

# **Novas Tecnologias na Genética Humana:**

---

## **Avanços e Impactos para a Saúde**

Maria Celeste Emerick  
Karla Bernardo Mattoso Montenegro  
Wim Degrave

**2007**

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial desta obra desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.  
Tiragem 1ª edição: 2.100 exemplares

**Distribuição e informações:**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

Projeto Ghente/GESTEC-NIT/Vice-Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico  
Av. Brasil, 4365 – Castelo Mourisco – Salas. 01,03 e 06 – Manguinhos  
Rio de Janeiro – RJ – CEP: 21040-360 – Tel: (21) 38851721/1731/163-3  
Email: ghente@ghente.org - Home page: <http://www.ghente.org>  
Administrador e Webmaster Projeto Ghente – Leonardo Silva Leite

**Novas Tecnologias na Genética Humana: Avanços e Impactos para a Saúde**

Organização: Maria Celeste Emerick, Karla Bernardo Mattoso Montenegro e Wim Degrave  
Edição: Karla Bernardo Mattoso Montenegro  
Colaboração: Leonardo Silva Leite e Marcos Lins Langenbach  
Projeto Gráfico: Capa: Adriana Montenegro. Desenho e pintura, com apropriação de “O homem vitruviano”, Leonardo da Vinci.  
Diagramação: Antonielle Nunes e Impressão: Edil Artes Gráficas

---

**Seminário: Células-Tronco: Possibilidades, riscos e limites no campo das terapias no Brasil (Maio de 2006)**

Realização: Projeto Ghente/GESTEC-NIT/FIOCRUZ

Apoio: DECIT e CESUPA

Comissão Organizadora: Eliane Moreira (CESUPA), Karla Bernardo M. Montenegro (FIOCRUZ), Leonardo Leite (FIOCRUZ), Marlene Braz (IFF), Maria Celeste Emerick (FIOCRUZ), Maria Helena Lino (FIOCRUZ), Wim Degrave (FIOCRUZ)

**Seminário: Novas Tecnologias da Genética Humana: Avanços e Impactos para Saúde (Março de 2007)**

Realização: Projeto Ghente/GESTEC-NIT/FIOCRUZ

Apoio: DECIT e OPAS

Comissão Organizadora: Karla Bernardo M. Montenegro (FIOCRUZ), Leonardo Leite (FIOCRUZ), Maria Celeste Emerick (FIOCRUZ), Silvio Valle (FIOCRUZ), Wim Degrave (FIOCRUZ)

**Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ**

N936 Novas tecnologias na genética humana : avanços e impactos para a saúde / organizadores Maria Celeste Emerick, Karla Bernardo Mattoso Montenegro [e] Wim Degrave. – Rio de Janeiro : [GESTEC-Nit], 2007. 252 p.

Projeto Ghente/GESTEC-Nit.

1. Genoma humano. 2. Células-Tronco. 3. Farmacogenética. 4. Bioética. 5. Nanobiotecnologia. 6. Terapia gênica. 7. Biotecnologia – Patentes. I. Emerick, Maria Celeste. II. Montenegro, Karla Bernardo Mattoso. III. Degrave, Wim.

CDD: 611.0181663

# Terapia Gênica: Onde estamos e para onde iremos: Esperança ou Ilusão?\*

**Melissa Gava Armelini**

*Pesquisadora do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo*

O termo terapia gênica pode ser definido como uma intervenção médica baseada na modificação do material genético de células vivas, resultando em benefício terapêutico (FDA, 1993). Atualmente, os Estados Unidos é o país que mais possui protocolos de terapia gênica em andamento, aproximadamente 65% dos protocolos são norte-americanos.

Os protocolos de terapia gênica visam tanto o tratamento de doenças hereditárias, como fibrose cística, hemofilia, xeroderma pigmentosum e também o tratamento de doenças adquiridas como câncer e AIDS, sendo que a grande maioria dos protocolos visa o tratamento de câncer. Esses protocolos podem ser desenvolvidos de duas maneiras: *in-vivo* ou *ex-vivo*.

Os protocolos *in-vivo* consistem em colocar o gene terapêutico dentro de um vetor, seja ele qual for, e administrar o vetor terapêutico diretamente no organismo. Já nos protocolos *ex-vivo*, algumas células alvo são retiradas do organismo, essas células recebem o gene terapêutico *in-vitro* e então essas células tratadas são devolvidas para o indivíduo.

O grande desafio da terapia gênica é colocar o gene terapêutico dentro das células. Existem várias estratégias para que isso aconteça, mas essas estratégias podem ser divididas entre métodos virais e não-virais.

Dentro dos métodos não-virais encontram-se a injeção de DNA nu e também o método de transfecção através de lipossomos.

Já os métodos virais se utilizam de vírus recombinantes como veículos para a transdução gênica.

Cada um dos vetores virais apresenta vantagens e desvantagens. No caso dos retrovírus, a vantagem é o maior tempo de expressão do transgene porque o retrovírus integra o seu genoma no DNA da célula que foi infectada. Esses vetores apresentam alta eficiência de transdução *ex-vivo* e baixa imunogenicidade. Porém, ele apresenta desvantagens sérias, como baixa transdução *in vivo*, o tamanho do

gene a ser inserido no vetor é limitado a 8 Kb, ele infecta somente células em divisão, e a integração do seu genoma no DNA da célula pode acarretar a ativação de oncogenes o que pode levar ao desenvolvimento de um câncer inesperado.

Os primeiros protocolos de terapia gênica em humanos foram realizados em 1990 por R.M. Blaese e colaboradores. A deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA) é uma doença genética rara que ocasiona um comprometimento imune severo em crianças (SCID, “Severe combined immunodeficiency”). Linfócitos T periféricos de duas crianças que apresentavam disfunção desta enzima foram modificados geneticamente *ex-vivo* através de um vetor retroviral carregando o gene da ADA e reimplantados de forma autóloga através da corrente sanguínea. Além disso, essas crianças receberam também a enzima ADA bovina purificada (PEG-ADA) por administração exógena. Os resultados foram animadores, contudo não existem evidências conclusivas sobre a contribuição precisa do procedimento de terapia gênica independente do tratamento alternativo. Além disso, até 2005, apareceram três casos de leucemia entre os pacientes tratados com esse vetor retroviral e verificou-se que o retrovírus se inseriu perto de um oncogene, ativando-o.

Outro tipo de vetor muito utilizado é o vetor adenoviral. Os adenovírus são compostos por DNA de fita dupla. Esse vetor apresenta alta eficiência de infecção e de transdução tanto *in-vivo* como *ex-vivo*, infectando também células que não estejam se replicando. Esse vetor é o mais clinicamente testado e é capaz de infectar vários tipos celulares. A grande desvantagem do vetor adenoviral é a forte resposta imune, e por esse motivo não permite várias aplicações. Além disso, a expressão do transgene é transiente porque o DNA do vetor permanece de forma episomal dentro da célula.

Os vetores adenovirais de primeira geração são deletados nos genes E1 e E3. Essa deleção faz com que esse vírus não seja replicativo em células-alvo.

Marchetto e colaboradores (2004) utilizaram vetores adenovirais carregando o gene de reparo de DNA XPA para complementar a deficiência de camundongos nocautes nesse gene. Mutações no gene XPA e também em outros genes da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos levam ao desenvolvimento de uma síndrome humana chamada Xeroderma Pigmentosum (XP). Essa é uma síndrome rara de herança autossômica recessiva. Os pacientes apresentam alta incidência de câncer de pele, sendo que em alguns grupos de complementação, os pacientes também apresentam problemas neurológicos.

Os ensaios realizados nos camundongos nocautes mostraram que esses vetores foram capazes de infectar a pele do dorso dos animais e expressar o transgene de forma eficiente, pelo menos nas primeiras 48 horas. Os camundongos infectados e depois submetidos à irradiação com luz UVB não desenvolveram câncer, assim como os camundongos selvagens. Porém 100% dos camundongos nocautes que não tiveram sua deficiência complementada pelo vetor adenoviral desenvolveram carcinoma de célula escamosa. A principal conclusão desse trabalho foi que a terapia gênica é um processo possível para o tratamento dos pacientes XP.

Porém, terapia gênica com adenovírus é inviável porque esses vetores induzem forte resposta imune do organismo.

Uma alternativa para superar esse problema é o uso de vetores adeno-associados (AAV). O vírus adeno-associado é composto de DNA fita simples e recebe esse nome porque ele depende do adenovírus ou do HSV para cumprir o seu ciclo replicativo. Na ausência desses vírus, o AAV integra no cromossomo 19 e permanece ali na forma latente. Esse vetor transduz eficientemente uma grande variedade de células *in vivo* e apresenta expressão do transgene bastante prolongada, pois induz fraca resposta imune.

Onze sorotipos de AAV foram identificados, juntamente com mais de cem seqüências correspondentes a novas classes de AAV, sendo os humanos os principais hospedeiros. Apesar de 80% da população ser soropositiva para o subtipo mais comum, o AAV-2, nenhuma patologia foi associada com esse vírus.

A habilidade do AAV em infectar pele tem sido validada recentemente. Curiosamente, o trabalho de Meyers et al (2000) mostra que o AAV2 consegue se replicar sem a presença de nenhum vírus helper em uma cultura de pele artificial derivada de queratinócitos humanos. Consistente com essa observação, vetores rAAV2 portando o gene LacZ ( $\beta$ -galactosidase) ou GFP (green fluorescent protein) transduziram eficientemente queratinócitos humanos (Braun-Falco et al, 1999), com a expressão do transgene chegando aos 50 dias. Mais recentemente, um trabalho similar confirmou a transferência gênica *ex-vivo*, onde uma pele recombinante positiva para o transgene foi construída utilizando um sistema de cultura epitelial organotípica (Agrawal et al, 2004). A transdução do gene repórter GFP foi confirmada em queratinócitos humanos utilizando a nova geração de vetores AAV2 recombinantes que são livres de contaminação por adenovírus durante sua preparação. A transferência gênica nessas células foi aumentada através do uso de inibidores de proteossomos (Braun-Falco et al, 2005).

Em modelos animais, o rAAV também mostrou-se capaz de realizar a transferência gênica diretamente na pele *in-vivo*. Injeção subcutânea de rAAV em camundongos resultou em alta e longa expressão (até nove meses) das proteínas secretadas, como a eritropoietina murínica, e LacZ (Donahue et al, 1999). Um outro trabalho utilizou como modelo, porcos em miniatura que possuem a pele similar à pele humana (Hengge and Mirmohammadsadegh, 2000). Esse trabalho demonstrou que a injeção dermal de vetores AAV2 portando o gene repórter LacZ resultou em expressão do transgene na pele dos animais. Embora a área infectada fosse ainda pequena, a expressão da  $\beta$ -galactosidase foi observada não apenas em queratinócitos em divisão ou pós-mitóticos, mas também nos apêndices da pele, como células epiteliais dos folículos pilosos e das glândulas sudoríparas. A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi detectada por mais de 40 dias. No entanto, esse trabalho também revelou que a administração repetida do vetor foi acompanhada pela redução na expressão do transgene, uma limitação que provavelmente ocorreu devido à neutralização imunológica dos vírus injetados, como já havia sido previamente observado para os primeiros vetores AAV (Halbert et al, 1997).

Recentemente, apesar de não visar a infecção da pele, um trabalho encorajador confirmou a habilidade do AAV em mediar longa expressão gênica. Em estudos clínicos de fase I com oito pacientes hemofílicos, a administração em músculo esquelético de vetores rAAV portando o gene do fator IX provou ser seguro, e a expressão do transgene em níveis terapêuticos foi alcançada por pelo menos 10 meses (Jiang et al, 2006). O mesmo trabalho mostra experimentos semelhantes com cachorros hemofílicos, onde o fator IX foi detectado em biópsia de músculo e na circulação por mais de quatro anos.

Sendo assim, o próximo passo para terapia gênica em pacientes XP é a utilização desses vetores para infecção da pele e verificar a eficiência do AAV nesse processo, tanto na infecção das células da epiderme e folículos pilosos quanto na duração da expressão do transgene.

## Referências

- Braun-Falco M, Eisenried A, Buning H, Ring J. Recombinant adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer into human keratinocytes is influenced by both the ubiquitin/proteasome pathway and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Arch Dermatol Res*. 2005 May; 296(11):528-35.
- Donahue BA, Yin S, Taylor JS, Reines D, Hanawalt PC. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8502-6.
- Halbert CL, Standaert TA, Aitken ML, Alexander IE, Russell DW, Miller AD. Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration. *J Virol*. 1997 Aug;71(8):5932-41.
- Hengge UR, Mirmohammadsadegh A. Adeno-associated virus expresses transgenes in hair follicles and epidermis. *Mol Ther*. 2000 Sep;2(3):188-94.
- Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, Liu T, Nagy D, Vargas JA, Zhou S, Scallan CD, Sommer J, Vijay S, Mingozzi F, High KA, Pierce GF. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3321-8.
- Marchetto MC, Muotri AR, Burns DK, Friedberg EC, Menck CF. Gene transduction in skin cells: preventing cancer in xeroderma pigmentosum mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 21;101(51):17759-64.
- Meyers C, Mane M, Kokorina N, Alam S, Hermonat PL. Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology*. 2000 Jul 5;272(2):338-46.

*\* Este texto é uma edição feita a partir da transcrição da palestra de Melissa Gava Armelini no Seminário "Novas Tecnologias da Ciência Humana: Avanços e Impactos para a Saúde".*