ou então em células do sistema imune para intensificar a sua resposta, quer através da produção de anticorpos, quer por um aumento das células apresentadoras de antigénios (figura 7) (Read e Strachan, 2010).

Num ensaio clínico, Qin e a sua equipa, recorrendo a um adenovírus, conseguiram incorporar na expressão das células tumorais o gene do interferão beta 1 humano. A sua expressão no interior das células tumorais estimulou o sistema imunitário através de um aumento da expressão do complexo de Histocompatibilidade Major Classe I, complexo essencial na apresentação de antigénios aos linfócitos, o que levou a que ocorresse uma resposta imunitária, o aumento da atividade dos linfócitos T citotóxicos, o aumento do número de linfócitos T *helpers* e a ativação dos macrófagos e dos linfócitos *natural killers* (NK), tanto nos modelos *in vivo* como *ex vivo*. Estes efeitos, provocados indiretamente pela expressão do interferão, levaram a uma regressão dos tecidos tumorais. Esta abordagem apresenta resultados promissores para o tratamento de doenças de foro oncológico (Qin et al., 2001).

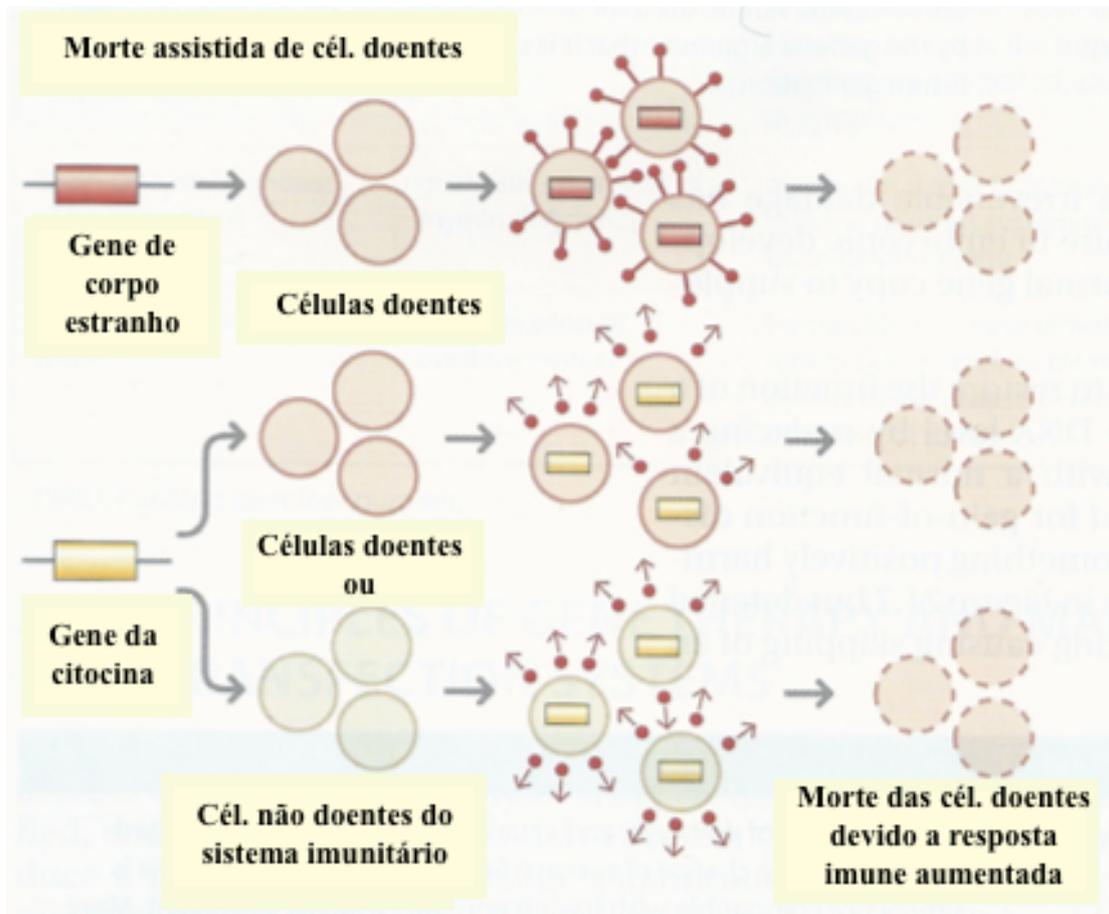


Figura 7: Representação esquemática da morte assistida das células doentes através da terapia genética (adaptado de Read e Strachan, 2010).

ii.i.vi. Morte de células doentes recorrendo à oncólise

Neste método utiliza-se o tropismo natural de alguns vírus por determinados tipos de células, de forma a que sua replicação no interior das células provoque a lise celular das células doentes e, com a perda da integridade estrutural, a sua morte.

O tropismo natural de um vírus por determinado tipo de células constitui parte do mecanismo de seletividade e especificidade deste método. São também adicionadas alterações nas sequências genéticas dos vírus para que ocorra uma maior expressão das proteínas virais na presença de promotores específicos dos tecidos onde se pretende que ocorra a morte celular (revisto em Kwiatkowska et al., 2013).

Yool e os seus colaboradores desenvolveram um vírus oncolítico, ou seja, um vírus com a capacidade de replicar e destruir células tumorais, desenvolvido a partir do vírus do *Herpes simplex* do tipo I (HSV-I), denominado de 34.5ENVE, para o tratamento de gliomas. Os resultados *in vivo* e *ex vivo* em ratinhos são promissores, ocorrendo uma visível diminuição da microvasculatura, essencial para o desenvolvimento e progressão tumoral, e um aumento da necrose dos tecidos tumorais. O vírus 34.5ENVE não possui o gene codificador da proteína icp34.5, proteína essencial para conferir neurovirulência e permitir desta forma que o vírus se replique nos neurónios do cérebro ou da espinal medula. Sem este gene o vírus não consegue replicar em células neuronais saudáveis, as suas defesas são suficientes para o impedir, conferindo seletividade ao vírus que se irá replicar essencialmente em células tumorais. Além disso, possui um promotor sensível à proteína nestina, que normalmente é apenas expressa em células jovens ou então em células que se encontram em divisão como no caso das células tumorais. A especificidade da replicação e o crescimento acelerado deste vírus no interior das células doentes acaba por provocar a lise celular e sua destruição (Yool et al., 2012).

ii.i.vii. Morte de células doentes recorrendo a apoptose programada

O organismo humano tem mecanismos de defesa naturais para evitar o aparecimento e a proliferação de células cancerígenas, como é o caso dos genes supressores tumorais, como o p53, p16, p27, entre outros, responsáveis pela reparação do DNA, pela morte celular programada, ou apoptose, e pelo controlo da proliferação celular. Em tecidos tumorais, os genes que normalmente codificam essas proteínas encontram-se silenciados ou mutados. A proteína p53 é considerada um dos principais mediadores de apoptose e inibição da multiplicação celular e encontra-se inativa em grande parte dos tecidos tumorais. Nesta abordagem da terapia genética fornecem-se às células cópias funcionais de um ou mais destes genes supressores tumorais, de forma a evitar a progressão das células neoplásicas ou com proliferação descontrolada (revisto em Kwiatkowska et al., 2013).

A hipertensão arterial pulmonar tem na sua gênese anomalias adquiridas ou herdadas existindo, numa grande parte dos casos, uma supressão da apoptose normal, importante para controlar a proliferação celular nas paredes vasculares, aumentando a resistência vascular e como tal a pressão. As paredes vasculares destes doentes têm uma expressão aumentada de survivina, um inibidor da apoptose que se encontra presente em elevada quantidade na grande maioria dos tecidos tumorais (McMurty et al., 2005).

Num ensaio clínico, McMurty e os colegas recorreram à terapia genética para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar. Para isso, administraram aos pacientes, por inalação, um adenovírus com uma cópia mutada da proteína survivina, a survivina M, com uma substituição da treonina 34 por uma alanina, que impede que ocorra a fosforilação pela ciclina B1 cinase. É condição essencial para que possa desencadear o processo de apoptose que a survivina se encontre desfosforilada. Neste caso, a survivina original, por sua vez, não consegue ser fosforilada porque a cópia mutada acaba por monopolizar o acesso à ciclina B1 cinase. Através da diminuição dos níveis de survivina fosforilada, os tecidos podem realizar os processos normais de controlo da proliferação celular através da apoptose, reduzir a resistência vascular e, consequentemente, a pressão vascular arterial (McMurty et al., 2005).

A figura 8 resume os diversos mecanismos de eliminação celular seletiva por terapia genética.

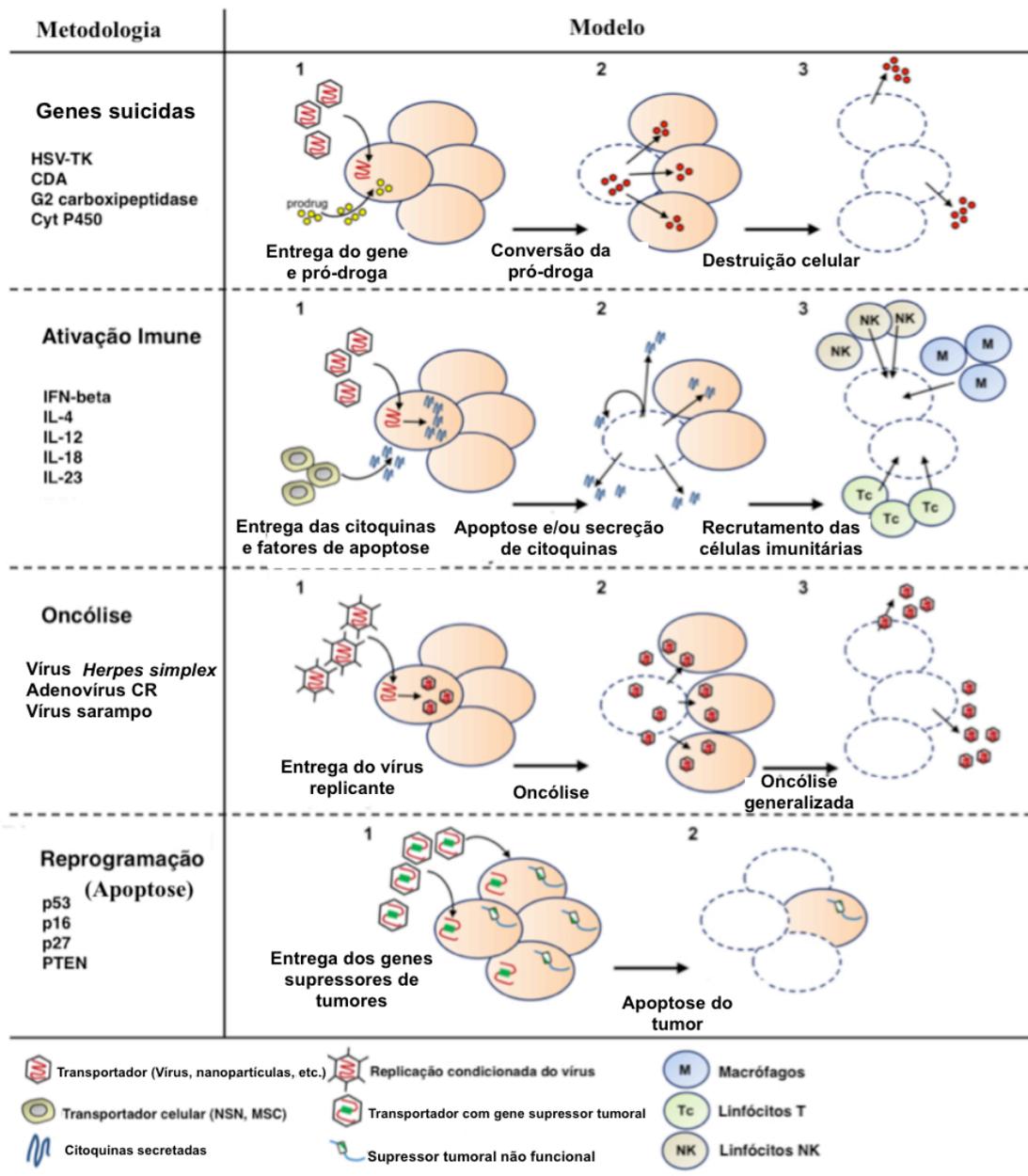


Figura 8: Diversos mecanismos de eliminação seletiva de células doentes (adaptado de Kwiatkowska et al., 2013).

2.2. Tipos de terapia genética

Existem essencialmente duas abordagens na terapia genética, baseadas no tipo de células em que é realizada a inserção dos genes, que podem ser germinais ou somáticas.

Na primeira abordagem, os genes adquiridos podem ser passados às gerações futuras, constituindo parte integrante do genoma presente em todas as células do organismo. Relativamente à terapia genética das células somáticas, as alterações são limitadas ao próprio indivíduo, não passando a futuras gerações, e normalmente restringem-se a uma zona particular do organismo (Read e Strachan, 2010).

ii.ii.i. Terapia genética em células germinais

Na terapia genética das células germinais a inserção dos genes é feita no zigoto, célula diplóide resultante da fecundação, ou então nas células germinais, o óvulo ou o espermatozóide, ou nas suas respectivas células precursoras (figura 9). A introdução do gene irá fazer com que todas as células que se desenvolvam a partir dessa célula incluam esse gene como parte integrante do seu genoma, incluindo os próprios gâmetas dessa nova geração. Esta abordagem teoricamente seria a mais eficiente, mas coloca sérias questões éticas, pois existe um conhecimento insuficiente do impacto e das consequências desta abordagem para as gerações futuras, o que faz com que esta seja a abordagem menos consensual. Inclusivamente, existe legislação em vários países que a proíbe (Nielsen, 1997). Deste modo, atualmente não é aconselhável efetuar ensaios clínicos em humanos recorrendo a terapia genética de linha germinal, mas no futuro, com o aperfeiçoamento das técnicas e aumento da sua segurança, poderá constituir uma alternativa mais eficiente de introduzir simultaneamente as alterações em todas as células de um organismo.

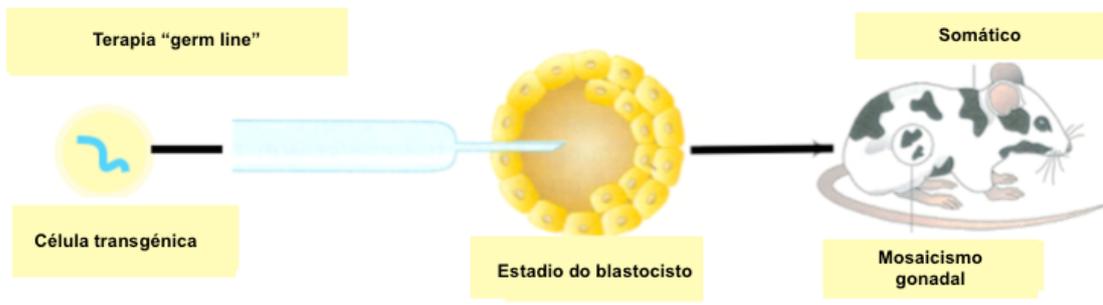


Figura 9: Terapia genética da linha germinal em mamíferos (adaptado de Griffiths et al., 2005).

ii.ii.ii. Terapia genética das células somáticas

Na terapia genética das células somáticas, a inserção dos genes ocorre, como o nome indica, nas células somáticas, ou seja, células que não são gâmetas nem originam gâmetas e constituem a grande maioria das células presentes num organismo. Não ocorre transmissão dos genes inseridos às gerações futuras, mas sempre que uma célula na qual foi inserido o gene se divide, através da mitose, em duas, cada uma delas irá conter um gene funcional (figura 10). Neste caso, a alteração da constituição genética do indivíduo restringe-se apenas a ele e não é transmitida aos seus descendentes. Esta abordagem é a mais comum e representa a grande maioria dos estudos e dos ensaios clínicos (Griffiths et al., 2005).

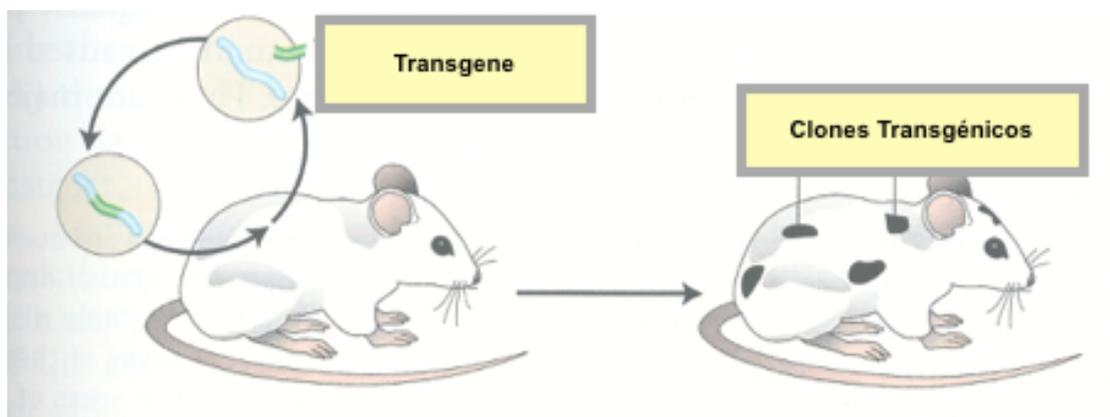


Figura 10: Terapia genética das células somáticas (adaptado de Griffiths et al., 2005)

2.3. Transferência genética

Este processo de transferência envolve a introdução de uma sequência de DNA numa população de células ou tecidos, resultando assim na transcrição e tradução de um gene, ou sequência, com efeitos terapêuticos. A transferência de genes ou sequências pode ser realizada através de duas vias:

Ex vivo – extração das células alvo do paciente para introdução do gene ou sequência de interesse, procedendo-se posteriormente ao transplante das células geneticamente alteradas para o indivíduo. A grande vantagem deste método é possibilidade de fazer uma triagem antes do transplante das células, desta forma permitindo que apenas as células com as alterações desejadas se repliquem e sejam transplantadas (Hall e Kang, 2003).

In vivo – administração direta do gene ou sequência terapêutica no organismo do indivíduo, podendo-se utilizar nesta técnica, por exemplo, vetores. Útil quando se pretende inserir o gene ou sequência terapêutica numa zona extensa ou quando o tecido não é facilmente acessível (Hall e Kang, 2003).

Existem três categorias de métodos de transferência genética. São estes os métodos físicos, nos quais o gene é introduzido mecanicamente nas células, os métodos químicos, com recursos a precipitados catiónicos e vetores, que podem ser virais, se o veículo de transferência for um vírus, ou não virais, se o veículo não for um vírus.

No processo de seleção entre um destes métodos fundamenta-se a escolha consoante o tipo de patologia e o tipo de células alvo. Outros fatores também têm que ser tidos em consideração tais como o tamanho do gene a ser expresso, bem como a duração e a quantidade/extensão da expressão que se pretende.

ii.iii.i. Métodos físicos

Microinjeção – introdução de uma pequena quantidade de DNA diretamente no núcleo da célula alvo sem a ajuda de uma molécula transportadora. Normalmente recorre-se a um micromanipulador e, com a ajuda de um microscópio, injeta-se o

material genético exógeno, que se encontra no interior de uma micropipeta, diretamente no núcleo (figura 11).

Para que se possa recorrer a este método, é importante que a célula seja relativamente estática e tenha um núcleo volumoso e bem delimitado. As células musculares contráteis podem alterar a sua conformação com muita facilidade, dificultando a tarefa de transferência.

É o método mais antigo, sendo, no entanto, a forma mais segura de garantir que o DNA é transferido para dentro do núcleo celular (Li e Huang 2000).

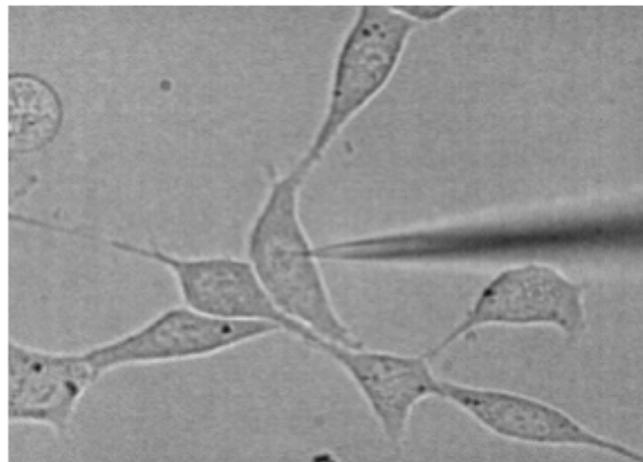


Figura 11: Microinjeção com recurso a uma micropipeta, diretamente no núcleo celular (King, 2004).

Eletroporação – são aplicados impulsos elétricos alternados e controlados nas células em contato com DNA plasmídico. Esta corrente é capaz de abrir poros na superfície celular de forma transiente, que facilitam a entrada de material genético no interior das células. Os impulsos elétricos são aplicados de forma a alterar a voltagem transmembranar do valor fisiológico de 0.1 V para 0.5 a 1 V durante micro a milissegundos, o que permite a formação de poros com diâmetro na ordem dos nanômetros.

A intensidade da corrente aplicada vai variar conforme o tipo e dimensão da célula. Cerca de 50% a 70% das células expostas a um campo elétrico elevado acabam por morrer, devido à ruptura das membranas celulares.

Para utilizar este método *ex vivo*, são usadas cuvetes de eletroporação, constituídas por duas placas de alumínio em cada um dos lados do recipiente, de forma a criar um campo magnético. São pipetadas células em suspensão para as cuvetes, sendo estas depois colocadas num eletroporador, o qual aplica a referida corrente elétrica.

A utilização deste método *in vivo* envolve a utilização de elétrodos de dimensões reduzidas, aplicados no tecido onde se pretende que ocorra a transferência genética, de forma a permeabilizar as células do local. A introdução de plasmídeos *in vivo* pode levar a uma elevada e por vezes exagerada resposta imune (Wells, 2004).

Biobalística (*gene gun*) – Apesar da multiplicidade de métodos utilizados para introduzir o DNA dentro das células, a verdade é que continua a haver desafios técnicos nos métodos convencionais utilizados, nomeadamente quando se pretende fazer a transferência em plantas, devido à existência de parede celular, ou em determinados organelos, como as mitocôndrias. Na biobalística projetam-se microesferas a alta velocidade, capazes de perfurar e atravessar duplas membranas e mesmo a parede celular. Neste método utilizam-se microesferas de metal revestidas por DNA plasmídico. Estas esferas, de ouro ou tungsténio, de diâmetro variável, são projetadas a uma velocidade elevada sobre as células. Algumas destas células vão incorporar o referido DNA de forma espontânea no seu genoma. A eficácia deste método varia consoante o tipo de célula, o meio de cultura, o tipo de munição, as configurações do aparelho de biobalística e do crescimento celular do meio. Este método causa uma morte celular elevada (Templeton, 2008).

Sonoporação – O recurso a ultrassons pode aumentar a permeabilidade da membrana celular, permitindo que macromoléculas como o DNA plasmídico entrem na célula. Com a irradiação de ondas ultrassónicas no tecido, formam-se poros reversíveis de cerca de 100 nanómetros de diâmetro. Durante um curto período de tempo, esses poros vão permitir a entrada para o interior da célula de DNA plasmídico. São utilizadas neste método, como veículo, microbolhas, pequenas esferas de gás que são formuladas de forma a poderem trazer no seu interior uma carga, neste caso DNA plasmídico. Estas microbolhas são sensíveis aos ultrassons e, quando sujeitas a estes, perdem a sua integridade estrutural, libertando para o meio circundante a sua carga,

apenas no local onde são emitidas as ondas ultrassônicas, conferindo especificidade ao método. Simultaneamente, os ultrassons induzem a formação de pequenos poros transitentes na membrana celular da célula alvo, permitindo que o DNA plasmídico, após se encontrar no interior da célula, consiga direcionar-se ao núcleo da célula alvo. Esta técnica é segura e flexível e parece possuir muitos dos atributos de uma técnica de transferência ideal para a terapia genética: não é invasiva e é bem tolerada num intervalo longo de frequências (figura 12) (Newman e Bettinger, 2007).

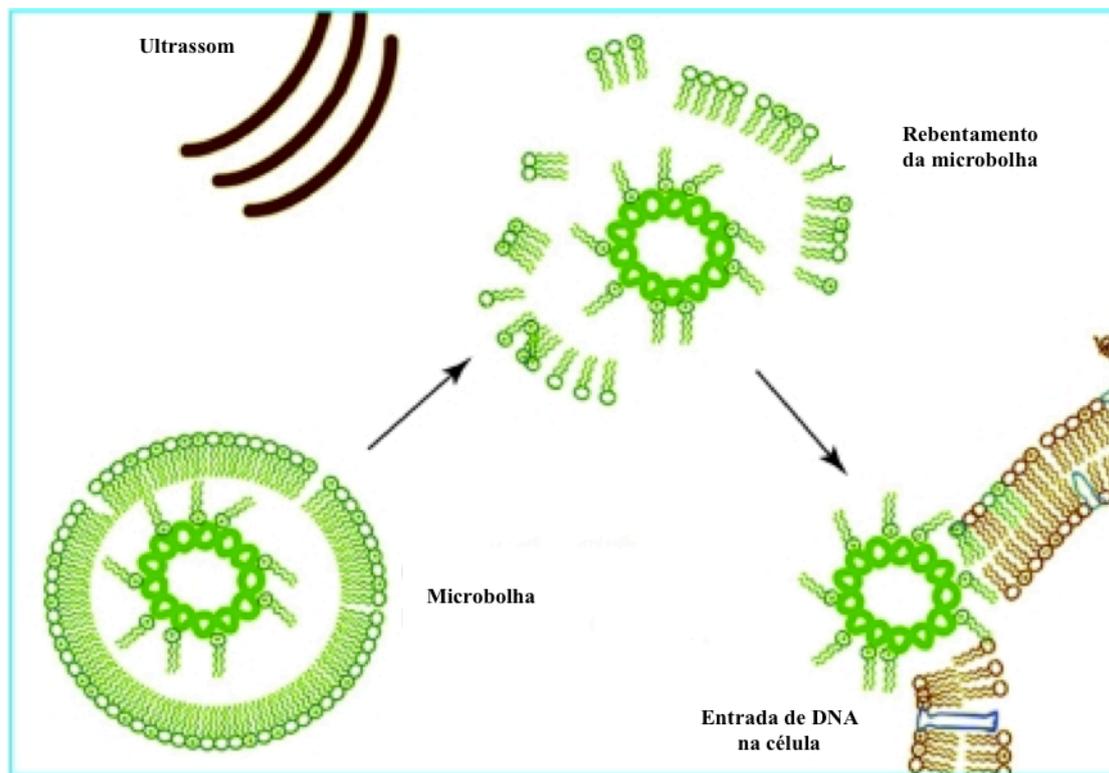


Figura 12: Representação de um método de transferência genética que utiliza microbolhas com ultrassons. Estes ultrassons fazem com que a bolha rebente e que o conteúdo plasmídico seja libertado no local desejado (adaptado de Blomley, 2001).

ii.iii.ii. Métodos químicos

Nos métodos químicos, os compostos utilizados são por norma catiónicos, de modo a que a sua carga positiva interaja com os fosfatos do DNA, que têm carga negativa. Baseiam-se sobretudo na utilização de precipitados de DNA plasmídico

complexado com catiões cálcio. O DNA plasmídico é adicionado a uma solução de cloreto de cálcio e posteriormente a uma solução de tampão de fosfato. Os precipitados criados penetram para o interior da célula por endocitose. Este método é simples e pouco dispendioso, contudo a eficiência da transferência é bastante reduzida, na ordem de 1% (Sambrook et al., 2001).

ii.iii.iii. Utilização de vetores

Os vetores oferecem a possibilidade de transportar no seu interior, de forma específica, material genético para o local onde é necessário que ocorra a sua incorporação no genoma da célula de um determinado tecido. Os vetores podem ser virais ou não virais (Kresina, 2001).

Atualmente existem diversos vetores que são utilizados na terapia genética (figura 13), mas não existe um que se destaque de todos os outros como o vetor ideal, porque para que isto ocorresse esse vetor deveria reunir uma série de características, como permitir a incorporação e expressão regulada de um ou mais genes, ser específico na sua transferência genética para a célula alvo, não ser imunogénico e não produzir resposta inflamatória e ainda ser estável e fácil de obter (Kresina, 2001).

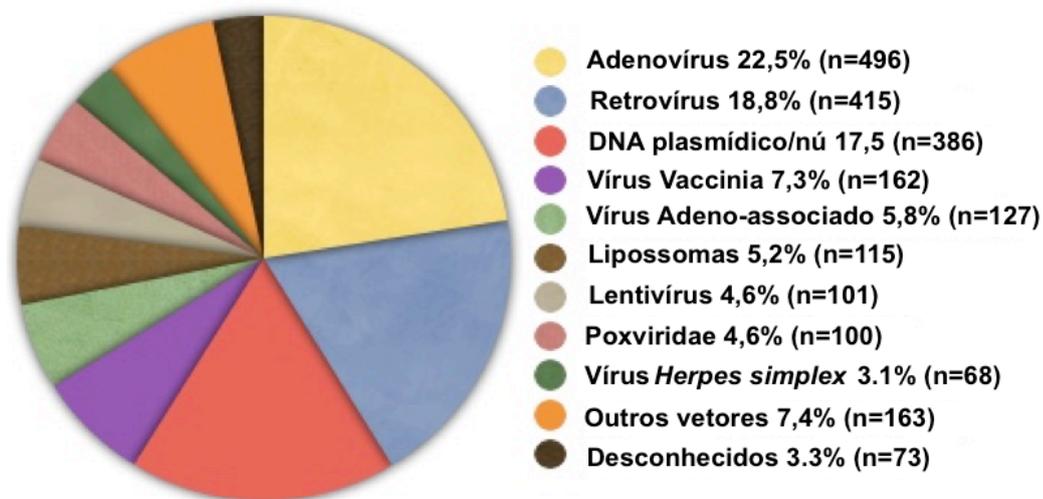


Figura 13: Distribuição percentual dos protocolos utilizados com os diferentes tipos de vetores (adaptado de <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>).

ii.iii.iii.i. Vetores virais

A grande maioria dos vetores utilizados encontram-se nesta categoria, na qual é utilizado todo o engenho que a própria natureza gerou e aperfeiçoou ao longo de milhões de anos através da seleção natural e concretizou sob a forma de vírus, organismos altamente especializados em sabotar a maquinaria celular e utilizá-la para produzir as suas próprias proteínas. Para atingirem esse objetivo, os vírus são capazes de injetar no núcleo das células hospedeiras os genes necessários para produzir as proteínas desejadas e estes podem ou não ficar integrados no próprio genoma da célula (Kay et al., 2001).

a) Vetores recombinantes de retrovírus

Os retrovírus pertencem a família dos *Retroviridae* e são caracterizados por possuírem uma membrana bilipídica, originária da separação da célula infetada, e um genoma constituído por uma única cadeia de mRNA, na ordem dos 7-10 kb de tamanho, complexada com proteínas. Os retrovírus possuem a capacidade de integrar o seu genoma na célula do hospedeiro na forma de DNA de cadeia dupla, constituindo um provírus. Recorrem a uma transcriptase reversa para converter o seu RNA em DNA e a uma integrase retroviral, que auxilia a integração do DNA vírico no genoma da célula hospedeira, possibilitando desta forma que, sempre que ocorra divisão celular, as novas células incluam esse DNA como parte integrante do seu genoma. A integração pode ser, em alguns casos, uma vantagem deste vetor, contudo o processo de integração não está totalmente compreendido e não é controlável, podendo ocorrer sobreposição com genes da célula hospedeira. Neste caso, poderiam ocorrer mutações com consequências nefastas para o indivíduo, como no caso da disrupção de genes responsáveis pelo controlo da divisão celular, ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais, podendo dar origem a células tumorais. Outra grande desvantagem deste processo é a impossibilidade de reverter ou terminar a terapia, pois a integração dos genes é permanente e não reversível (Kresina, 2004).

O genoma dos retrovírus é constituído por genes e sequências essenciais para a sua replicação. Algumas dessas sequências são necessárias para que o vírus consiga transmitir a sua informação genética para o genoma da célula. Entre elas estão quatro sequências cis, que são imprescindíveis para que se forme um provírus: as repetições terminais longas (LTR), sequências flanqueadoras que possuem cerca de 600 nucleótidos e que se encontram nas extremidade 5' e 3' do provírus, o local de ligação do *primer* (PBS), onde se liga o iniciador, permitindo que seja iniciada a transcrição, a cadeia de polipurinas, sequência de purinas essencial na transcrição reversa para DNA, e a sequência de empacotamento, necessária durante a replicação para o empacotamento do RNA na cápside do vírus (Kresina, 2004).

Estas sequências são mantidas no vetor terapêutico, no entanto, os genes gag, pro, pol e env, que codificam proteínas estruturais do vírus e enzimas necessárias para a sua replicação, são removidos do genoma (figura 14). Desta forma, o genoma do

veículo retroviral apenas possui um promotor, o gene terapêutico e as sequências cis necessárias para a formação de um provírus. O veículo retroviral, como não possui sequências codificantes de componentes essenciais para a integridade e replicação do vírus, torna-se num vírus deficiente do ponto vista replicativo, diminuindo o risco de infecções generalizadas e de conseqüentes reações imunitárias exacerbadas (Read e Strachan, 2010).

As proteínas codificadas pelos genes removidos do genoma do vetor (gag, pol e env) são expressas por recurso a uma linha celular de empacotamento. Posteriormente, estas vão ser empacotadas no vetor retroviral, juntamente com o plasmídeo contendo o gene terapêutico e as sequências cis, na célula de empacotamento para que o vetor consiga infetar as células hospedeiras (figura 14).

Quando a inserção de transgenes é feita em células em constante divisão celular, se não ocorrer integração no genoma, o efeito de diluição tem um impacto importante, uma vez que as células filhas não herdam esse material genético e não expressam as proteínas correspondentes. O facto de os retrovírus efetuarem a integração dos seus genes no genoma da célula hospedeira implica que as células que sofram divisão celular já possuam os transgenes e, desta forma, continuem a produzir as proteínas desejadas. Por outro lado, se se pretender utilizar células que não se encontrem em divisão celular, recorre-se a uma subclasse de retrovírus, denominados de lentivírus, que possuem a capacidade de infetar este tipo de células. A grande maioria das intervenções recorrendo aos retrovírus ocorrem *ex vivo* (McTaggart e Al-Rubeai, 2002).

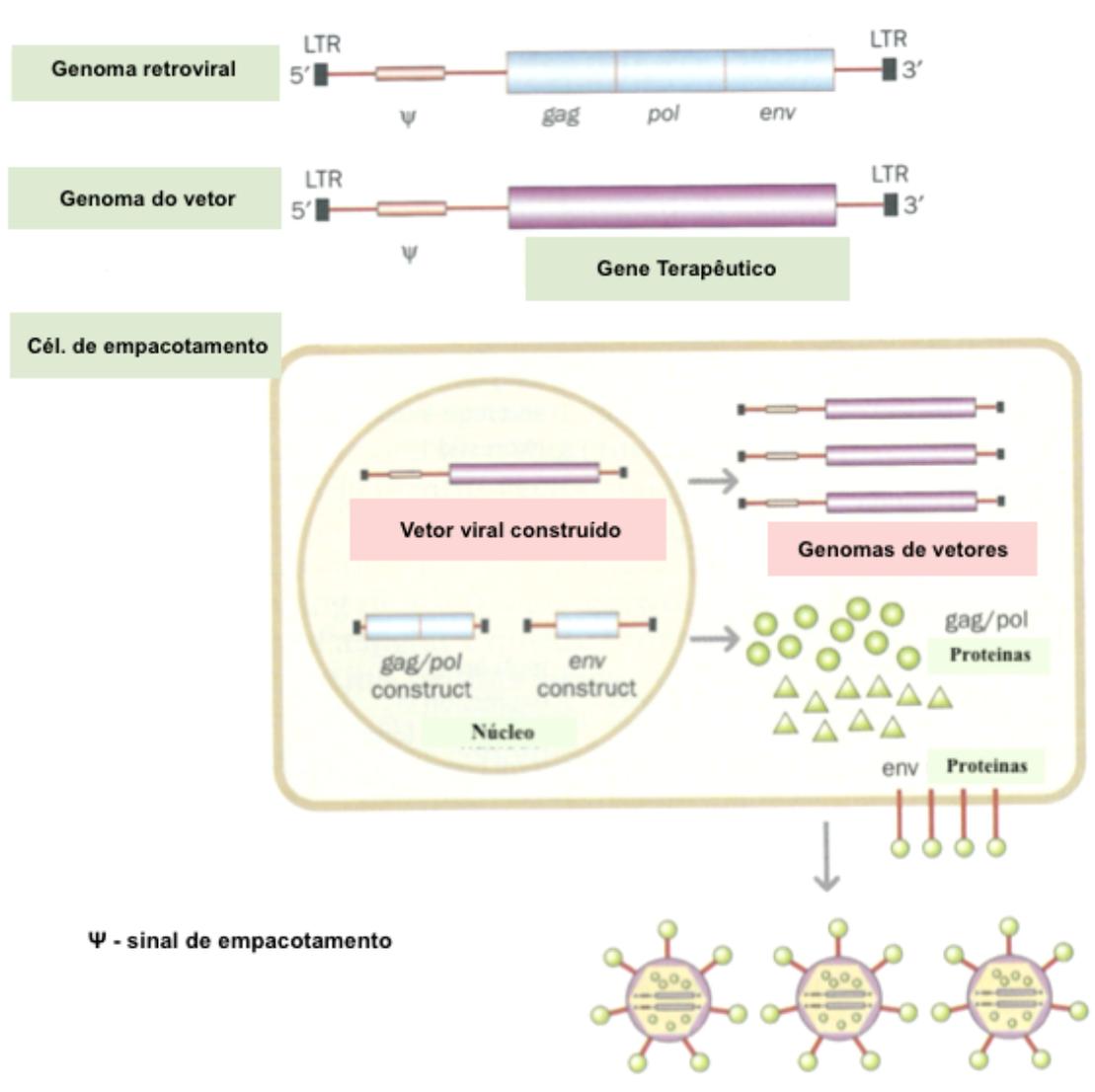


Figura 14: Preparação de um vetor retroviral (adaptado de Read e Strachan, 2010).

b) Vetores recombinantes de adenovírus

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae* e são caracterizados por não possuírem membrana lipídica. São rodeados por glicoproteínas capsídicas e é constituído por um genoma relativamente grande, de 26 kb a 48 kb, de DNA em cadeia dupla (George, 2003).

Dentro das células, os adenovírus encontram-se sob a forma não integrada, ou seja, não ocorre a integração dos seus genes no genoma da célula hospedeira pelo que, no caso de células com um elevado índice mitótico, pode ocorrer o efeito de diluição. Desta forma, a sequência genética, terá que ser readministrada para que a ação

terapêutica seja prolongada. Por outro lado, não ocorrem as eventuais mutações provocadas pela integração aleatória da sequência genética no genoma da célula hospedeira e, se por algum motivo houver o desejo de suspender o tratamento, basta descontinuar a administração do vírus, o que torna este método completamente reversível. Outras vantagens destes vetores são: possuírem uma elevada eficiência na transferência dos transgenes, devido ao elevado número de cópias do veículo que infetam a célula, a possibilidade de permitirem a transferência de genes de maiores dimensões, da ordem dos 36 kb, pelo facto de possuírem um genoma maior, a capacidade de poderem infetar células que não se encontram em divisão e apresentarem um elevado tropismo, ou seja, uma potencialidade de infeção de um largo espectro de células. No entanto, devido ao elevado número de proteínas expressas na sua superfície, são imunogénicos, podendo causar uma forte resposta do sistema imunitário, com eventual falência de órgãos, o que inclusivamente já levou ao falecimento de um paciente sujeito a um tratamento com este vetor. Esta resposta imunitária exacerbada também pode ser responsável por uma diminuição da eficácia das administrações subsequentes, levando a fenómenos de resistência à terapia. Para ultrapassar estes problemas, quando o adenovírus é utilizado como vetor, são retiradas sequências do seu genoma que não são essenciais para a sua função como vetor e que reduzem a sua imunogenicidade (figura 15), também podendo ser utilizados imunossuppressores. A expressão transiente do transgene, característica deste vetor, torna-o pouco eficiente no tratamento de deficiências monogénicas, mas adequado no tratamento de doenças onde é requerida uma expressão de curto prazo, como em alguns tratamentos de cancro (George, 2003).



Figura 15: Preparação de um vetor recombinante de adenovírus. Adenovírus no estado natural (a), com todos os genes estruturais presentes; (b) como vetor, com a remoção dos genes estruturais da zona E1 e adição do promotor e do gene terapêutico no seu lugar; (c) na linha celular de empacotamento são expressas as proteínas necessárias para formar a estrutura do vírus, utilizando os genes estruturais da zona E1, retirada anteriormente na concepção do vetor (adaptado de Kresina, 2004).

c) Vetores recombinantes de vírus adenoassociados

Os vírus adenoassociados pertencem à família dos *Parvoviridae*. São pequenos parvovírus encapsulados com genoma de cadeia de DNA linear e pequena que codifica poucos genes. A sua replicação está dependente da presença de um adenovírus. Consoante o tipo de célula que infetam, pode ocorrer a integração do conteúdo genético no genoma da célula, constituindo assim um provírus, ou então ocorrer replicação sem ocorrer a integração. Possuem um elevado tropismo e podem infetar células que não estejam em divisão. Aparentemente possuem uma baixa patogenicidade, pois não são reconhecidas nos humanos patologias causadas por esta classe de vírus. Este vetor apresenta algumas das características importantes das classes dos retrovírus e adenovírus, como, respetivamente, a possibilidade de ocorrer a integração no genoma da célula e a elevada eficiência na transferência dos genes devido ao elevado número

de cópias por célula infetada (Flotte, 2004). Relativamente à integração no genoma, neste caso existe a vantagem adicional de esta poder ser controlada, ocorrendo num local específico do cromossoma 19 humano. Esta característica reduz o risco de mutagénese que se verifica na transferência de genes retrovirais (Surosky et al.,1997).

A tabela 1 resume as principais vantagens e desvantagens associadas aos principais vetores virais utilizados na terapia genética.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de vetores virais.

Tipo	Genoma	Tamanho	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	ssRNA	7–10 kb	Integração no genoma da célula Transdução estável Linha de empacotamento estáveis Minimização do efeito de diluição	Infetam maioritariamente células em divisão Expressão variável Inserção mutagénica Limite do tamanho do transgene Difícil de transmitir <i>in vivo</i>
Adenovírus	dsDNA	~ 36 kb	Transmissão <i>in vivo</i> Transferência altamente eficiente devido ao elevado número de vetores por célula Possibilidade de transmitir transgenes relativamente grandes Impossibilidade de ocorrer inserção mutagénica	Alta imunogenicidade Transdução altamente variável Altamente infecciosos; possibilidade de infeções letais. Expressão do gene transiente, principalmente em células em divisão
Vírus adenoassociado	ssDNA	~ 5 kb	Elevado tropismo Transmissão <i>in vivo</i> Integração no genoma da célula num local específico. Transdução potencialmente estável Baixa imunogenicidade	Baixa expressão Limite do tamanho do transgene Necessidade da presença do adenovírus para que ocorra a infeção

ii.iii.iii.ii. Vetores não virais

As alternativas aos vetores virais têm vindo progressivamente a aumentar. O recurso aos vírus, que naturalmente são organismos parasitários e responsáveis por muitas doenças, são fatores que levam a alguma apreensão na hora de os utilizar como agentes terapêuticos. Os ensaios clínicos que, no passado, não correram da forma esperada são rapidamente recordados na hora do recurso aos vírus.

Por estes motivos, foram desenvolvidos alguns métodos alternativos para a veiculação de transgenes nos quais não se recorre a um vírus. Estes vetores não causam qualquer tipo de doença, são pouco tóxicos e não ocorre recombinação com vírus endógenos. Também não existem efeitos oncogénicos na sua utilização, assim como não ocorre uma resposta imune exagerada (Li e Huang, 2000).

a) Vetores baseados em lipossomas

Os plasmídeos são sequências circulares de DNA em cadeia dupla que possuem a capacidade de replicação de forma autónoma dos cromossomas do núcleo da célula. Naturalmente utilizados pelas bactérias no processo de troca horizontal de genes, importante nos fenómenos de resistência a antibióticos, estes também podem ser utilizados como uma forma prática de veicular genes para o interior de células. Isolados, são ineficientes, mas recorrendo aos lipossomas, vesículas esféricas de camada bilipídica em cujo interior irão ser transportados os plasmídeos, a taxa de sucesso é muito superior. Podem ser colocadas na superfície dos lipossomas determinadas proteínas que só interagem com as proteínas da superfície de tecidos específicos, permitindo que esta carga genética chegue apenas às células onde eles realmente são necessários, conferindo especificidade a este processo. Os lipoplexes são lipossomas essencialmente constituídos por lípidos catiónicos que complexam com o DNA e a sua carga negativa, oferecendo proteção contra a degradação do DNA pela célula (figura 16). Este método é considerado seguro e pouco imunogénico (Yi et al., 2000).

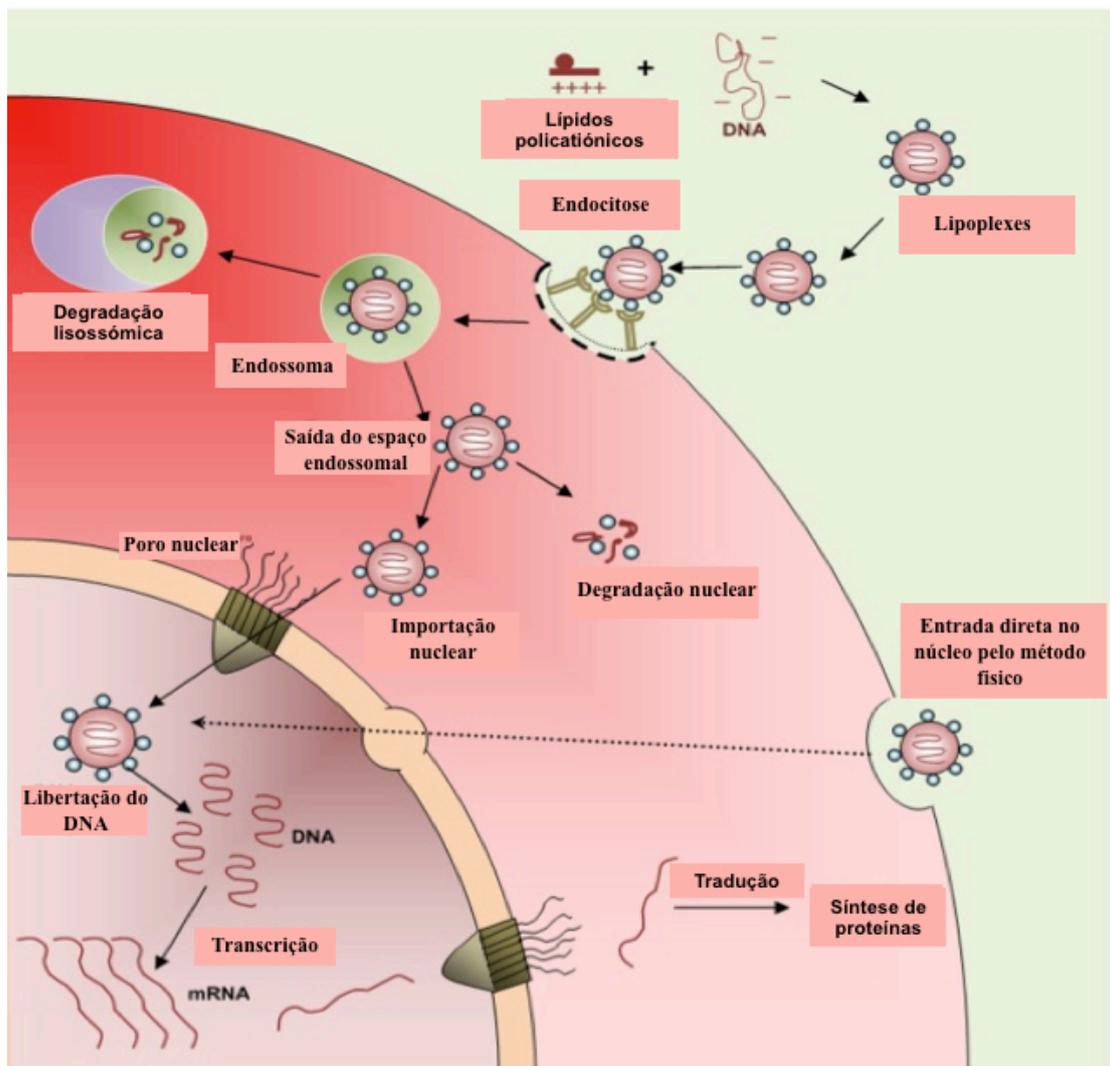


Figura 16: Vetores baseados em lipoplexes (adaptado de Pankajakshan e Agrawal, 2013).

b) Vetores baseados em dendrímeros

Os dendrímeros são polímeros ramificados, geralmente com várias camadas concêntricas. O número de monómeros por camada aumenta proporcionalmente consoante a distância ao centro. Possuem usualmente simetria em relação ao núcleo, adotando uma morfologia esférica tridimensional. Estes vetores apresentam sobretudo carga positiva que, através de interação electrostática com a carga negativa do DNA, permite que este complexo e fique alojado nas pequenas cavidades formadas pela

ramificação do polímero. Quando comparados com os vírus, os dendrímeros são menos tóxicos e com uma atuação mais previsível, sendo também facilmente produzidos e a um custo inferior. Contudo, estes vetores não possuem nem a eficiência nem a especificidade proporcionada pelos vetores virais (Nanjwade et al., 2009).

III. PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA TERAPIA GENÉTICA

Inicialmente a terapia genética estava direcionada para as doenças hereditárias causadas, normalmente, por defeitos num único gene como a fibrose cística, hemoglobinopatias, hemofilia e distrofia muscular.

Mais recentemente, vários ensaios clínicos de terapia genética foram utilizados no tratamento de doenças adquiridas, representando 8% destes ensaios as doenças infecciosas, 8,4% as doenças cardiovasculares e 64,4% as doenças do foro oncológico, como o cancro da pele, cancros neurológicos, cancros gastrointestinais, cancro do ovário, cancro do pulmão e leucemia, entre outras (figura 17) (Ginn et al., 2012).

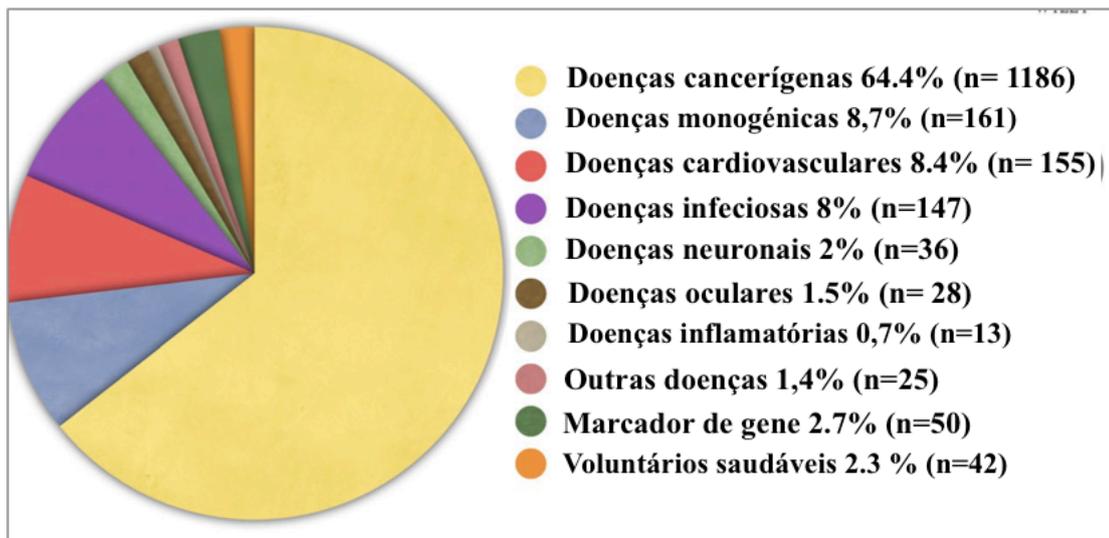


Figura 17: Distribuição em percentagem dos ensaios clínicos realizados mundialmente até 2012 (adaptado de Ginn et al., 2012).

3.1. Doenças hereditárias

iii.i.i. Fibrose cística

A fibrose cística é uma doença monogénica grave de transmissão autossómica recessiva, determinada por uma mutação no gene do regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR). Esta proteína exerce um papel determinante no transporte iónico de Na^+ , K^+ e Cl^- através das membranas epiteliais. A ausência de pelo menos um alelo funcional origina secreções espessas e viscosas, responsáveis pela grande maioria dos sintomas da doença. As hipersecreções nos pulmões são a principal causa de mortalidade da doença. Trata-se de uma das principais doenças hereditárias recessivas entre os caucasianos, constituindo, naturalmente, dentro das doenças monogénicas, a patologia com mais ensaios clínicos com recurso à terapia genética (Boucher, 2002).

A restituição de uma cópia funcional do gene CFTR é a principal estratégia utilizada, de forma a normalizar o transporte iónico transmembranar. Já foram tratadas em laboratório células epiteliais nasais e bronquiais com sucesso (Ruland et al., 2013). Pequenas quantidades de CFTR funcional, cerca de 4% a 20% da expressão normal, são suficientes para prevenir os principais sintomas da doença. Somente uma pequena porção de células do epitélio necessita de expressar a CFTR para que ocorra a correção total do transporte iónico (Ramalho et al., 2002).

Vetores virais e não virais são utilizados para a veiculação do gene CFTR funcional nas células, contudo ainda existem desafios, como o grande número de tecidos alvo diferentes e a existência de secreções em alguns desses tecidos, nos quais uma camada mucosa dificulta o acesso dos vetores às células afetadas (Schusters et al., 2014).

iii.i.ii. Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são normalmente doenças monogénicas de transmissão autossómica recessiva, nas quais os genes que codificam a globina ou a hemoglobina ou as respetivas sequências regulatórias se encontram mutados. A anemia falciforme e

a talassemia são as hemoglobinopatias mais comuns a nível mundial e caracterizam-se, respetivamente, pela alteração estrutural da hemoglobina e pela ausência ou redução de cadeias de globina.

A terapia genética visa a recuperação direta da função da globina através da transferência do gene da globina funcional em questão e pode ser mediada por diversos tipos de vetores (Arumugam e Malik, 2010).

No caso concreto da talassemia β , caracterizada pela ausência ou redução da β -globina, Arumugam e Malik, recorrendo a um vetor viral baseado no lentivírus, conseguiram infetar células hematopoiéticas da medula óssea com um gene funcional da β -globina, de forma a produzirem eritrócitos normais. O principal problema que encontraram foi a possibilidade de ocorrer inserção mutagénica, uma das desvantagens deste vetor (Arumugam e Malik, 2010).

iii.i.iii. Hemofilia

Doença genética hereditária recessiva associada ao cromossoma X que resulta numa deficiência no gene codificante do fator de coagulação VIII (hemofilia A) ou no gene codificante do fator de coagulação IX (hemofilia B). O tratamento farmacológico convencional recorre a transfusões dos fatores de coagulação em falta.

Neste caso, a terapia genética propõe-se introduzir o gene codificante do fator de coagulação funcional. Através de uma infusão direta na veia dos pacientes com um vírus adenoassociado modificado, o AAV8, a equipa do Dr. Nathwani conseguiu, com sucesso, que o gene funcional fosse integrado nas células hepáticas e permitisse a produção de cópias funcionais do fator IX. Quatro dos seis indivíduos tratados chegaram mesmo a poder suspender o tratamento convencional e os níveis do fator de coagulação IX mantiveram-se elevados durante 16 meses. Também não foram verificados efeitos tóxicos durante um período de três anos após a terapia (Nathwani et al., 2014).

iii.i.iv. Distrofia muscular

A distrofia muscular é a denominação de um conjunto de doenças musculares causadas pela mutação de um ou mais de um largo conjunto de genes, que codificam a distrofina ou as proteínas complexadas com esta, responsáveis pela ligação de proteínas musculares à membrana plasmática do músculo, o sarcolema. Quando existe uma deficiência numa das proteínas do complexo de distrofina, a principal consequência é a degeneração da membrana que envolve os músculos, originando os sintomas característicos da doença: enfraquecimento dos músculos e morte do tecido muscular. O atrofiamento muscular generalizado leva a que os doentes tenham uma esperança média de vida curta. Os genes afetados são candidatos ideais para a terapia genética, no entanto a transferência do gene funcional para o tecido muscular não é uma tarefa fácil, uma vez que este corresponde a mais de 40% da massa corporal (Chamberlain, 2002).

A distrofia muscular de Duchenne é a mais comum e é caracterizada pela mutação, no cromossoma X, do gene da distrofina. Teoricamente, a introdução de um gene funcional da distrofina restauraria a sua função, contudo na prática este caso é complicado, devido à extensão de células que o vetor tem que alcançar e por causa do próprio gene que, com 2.4 Mb, é extenso e, como tal, de difícil acondicionamento.

As estratégias utilizadas passam pela transferência de um vetor do gene funcional da distrofina ou de uma das proteínas associadas, ou ainda de um análogo da distrofina, a utrofina, ou pela regulação positiva da expressão da utrofina. A terapia genética permitirá, após ultrapassar os desafios da distribuição sistémica para todas as células alvo sem reações adversas, constituir um bom tratamento da doença (Chamberlain, 2002).

iii.i.v. Diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica na qual o nível de glucose no sangue se encontra anormalmente aumentado e se não for controlado pode levar a um estado de coma e inclusivamente à morte. Outras complicações a longo prazo para o indivíduo podem ser insuficiência renal, problemas de cicatrização e necessidade de

amputação de membros, entre muitas outras. Os doentes subdividem-se em insulino dependentes, com diabetes do tipo I, ou em não-insulino dependentes, com diabetes do tipo II. Os insulino dependentes, recorrendo à terapêutica convencional, necessitam de administrar regularmente doses de insulina para ajudar a promover a absorção dos açúcares.

A maioria dos estudos tem como objetivo restituir a produção de insulina de forma natural ao indivíduo. A equipa de Alam transferiu para o fígado de ratinhos o gene da insulina humana, juntamente com sequências que ajudam a controlar a libertação da insulina dependendo da concentração de glucose no sangue, usando como veículo um adenovírus. O principal órgão alvo desta terapia é o fígado e não o pâncreas, porque o primeiro possui uma capacidade de regeneração superior. Os hepatócitos foram capazes de libertar para a circulação sanguínea insulina humana conforme a concentração de glucose no sangue durante cerca de um mês (Alam et al., 2013).

iii.i.vi. Imunodeficiências

O primeiro caso de sucesso em que se utilizou a terapia genética ocorreu no tratamento de uma imunodeficiência congénita autossómica recessiva grave, a deficiência na adenosina desaminase. Esta enzima intervém no metabolismo das purinas e assume um papel importante em diversos processos metabólicos de várias células do organismo, nomeadamente dos linfócitos T, na eliminação dos subprodutos metabólicos tóxicos para a célula, que na sua ausência se acumulam e acabam por provocar a morte celular. A destruição das células do sistema imunitário compromete o seu papel de defesa, levando ao aparecimento de infeções oportunistas de forma regular e podendo causar a morte do indivíduo (Blease et al., 1995).

A equipa do Dr. Anderson extraiu uma amostra de sangue de um paciente com deficiência na adenosina desaminase, isolou os linfócitos T e deixou que estes se multiplicassem em cultura. De seguida, recorrendo a um vetor retroviral com uma cópia funcional do gene, infetou as células em cultura. Posteriormente essas células voltaram a ser injetadas no paciente, restabelecendo temporariamente a capacidade do paciente em produzir de forma autónoma a enzima em falta. Contudo, essa intervenção não

permitia criar novas gerações de células com o gene restaurado, pelo que o paciente tinha que continuar de forma regular a receber transfusões de linfócitos-T previamente infectados com o gene em falta de dois em dois meses (Blease et al., 1995).

3.2. Doenças adquiridas

iii.ii.i. Doenças infecciosas

As doenças infecciosas representam cerca de 8% dos ensaios clínicos da terapia genética. Os estudos incidem sobretudo no tratamento da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), contudo já foram realizados ensaios clínicos para o tratamento do tétano, infeções de adenovírus e citomegalovírus (Ginn et al., 2012).

No tratamento do HIV a estratégia utilizada passa pela intervenção no processo de replicação do vírus, especialmente na fase de adsorção das suas proteínas de superfície aos recetores presentes na superfície dos linfócitos T.

Verificou-se que indivíduos homozigóticos para uma mutação no gene do recetor da quimiocina do tipo 5 (CCR5), uma deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32), possuíam uma defesa imunológica adicional na infeção pelo HIV e que, mesmo no caso de indivíduos heterozigóticos, a doença também progredia de forma mais lenta. Esta mutação provoca uma alteração estrutural no CCR5 dos linfócitos T que impossibilita ou dificulta o processo de entrada do vírus na célula (Bakshi et al., 1998).

Na terapia genética pesquisam-se estratégias similares, alterações estruturais nas proteínas recetoras de superfície, de forma a impedir a entrada do vírus para a célula. Atualmente, a maior parte dos ensaios clínicos para o tratamento do HIV explora alterações nos recetores de superfície dos linfócitos T, nomeadamente na proteína CD4, essencial na fusão do vírus à membrana celular do linfócito, primeira etapa do processo de fusão. Esta proteína interage com a proteína gp120 da superfície do HIV, assim como o recetor CCR5, o mesmo que se encontra mutado nalguns indivíduos. Outra alternativa prende-se com a expressão nos linfócitos T de proteínas análogas às do HIV que também são utilizadas no processo de fusão. Este é o caso da maC46, que estruturalmente é capaz de se ligar ao mesmo local onde a proteína de superfície do

HIV gp41 se liga, bloqueando desta forma o seu acesso e impossibilitando a entrada do vírus na célula. Os principais métodos utilizados neste caso são *ex vivo* (Didigu e Doms, 2014).

iii.ii.ii. Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares representam cerca de 8,4% dos ensaios clínicos de terapia genética, constituindo a sua terceira maior área de atuação. As doenças cardiovasculares englobam um conjunto de várias patologias com diversas etiologias e com diferentes sintomatologias. Assim sendo, é normal que existam também distintas abordagens no seu tratamento, contudo a grande maioria interfere com o sistema vascular. As células alvo nas artérias são as células endoteliais, células do músculo liso e fibroblastos, e, no caso das lesões provocadas pela aterosclerose, os macrófagos também são utilizados como alvos de tratamento (Pankajakshan e Agrawal, 2013)

Quando existe uma lesão vascular na qual ocorre perda de células endoteliais, são desencadeados processos fisiopatológicos que culminam no desenvolvimento de hiperplasia das células neointimais. Para a evitar, uma das formas de atuação passa pela promoção da reendotelização dos vasos afetados, transferindo um gene do recetor de quimiocina do tipo 4 (CXCR4), que é expresso nas células endoteliais e que contribui de forma significativa para este processo (Chen, 2010).

Outra forma de intervenção passa pela modulação da função das células endoteliais com a introdução de genes de inibidores dos fatores de coagulação ou de genes que expressam fatores anticoagulantes, de forma a evitar a formação de trombos e a sua propagação. Um gene que se enquadra neste perfil é o da trombomodulina, um gene normalmente expresso na superfície das células endoteliais e que serve como cofator da trombina, protease essencial nos processos de regulação da coagulação sanguínea (Channon e Annex, 2000).

Outra estratégia passa pela inibição da aterogénese, evitando a infiltração de células do sistema imunitário nas paredes vasculares e o aparecimento de aterosclerose. Para isso, ativa-se um sistema que evita a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade pelo oxigénio reativo, aumentando a expressão da superóxido dismutase, ou então diminuem-se os níveis de colesterol, através de uma maior expressão da ApoE.

Alternativamente, pode recorrer-se à inibição da proliferação e migração das células do músculo liso, que também fazem parte do processo de criação dos ateromas. Para evitar essa proliferação utilizam-se genes como o da proteína retinoblastoma, que inibem o ciclo celular e, conseqüentemente, a divisão das células musculares (Pankajakshan e Agrawal 2013).

No tratamento das doenças isquémicas, como quando ocorre o entupimento ou estreitamento dos vasos sanguíneos, limitando desta forma a irrigação sanguínea dos tecidos adjacentes, recorre-se à expressão de genes codificantes de fatores angiogénicos para promover o aumento da angiogénese, ou seja, da criação de novos vasos sanguíneos, e desta forma aumentar a circulação sanguínea em zonas que sofreram isquemia, ou seja, em zonas que foram privadas de oxigénio. Para isso aumenta-se a expressão de fatores de crescimento, como o VEGF-121 e o VEGF-165, que são sobretudo utilizados no tratamento de isquemias no miocárdio e dos membros inferiores (Emanuéli e Madeddu, 2001).

iii.ii.iii. Doenças do foro oncológico

As doenças cancerígenas representam a principal área de atuação nos ensaios clínicos de terapia genética, constituindo 64,4% destes. Existem várias estratégias utilizadas (revisto em Kwiatkowska et al., 2013):

a) Inserção de genes supressores tumorais, sendo o mais utilizado o gene supressor p53, podendo ser combinado com quimioterapia e radioterapia.

b) Imunoterapia, com o objetivo de intensificar a reação do sistema imunológico aos antígenos tumorais. Existem várias formas, tais como a vacinação com células tumorais alteradas para expressar moléculas que estimulam o sistema imune, como citocinas ou interleucinas, a vacinação com vetores virais recombinantes expressando antígenos tumorais, que estimulam o sistema imunitário a produzir anticorpos específicos para uma ação mais rápida e eficiente do sistema imunitário, e injeções intratumorais com vetores codificando citocinas.

c) Viroterapia oncolítica, que utiliza vírus capazes de replicar exclusivamente em células tumorais e que a sua rápida replicação acaba por provocar a lise celular.

d) Inserção de genes que apenas são expressos nas células tumorais e que codificam enzimas capazes de converter pró-drogas citotóxicas na sua forma ativa, destruindo as células, podendo ser utilizadas num processo semelhante à quimioterapia.

iii.ii.iv. Doenças oculares

Existem diversas patologias oftálmicas que ocorrem devido à presença de genes mutados, como é o caso da *Leber's congenital amaurosis* (LCA), uma distrofia severa da retina que pode provocar a cegueira. Numa forma da doença, a LCA2, que se caracteriza por ter o gene RPE65 mutado, Cideciyan e a sua equipa de investigadores, no Hospital da Criança de Filadélfia, recorreram a um vírus recombinante adenoassociado, o rAAV2, com uma cópia funcional do gene RPE65, que expressa a proteína do epitélio pigmentar da retina de 65 kDa, importante no processo de conversão da luz em impulsos elétricos, a foto-transdução. Sem esta proteína, os bastonetes fotorreceptores da retina são incapazes de responder à luz e de gerar impulsos elétricos. Os investigadores injetaram diretamente na retina o vetor viral com o gene funcional e conseguiram melhorar significativamente a visão dos indivíduos (Cideciyan et al., 2009). Três anos após a administração do gene, todos os indivíduos mantinham uma visão superior no olho onde tinha sido injetado o vírus com a cópia funcional do gene e não apresentavam quaisquer efeitos secundários decorrentes da administração (Testa et al., 2013).

A degeneração macular relacionada com a idade é uma das principais causas de cegueira nos idosos, particularmente acima dos 60 anos. A terapia genética poderá assumir um papel importante na ajuda à regressão da doença, através da redução do crescimento descontrolado dos vasos sanguíneos e da morte celular, característicos desta patologia, recorrendo à expressão da proteína CD59 (Cashman et al., 2011).

O daltonismo é outra das patologias oftálmicas que, recorrendo à terapia genética em animais, já se conseguiu corrigir, embora ainda não tenha sido conduzido nenhum teste em seres humanos, devido à avaliação do benefício *versus* risco ser baixa neste caso (Mancuso et al., 2009).

IV. PRINCIPAIS DESAFIOS

4.1. Desafios técnicos

Em 1981 dissipou-se grande parte da euforia inicial que se gerou à volta da terapia genética, devido à morte do paciente Jesse Gelsinger, de 18 anos, que sofria de uma deficiência na ornitina transcarbamilase (OTC), enzima essencial do ciclo da ureia. O paciente foi vítima de uma reação imunológica exacerbada ao vetor derivado de adenovírus e acabou por falecer em virtude de uma falência generalizada de vários órgãos, o que causou uma apreensão generalizada. O caso de Jesse Gelsinger demonstra um dos grandes obstáculos da terapia genética, a capacidade natural que a maior parte dos vírus têm em provocar uma resposta imunológica excessiva nos indivíduos sujeitos ao tratamento com estes vetores (Marshall, 1999).

Outros obstáculos que continuam a ensombrar a terapia genética são bem descritos por um ensaio clínico realizado em 2000 para o tratamento de uma imunodeficiência combinada severa ligada ao cromossoma X, uma deficiência no gene IL2RG, caracterizada por infeções recorrentes, em virtude de uma imunidade humoral bastante diminuída. O ensaio clínico foi um aparente sucesso, 9 dos 10 pacientes foram tratados com sucesso (Cavazzana et al., 2000). As células da medula dos pacientes foram infetadas *ex vivo* recorrendo a um retrovírus, para que ocorresse a integração no genoma de uma cópia do gene mutado funcional. O aparente sucesso do ensaio clínico ficou manchado quando, após entre 31 a 68 meses, quatro dos nove pacientes que tinham tido resultados positivos desenvolveram leucemia nos linfócitos T. O problema surgiu devido a ter ocorrido a integração do gene IL2RG perto do promotor do oncogene LMO2 ou nos proto-oncogenes BMI1 ou CCND2. Essa integração permitiu que esses genes ficassem ativos, promovendo o desenvolvimento de células tumorais. Nestes casos, a inserção aleatória do gene provocou mutações com graves consequências para os pacientes. Este fenómeno denomina-se por inserção mutagénica e outro dos grandes desafios por resolver é a capacidade de controlar de forma mais precisa o local onde irá ocorrer a inserção do gene (Abina, 2008).

Portanto, a construção de um veículo ótimo, ou seja, de uma forma de transportar para o interior das células os genes terapêuticos que seja eficiente e que consiga atingir as células alvo de forma seletiva e, acima de tudo, que não seja imunogênica e passível de gerar situações como as de Jesse Gelsinger ou outras, nas quais ocorra integração aleatória capaz de provocar o desenvolvimento de células tumorais, é o principal desafio técnico da terapia genética.

4.2. Questões éticas

A terapia genética como área de intervenção terapêutica encontra-se ainda na sua infância, existem ainda muitas incertezas quanto à técnica, especialmente quando ocorre integração dos genes terapêuticos ou sequências no genoma celular, uma vez que se trata de um processo irreversível e eventuais problemas na inserção da sequência, como é o caso da inserção mutagênica, podem vir a trazer consequências gravíssimas para o paciente, como o desenvolvimento de vários tipos de cancro. Terá sempre que haver uma avaliação do benefício *versus* risco e, nos casos onde ocorre a integração genética, será difícil encontrar situações em que compense ao paciente correr esses riscos.

Os ensaios clínicos de terapia genética em seres humanos até agora foram todos efetuados em células somáticas, e mesmo assim existem diversos problemas inerentes. Contudo, a sua realização em células germinais constituiria um risco acrescido, uma vez que qualquer alteração se iria repercutir em todas as células que se desenvolvam a partir dessa célula de forma irreversível, incluindo também nas células sexuais podendo influenciar desta forma também futuras gerações e essa possibilidade é suficiente para afastar por enquanto qualquer possibilidade de ensaios clínicos neste tipo de células humanas (Coutelle et al., 2003).

V. PERSPETIVAS PARA O FUTURO

Em Julho de 2012, a Agência Europeia do Medicamento (EMA), autorizou a promoção e comercialização de um tratamento baseado na terapia genética denominado Glybera®, do laboratório de biotecnologia holandês UniQure, para o tratamento de uma deficiência da lipoproteína lipase. Esta é uma enzima essencial na hidrólise dos lípidos, que obriga, na sua ausência, a que os pacientes tenham dietas muito rigorosas, nas quais não mais de 20% do aporte calórico diário pode provir de gorduras. O não cumprimento desta dieta restrita sujeita os indivíduos a ataques de pancreatite extremamente dolorosos e potencialmente fatais. Neste tratamento é utilizado um adenovírus (AAV1) com uma cópia intacta do gene humano da lipoproteína lipase, está disponível para comercialização sob forma de solução para injeção e é administrado juntamente com imunossuppressores para reduzir uma eventual resposta imune do organismo ao vírus (EMA, 2012). Neste momento é o único tratamento com aprovação para ser comercializado e apenas na União Europeia.

Existem vários ensaios clínicos que estão em fase avançada e provavelmente grande parte irá conseguir aprovação para ser comercializada. A empresa Advantagene tem em testes de fase 3 (na fase 4 já é permitida a comercialização) o ProstatAk®, um tratamento genético para o cancro da próstata para ser utilizado em conjunto com a radioterapia tradicional e um antivírico, neste caso o valociclovir. Neste caso, o vetor viral possui uma cópia funcional do gene da timidina cinase. A expressão deste gene nas células tumorais da próstata tornam-na um alvo do valociclovir administrado, onde este passa da sua forma de pró-fármaco para sua forma ativa. A taxa de recidivas do cancro da próstata passa dos 30%, nos indivíduos que apenas fazem radioterapia, para os 10%, nos indivíduos que fazem radioterapia associada com o ProstatAk®.

A empresa japonesa AnGesMG está na fase 3 de um ensaio clínico de terapia genética aprovado pela FDA para o Collatogene®, tratamento para complicações isquémicas periféricas, cardíacas, enfarte do miocárdio, angina do peito e edemas linfáticos. Para essa finalidade, utiliza um plasmídeo simples, sem recurso a um vetor viral, que é injetado diretamente no local onde existe a complicação vascular. O plasmídeo administrado contém o gene do fator de crescimento do hepatócito (HGF)

que, para além de ter a capacidade de estimular o crescimento de hepatócitos, também é capaz de estimular a angiogénese e a linfangiogénese (Makino et al., 2012).

Existem estudos que já estão em fases muito adiantadas dos ensaios clínicos, como se pode verificar na tabela 2.

Tabela 2: Tratamentos com base em terapia genética em fases finais de avaliação (adaptado de <http://www.technologyreview.com/news/519071/when-will-gene-therapy-come-to-the-us/>).

Companhia/Instituição	Doença Alvo	Estado do ensaio ou estudo
UniQure	Doença hereditária fatal que impossibilita a hidrólise dos lípidos	Aprovado para venda na Europa
Amagen	Melanoma metastático	Resultados promissores do último estágio do ensaio
AnGes Mg	Falência arterial nos membros	Aprovação pela FDA para iniciar o último estágio do ensaio
Bluebird Bio	Neurodegeneração hereditária e frequentemente fatal	Últimos ensaios começaram no fim de 2013
Children's Hospital of Philadelphia	Forma hereditária de cegueira	Último ensaio em abril de 2015
Cold Genesys	Cancro da bexiga	Últimos ensaios começam em outubro de 2015
Henry Ford Hospital	Cancro da próstata	Aprovado pela FDA o último teste do ensaio
Advantagene	Cancro da próstata	Previsão da conclusão dos ensaios em setembro de 2015

A terapia genética não é apenas uma distante miragem no futuro, atualmente já existe no mercado um tratamento baseado nesta nova abordagem. Com o contínuo aperfeiçoamento das técnicas de transferência, maior controle dos vetores virais e desenvolvimento de vetores não virais com eficiência mais próxima da dos virais, o leque de soluções disponíveis pode aumentar substancialmente a curto prazo, podendo dar resposta a problemas de saúde que até há bem pouco tempo seria impensável se poderem tratar.

VI. CONCLUSÃO

A terapia genética abre perspectivas de revolucionar o tratamento das diversas patologias, ao atuar diretamente na base da doença, na própria sequência genética que codifica a proteína corrompida ou ausente, permitindo desta forma que o doente não tenha que recorrer à administração regular de fármacos, comum na terapêutica convencional.

Conceptualmente, grande parte das patologias poderiam ser tratadas através da terapia genética, contudo, na prática, têm-se encontrado alguns desafios que não têm permitido explorar todo o seu potencial. Os principais desafios decorrem da imprevisibilidade da utilização de vetores virais, devido a fatores como a potencial imunogenicidade e inserção mutagénica. No entanto, estes continuam a representar a maioria dos ensaios clínicos de terapia genética.

As alternativas, sobretudo os vetores não virais, solucionam algumas dessas limitações, pois possuem uma baixa imunogenicidade e uma grande capacidade de carga de DNA. Contudo são, atualmente, substancialmente menos eficientes que os vetores virais, embora já tenham sido feitos progressos para diminuir essa limitação, como a adição de proteínas de superfície para permitir a entrada mediada por recetores, o que ajuda a encurtar o fosso que ainda existe entre os dois.

Apesar de existirem alguns desafios técnicos e éticos que necessitam de ser ultrapassados para que a terapia genética possa atingir uma maior adoção, o grande número de ensaios clínicos, alguns deles em fases avançadas, e a aprovação, por parte das agências responsáveis, da comercialização de tratamentos baseados na terapia genética, sugerem perspectivas animadoras para o futuro.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B. et al. (2008). *Molecular biology of the cell*. 4ª edição. New York, Garland Science.

Alam, T. et al. (2013). Correction of diabetic hyperglycemia and amelioration of metabolic anomalies by minicircle DNA mediated glucose-dependent hepatic insulin production. *Plos One*, 8(6), pp. 1-11.

Arumugam, P. e Malik, P. (2010). Genetic therapy for beta-thalassemia: from bench to bedside. *Hematology*, 2010, pp. 445-450.

Baum, C. et al. (2006). Retrovírus vectors: toward the plentivírus? *Molecular Therapy*, 13(6), pp. 1050-63.

Bakshi, S. S. et al. (1998). Distribution of CCR5 Δ 32 in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children and its Relationship to Disease Course. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(7), pp. 38-40

Abina, S. H. B. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovírus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(9), pp. 3132-3142.

Blease, R. et al. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA⁻ SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235), pp. 475-480.

Blomley, M. J. K. (2001). Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *British Medical Journal*, 322(7296), pp. 1222-1225.

Boucher, R. (2002). An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(11), pp. 1359-1371.

Cashman, S. M., Ramo, K. e Kumar-Singh, R. (2011). A non membrane-targeted human soluble CD59 attenuates choroidal neovascularization in a model of age related macular degeneration. *PLOS one*, 4(6), pp. 1-9.

Cavazzana, C. M. et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288(5466), pp. 669-672.

Cideciyan, A. et al. (2009). Human RPE65 gene therapy for Leber Congenital Amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 Year. *Human Gene Therapy*, 20(9), pp. 999-1004.

Chamberlain, J. S. (2002). Gene therapy of muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 11(20), pp. 2355-2362.

Channon, K. M. e Annex, B. H. (2000). Antithrombotic strategies in gene therapy. *Current Cardiology Reports*, 2(1), pp. 34-38.

Chen, L. et al. (2010). CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Respiratory*, 88(3), pp. 462-470.

Collins, F. S., Morgan, M. e Patrinos, A. (2003). The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300(5617), pp. 286-290.

Cotrim, A. P. e Baum, B. J. (2008). Gene therapy: some history, applications, problems and prospects. *Toxicologic Pathology*, 36(1), pp. 97-103.

Coutelle, C. et al. (2003). The hopes and fears of in utero gene therapy for genetic diseases - a review. *Placenta*, 24, pp. 114-121.

David, A. L. e Peebles, D. (2008). Gene therapy for the fetus: is there a future? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*. 22(1), pp. 203-218.

Didigu, C. e Doms, R. (2014). Gene therapy targeting HIV entry. *Viruses* 6(3), pp.1395-1409.

EMA European public assessment report (2012) [Em linha]. Disponível em http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002145/human_med_001480.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

Consultado em 25/08/2015.

Emanuelli, C. e Madeddu, P. (2001). Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 133(7), pp. 951-958.

Emery, A. E. (2002) The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), pp. 687–695.

Flotte T. R. (2004). Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated vírus (rAAV) vectors. *Gene therapy*, 10(11), pp. 805-810.

Freytag, S. et al. (2002). Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Research* 62(17), pp. 4968-4976.

Friedman, T. e Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic diseases? *Science*, 175(4025), pp. 949-955.

George, J. A. S. (2003). Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene therapy*, 10(14), pp. 1135-1141.

Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177(4), pp. 437-447.

Griffiths, A. et al. (2005). *Introduction to genetic analysis*. 8ª edição. New York, W. H. Freeman and Company.

Hall, R. A. e Kang, J. D. (2003). Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration. *Operative Techniques in Orthopedics*, 3(14), pp. 263-270.

Julie, M. R. (2014). Prevailing public perceptions of the ethics of gene therapy. *Human gene therapy*, 25(8), pp. 740-746.

Kay, M.A., Glorioso, J. C. e Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*, 7(1), pp. 33-40.

King, R. (2004). *Methods in molecular biology*. New York, Human Press.

Kresina, T. F. (2004). *An introduction to molecular medicine and gene therapy*. 4^a edição, New York, John Wiley and Sons.

Kwiatkowska, A. et al. (2013). Strategies in gene therapy for glioblastoma. *Cancers*, 5(4), pp. 1271-1305.

Lander, E. S. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), pp. 860-921.

Li, S. e Huang, L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy*. 7(1) pp. 31-34.

Lin, M. T. et al. (2000). The gene gun: current application in cutaneous gene therapy. *International Journal of Dermatology*, 39(3), pp. 161-170.

Mancuso, K. et al. (2009). Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates. *Nature*, 461(7265), pp. 784-787.

Makino, H. et al. (2012). Long-term follow-up evaluation of results from clinical trial using hepatocyte growth factor gene to treat severe peripheral arterial disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 32(10), pp. 2503-2509.

Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, 286(5448), pp. 2244-2245.

McMurty, M. et al. (2005). Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonar vascular apoptosis and reverses pulmonar arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(6), pp. 1479-1491.

McTaggart, S. e Al-Rubeai, M. (2002). Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnology Advances*, 20(1), pp. 1-31.

Nathwani, A. C. et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *The New England Journal of Medicine* 365(25), pp. 2357-2365.

Nathwani, A. et al. (2014). Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *The New England Journal of Medicine*, 371(21), pp. 1994-2004.

Nanjwade, K. B. et al. (2009). Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), pp. 185-196.

Newman, C. M. H. e Bettinger T. (2007). Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene therapy*, 14(5), pp. 465-475.

Nielsen, T. (1997). Human germline gene therapy. *McGill Journal of Medicine*, 3(2), pp. 126-132.

- Pankajakshan, D. e Agrawal, D. K. (2013) Clinical and translational challenges in gene therapy of cardiovascular diseases. *In: Molina, F. M. (Ed.) Gene Therapy – Tools and Potential Applications*. Rijeka, InTech, pp. 651-683.
- Qin, X. et al. (2001). Human and mouse IFN-gene therapy exhibits different anti-tumor mechanisms in mouse models. *Molecular Therapy*, 4(4), pp. 356-364.
- Ramalho, A. et al. (2002). Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(5), pp. 619-627.
- Read, A. e Strachan, T. (2010). *Human Molecular Genetics*. 4ª edição. New York, Garland Science.
- Ruland, N. et al. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 15(11-12), pp. 414-426.
- Sambrook, J. e Russell D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª edição. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samulski, R. J. et al. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO Journal*, 10(12), pp. 3941-3950.
- Schusters, B. et al. (2014). Overcoming the cystic fibrosis sputum barrier to leading adeno-associated virus gene therapy vectors. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(8), pp. 1484-1493.
- Ginn, S. L. et al. (2012). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012. *The Journal of Gene Medicine*, 15(2), pp. 65-77.

Surosky, R. et al. (1997). Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *Journal of Virology*, 71(10), pp. 7951-7959.

Tebas, P. et al. (2014). Gene editing of *CCR5* in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England Journal of Medicine*, 370(10), pp. 901-910.

Testa, F. et al. (2013) Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber Congenital Aumorosis Type 2. *Ophthalmology*, 120(6), pp. 1283–1291.

Templeton, N. S. (2015). *Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies*. 4ª edição. New York, CCR Press.

Tomlinson, E. e Rolland, A. P. (1995). Controllable gene therapy pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 39(2-3), pp. 357-372.

Uchegbu, I. F. (2002). *Gene therapy: the use of DNA as a drug*. London, Pharmaceutical Press.

Wells, D. J. (2004). Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene therapy*, 11(18), pp. 1363-1369.

Wu, T. L. e Zhou, D. (2011) Viral delivery for gene therapy against cell movement in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), pp. 671-7.

Wysocki, P. J., Mackiewicz-Wysocka, M. e Mackiewicz, A. (2002). Cancer gene therapy: state-of-the-art. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 7(4) pp. 149-155.

Yi, S. W. et al. (2000). A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum-resistant gene delivery system. *Pharmaceutical Research*, 17(3), pp. 314-320.

Yool, J. et al. (2012). Antitumor efficacy of 34.5ENVE: A transcriptionally retargeted and “Vstat120”-expressing oncolytic virus. *Molecular Therapy*, 20(2), pp. 287-297.

Zhang, Y., Zhu C. e Pardridge, W. M. (2002). Antisense gene therapy of brain cancer with an artificial virus gene delivery system. *Molecular Therapy*, 6(1), pp. 67–72.