

aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal (DPN) com eventual aborto dos fetos afectados (o qual é permitido, na nossa legislação, até às 24 semanas de gestação). Por outro lado, é deixada prosseguir até ao seu termo a larguíssima maioria das gravidezes de fetos sem a anomalia para a qual havia um risco elevado. O DPN tem, por esta via, um efeito pró-natalista, uma vez que, na sua ausência, muitas gravidezes de alto risco seriam abortadas indiscriminadamente. Exemplos particularmente bem sucedidos de programas de prevenção de doenças genéticas que adoptaram este modelo de intervenção são os dirigidos ao controlo de duas anemias hereditárias

graves com uma elevada prevalência regional, a saber a β talassémia e a anemia de células falciformes, respectivamente, nas populações mediterrânicas e cubana. Em ambos os casos se observou uma elevada adesão dos casais em risco ao DPN e, conseqüentemente, uma muito significativa redução da incidência daquelas doenças.

No nosso País, os serviços e consultas de genética médica oferecem DPN de doenças cromossómicas e de um conjunto de doenças génicas (cerca de 30 das quais já estudadas em laboratórios portugueses). Nesta comunicação será apresentada, a título de exemplo, a actividade do nosso centro no domínio da prevenção genética.

Bibliografia

Clarke A (1995) Population screening for genetic susceptibility to disease. *British Medical Journal* 311: 35-8.

Lavinha J, Gonçalves J, Faustino P, Romão L, Osório-Almeida L, Peres MJ, Picanço I, Martins MC, Ducrocq, Labie D, Krishnamoorthy R (1992) Importation route of sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Human Biology* 64: 891-01.

Modell B, Modell M (1992) *Towards a healthy baby*. Oxford University Press.

Santos H, Cordeiro I, Nunes L (1997) Genetic services in Portugal. *European Journal of Human Genetics* 5(S2): 140-4.

Terapia Génica: um Objectivo ou uma Realidade?

Deborah Penque

Investigadora Auxiliar, Centro de Genética Humana
Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge
1649-016 Lisboa, Portugal

Mais de 10.000 fenótipos variantes, de origem genética, são hoje conhecidos sendo na sua maioria doenças incuráveis. Com o advento das novas tecnologias, em particular, na área da biologia molecular, a aplicação clínica da terapia génica tem vindo a tornar-se numa possibilidade real de cura dessas doenças. Na última década, mais de 300 ensaios clínicos de terapia génica em fase I/II (ver abaixo), num total de mais de 3000 pacientes, foram realizados para o tratamento do cancro e de doenças genéticas tais como: deficiência da deaminase da adenosina, fibrose quística, hemofilia, doença de Gaucher e muitas outras. Recentemente, estes ensaios têm vindo ser extensíveis ao tratamento da SIDA e, em menor escala, as doenças cardiovasculares e neurológicas. Ensaios pré-clínicos estão também em progresso para as doenças autoimunes, alérgicas e na

regeneração de tecidos e de transplantes celulares. Com base na tecnologia da transferência génica, novas vacinas têm vindo a ser desenvolvidas sendo por esta razão denominadas de vacinas de imunização génica. Para a SIDA, este tipo de vacina tem como objectivo conferir imunidade contra a transmissão do vírus HIV-1. Outros programas de investigação têm também vindo a considerar o desenvolvimento terapêutico ou preventivo de vacinas contra a malária, tuberculose e aos vírus da hepatite A, B e C, influenza, La Crosse e Ébola. São, portanto, várias as aplicações terapêuticas da tecnologia de transferência génica. Contudo, a sua eficácia no combate à doenças permanece ainda questionável. Os recentes relatos em que um jovem americano com uma doença rara do fígado, foi vítima de um ensaio de terapia génica, veio

ressuscitar questões quanto à segurança e inocuidade deste tipo de terapia. Apesar deste incidente, parece aceitável pensarmos que, para a terapia génica, como para qualquer terapia, haverá sempre um grau de risco associado e que este estará dependente da doença em causa e dos métodos utilizados, bem como do estado geral e clínico do paciente.

Contudo, o sucesso da aplicação da terapia génica com segurança e sobretudo com eficácia na prevenção e no combate às doenças, dependerá essencialmente do aprofundar dos conhecimentos básicos da biologia molecular e da fisiopatologia das doenças bem como do desenvolvimento de metodologias eficientes de transferência génica.

Neste momento, podemos apenas considerar que a terapia génica é ainda um objectivo a alcançar mais do que uma realidade em que a sua aplicação sem riscos, como qualquer terapia convencional, tenha uma vantagem acrescida de aliviar ou curar em definitivo a doença em causa.

O conceito da terapia génica

O conceito - terapia génica - pode ser aplicado a qualquer procedimento terapêutico em que sequências nucleotídicas são intencionalmente introduzidas ou modificadas em células/tecidos humanos. Em geral, as sequências nucleotídicas introduzidas são moléculas de cDNA de genes normais que irão repor a funcionalidade de genes correspondentes que se encontram mutados nas células/tecidos a serem tratados.

Este tipo de estratégia tem sido utilizada para as doenças monogénicas tais como a fibrose quística, hemofilia e muitas outras. Na terapia génica de outras doenças como o cancro, são utilizados, entre outros, genes "suicidas", ou seja, genes que ao serem expressos levam a morte da célula, como é o caso do gene da enzima cinase da timidina (tk) do vírus da herpes. Este enzima tem a particularidade de converter a droga ganciclovir, que é administrada aos doentes após terapia com o gene *tk*, num metabolito tóxico e letal. Este metabolito é letal não só para as células cancerosas que passaram a expressar o gene "suicida" mas também, para as outras células cancerosas circundantes. Também no cancro, têm-se utilizado genes "marcadores", genes que conferem resistência à drogas e ainda, sequências nucleotídicas anti-sense. Estes últimos são moléculas de RNA anti-sense que ao serem introduzidos nas células impedem a expressão/tradução das suas correspondentes endógenas - moléculas de RNA sense - por emparelhamento de suas bases nucleotídicas.

Presentemente, a terapia génica contempla somente células somáticas, isto é, exclui a modificação genética das células germinais. Todas as células somáticas possuem, em princípio, a capacidade de receber um gene terapêutico. No entanto, a pré definição de células/tecido alvo,

tendo como base a natureza da doença, será sempre desejável.

Existem principalmente dois tipos de estratégias na terapia génica: ex vivo - em que as células alvo são geneticamente modificadas fora do organismo e, só depois, transplantadas para o indivíduo; e in vivo - em que os genes são introduzidos directamente nas células alvo, ou seja no tecido do indivíduo a ser tratado. Uma alternativa muito ambicionada mas que ainda não foi devidamente testada, será a introdução do gene terapêutico na corrente sanguínea e este encontrar o seu caminho em direcção ao tecido alvo. O sucesso da terapia génica depende da eficiência da transferência e dos níveis e regulação no espaço e no tempo da expressão do gene terapêutico, bem como da sobrevivência das células/tecido alvo geneticamente modificados no paciente. Noutras palavras, a terapia génica deve resultar na introdução de um gene que possibilite a produção no tempo, local e na quantidade desejada de uma proteína terapêutica que alivie ou cure a doença em causa. Como é evidente, os ensaios de terapia génica exigem um protocolo que assegure em primeira análise a segurança e inocuidade do tratamento. Assim, antes da aplicação em humanos, o gene terapêutico e o sistema de transferência desenvolvido são testados em células em cultura e em animais de experiência. Consoante os resultados destes primeiros ensaios, passa-se então para os ensaios clínicos em pacientes ou em indivíduos saudáveis. Existem essencialmente três fases de **ENSAIOS CLÍNICOS**: FASE I EM QUE são testadas a toxicidade e a farmacodinâmica; fase II em que são essencialmente testados os benefícios terapêuticos e finalmente a fase III em que são testadas a eficiência e inocuidade em comparação com outras drogas.

Os vectores na terapia génica

As metodologias associadas à terapia génica incluem métodos de

isolamento de genes celulares (clonagem), manipulação (engenharia genética) e transferência para células humanas. Normalmente a transferência e expressão do gene terapêutico em células humanas é acompanhada pela sua inserção em vectores de expressão. A função do vector é proteger e transportar eficazmente o material genético para o núcleo das células alvo onde é então descodificado (expresso) a fim de produzir a proteína terapêutica. Os vectores utilizados podem ser de origem viral ou não-viral.

Sistemas virais

Os vírus, que não são mais do que alguns genes de replicação revestidos por uma capa proteica, têm suscitado grande interesse como potenciais vectores na terapia génica. Isto porque, ao longo da evolução, têm vindo a desenvolver uma especificidade de infecção para determinadas células. Estes vírus antes de serem utilizados como vectores são alterados por técnicas de engenharia genética. Os genes responsáveis pela replicação viral (geralmente patogénicos) são, por exemplo, deletados e substituídos pelo gene terapêutico. Assim, estes vectores virais recombinantes e não competentes para a replicação, mantêm ainda a capacidade de um ciclo de infecção e ainda, expressar no interior do hospedeiro, genes que lhe estão associado ou seja o gene terapêutico.

Retrovírus - Os retrovírus têm a capacidade de se integrarem no genoma da célula hospedeira e, deste modo, se transmitirem de geração em geração. No entanto, a integração é virais são as células estaminais - células ainda não diferenciadas que persistem indefinidamente ou produzem descendentes especializados. As células estaminais sanguíneas, por exemplo, dão origem a todos os outros tipos de células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos, linfócitos do sistema imunitário e plaquetas) mantendo, simultaneamente, a sua capacidade auto-proliferativa. Neste momento, é

no entanto, extremamente difícil identificar as células estaminais humanas e modificá-las através da terapia génica com segurança.

Os investigadores têm vindo a alterar os vectores retrovirais, em particular a camada proteica que os reveste, na tentativa de os tornar mais específicos para um determinado tipo de célula. Estão também em progresso alterações no sentido de os tornar capazes de transformar células que não se encontrem em divisão, como também, de restringir os locais de integração.

Os **lentivírus** pertencem à família dos retrovírus. Possuem, no entanto, a capacidade de transfectar células que não se encontrem em divisão. O lentivírus mais conhecido e que têm vindo a ser desenvolvido como vector é o vírus da SIDA, o seja, o HIV. O vector recombinante deste vírus, quando injectado em animais de experiência, expressa-se por vários meses nos tecidos injectados. Parece também, não causar qualquer resposta imunitária no hospedeiro. A produção deste vector em concentrações desejáveis é, contudo, muito restrita actualmente.

Adenovírus - Os adenovírus têm capacidade de infectar diferentes tipos de célula e, ao contrário da maioria dos retrovírus, são capazes de transferir genes para células que não se encontrem em divisão. Por outro lado, não se integram o que diminui a possibilidade de interferir com genes vitais da célula hospedeira. No entanto, a sua expressão é só temporariamente efectiva. Os vectores adenovirais podem ser imunogénicos sendo a resposta imunitária dirigida, geralmente, contra as células transformadas. Transformações repetidas de células com o adenovírus são improdutivas uma vez que a resposta secundária do sistema imunitário pode prevenir a expressão ou destruir por completo todas as células contendo o adenovírus. Existe também a possibilidade de recombinação com os adenovírus endógenos potenciando assim o aparecimento de

novas variantes no meio ambiente. Actualmente, uma nova geração de vectores adenovirais estão a ser desenvolvidos no sentido de minimizar a sua reacção imunogénica e de recombinação.

Outros vírus - Uma série de outros vírus, em alternativa aos acima descritos, têm vindo a ser explorados como vectores na terapia génica. Entre eles o **vírus adeno-associado** (AVV), vírus do herpes simplex (HSV), vírus da varíola, alphavírus. Nenhum destes vírus é ainda considerado como o ideal, no entanto, cada um deles pode, no futuro, ter uma aplicação terapêutica particular. Por exemplo os AAV são de grande interesse uma vez que são responsáveis por infecções respiratórias benignas nos humanos. São, ainda, formas naturais que se integram no genoma humano, nomeadamente no cromossoma 19. No entanto, estes vectores são incapazes de acomodar grandes moléculas de DNA exógeno. Os HSV, ao contrário do AVV, não se integram no genoma do hospedeiro. Mas são atractivos como vectores de transformação de neurónios, pois algumas destas células retêm estes vírus numa forma mais ou menos inócua durante toda a vida do indivíduo infectado. Os HSV são portanto, potenciais vectores para a terapia génica de doenças neurológicas.

Sistemas não-virais

Os sistemas não-virais são uma alternativa aos vírus na transferência génica pois, ao contrário destes, não causam qualquer tipo de doença e são pouco tóxicos. Para além disso, são fáceis de manipular. Actualmente, alguns destes sistemas são aplicados em conjunto com os vectores retrovirais e adenovirais no sentido de aumentar a eficiência de transferência destes vectores.

Lipossomas - Os lipossomas são pequenas esferas de lípidos catiónicos com capacidade de acomodar internamente grandes moléculas de DNA. Estas moléculas podem ser vectores plasmídicos

contendo o gene terapêutico ou simplesmente fragmentos de DNA. Este sistema permite, por exemplo, aplicar a estratégia do **RNA-antisense** em que a expressão de certos genes é silenciada. Contudo, os lipossomas não são tão eficientes na transferência génica quanto os vírus. Daí que, tenham sido efectuadas algumas alterações na sua composição no sentido de mimitizar os vírus e assim aumentar a sua eficiência e especificidade.

Sistemas não-lipídicos - Os sistemas não lipídicos, tais como os polímeros de amino ácidos e outras substâncias têm sido também testados na transferência de genes terapêuticos. Estas substâncias, tais como os lípidos, têm como objectivo transportar e proteger o gene terapêutico de possíveis acções enzimáticas no interior da célula.

Alguns investigadores têm ainda explorado a injeção de DNA, sem qualquer protecção (**DNA-nú**), no interior das células dos pacientes. Tal como a estratégia do RNA-antisense, o DNA-nú parece promissor na imunização contra as doenças infecciosas, certos tipos de cancro e na prevenção de rejeição de órgãos transplantados.

As miniaturas de cromossomas, nomeadamente o **cromossoma artificial humano** contendo o gene terapêutico e ainda material genético necessário para sua regulação (replicação e expressão), constituem também mais uma estratégia em desenvolvimento na terapia génica. As suas principais vantagens são a maior capacidade de incorporação de moléculas de DNA, não se integram, não são tóxicos ou imunogénicos, e o mais importante, a expressão do gene terapêutico aí inserido é regulado de forma semelhante ao gene endógeno. Podem, no entanto, necessitar de novas formas de transferência para as células. O Sector de Investigação em Fibrose Quística do Centro de Genética Humana do INSA-Lisboa têm vindo, recentemente, a participar num Projecto com outros sete laboratórios Europeus, cujo o Alemão é o principal responsável, no

desenvolvimento de um cromossoma artificial humano para a terapia génica da fibrose quística. A participação do grupo Português é sobretudo na sequenciação de fragmentos de moléculas de DNA do gene da fibrose quística que irão servir para construir todo o gene. Numa fase mais avançada, serão também os principais responsáveis pela sua validação em células em cultura e ou animais de laboratório.

O futuro

Na terapia génica, permanece ainda por desenvolver um sistema eficaz de transferência génica que possibilite a expressão da proteína terapêutica, no tempo/espaço e nas quantidades necessárias, que seja capaz de transformar um indivíduo doente num indivíduo saudável. O aprofundar dos conhecimentos básicos da biologia da célula/tecido e de sua complexa relação com o organismo como um todo é sem dúvida um factor essencial para o sucesso da terapia génica. O

esclarecimento dos efeitos funcionais da proteína anómala que se pretende substituir e/ou silenciar através da terapia génica, parece também um factor fundamental. Na fibrose quística, por exemplo, muito se tem avançado neste sentido o que tem possibilitado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em alternativa à terapia génica. Denominadas, recentemente, por terapia de reparação proteica, estas terapias têm por finalidade utilizar drogas específicas para repôr a funcionalidade normal da proteína mutada. Estas drogas variam consoante o defeito a ser reparado que, por sua vez, depende do tipo de mutação encontrada. Algumas destas drogas já se encontram em fase I de ensaio clínico.

No futuro, um ou outro método quer de transferência génica quer de terapia de reparação proteica, poderá ser aplicado clinicamente com objectivo terapêutico.

E, uma vez que dificilmente se reunirão numa única metodologia, a perfeição e a eficácia desejada, parece também plausível a combinação de diferentes estratégias terapêuticas na resolução de um único problema clínico.

Referências Bibliográficas

1. 'Making Gene Therapy Work' Scientific American (Junho 1997), special report.
2. Anderson WF (1998) 'Human Gene Therapy' Nature, 392: 25-30.
3. Verma IM & Somia N (1998) 'Gene Therapy - Promises, Problems and Prospects' Nature, 389: 236-242.
4. Romano G et al (2000) 'Latest Developments in Gene Transfer Technology: Achievements, Perspectives, and Controversies over Therapeutic Applications'. Review. Stem Cells, 18:19-39.
5. Zeitlin PL (1999) 'Novel Pharmacology Therapies for Cystic Fibrosis' J Clin Invest 103: 447-452.
6. <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical>

Organismos Geneticamente Modificados: uma Perspectiva da Indústria de Alimentos Compostos para Animais

Jaime Piçarra

Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais, IACA
Av. 5 de Outubro, 21 – 2º Esq
1050 Lisboa

1. Introdução

Dada a importância do milho e dos produtos do complexo soja na alimentação animal - representando cerca de 30% e 17%, respectivamente, ou seja, 47% do total das matérias primas consumidas - o debate em torno da utilização de organismos geneticamente modificados assume particular relevância na indústria de alimentos compostos para animais. Por outro lado, é preciso não esquecer a dependência do exterior no

aprovisionamento de matérias primas, sendo o nosso país deficitário em cerca de 70%, com a soja a representar uma dependência total, sendo importada da Argentina, Brasil e Estados Unidos.

Nesta perspectiva, a abordagem ao tema proposto deve ser discutida sob dois diferentes aspectos: por um lado, no âmbito da **segurança alimentar** e, por outro lado, em **termos da globalização dos mercados/negociações da Organização Mundial do**

Comércio, ou seja, no âmbito da competitividade futura da indústria de alimentos compostos - tanto mais que os custos de aprovisionamento representam cerca de 80% dos custos dos alimentos compostos - e, dada a importância das rações nos preços da pecuária, à luz da capacidade competitiva de toda a Fileira Pecuária

2. A Segurança Alimentar

Com as crises da BSE em 1996 e das dioxinas em 1999, os problemas ligados à alimentação animal passaram a ser objecto de análise e especulação na comunicação social, muitas vezes com um carácter bastante mais emotivo do que científico em que todas as questões aparecem directamente ligadas, conduzindo a uma má imagem dos