

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 – Mangunhos
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 Degraeve
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 Degraeve (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 Degraeve (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 Degraeve. – 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. Degraeve, Wim.

CDD: 611.0181663

Terapia Gênica para Isquemia de Membros

Sang Won Han

Diretor do Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica da Universidade Federal de São Paulo

Terapia gênica remete a uma área nova da Medicina. O primeiro ensaio clínico de terapia gênica aconteceu no ano de 1990. De lá para cá, são 17 anos de estudo clínico de terapia gênica. Hoje, temos mais de mil diferentes protocolos clínicos (concluídos e em andamento) no mundo todo envolvendo mais ou menos 5.000 pacientes. E como estaria essa situação no Brasil?

No Brasil temos poucos grupos que possuem a terapia gênica como linha principal de pesquisa. Podemos colocar a UNIFESP como uma das pioneiras nesta área. Com apoio dos governos federal, estadual e municipal e da própria UNIFESP, foi possível montar o primeiro centro de terapia gênica do país. É um centro totalmente novo, inaugurado em 2004, com uma área de cerca de mil metros quadrados, onde cerca de seis grupos trabalham em diferentes áreas voltadas para esse tema e também para terapia celular. Uma das minhas preocupações em particular é a divulgação desse tema, através da qualificação de alunos de graduação e de pós-graduação, através de disciplinas e cursos específicos. Um desses teve caráter internacional, pois contou com a participação do Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia – CBAB; realizamos dois desses cursos na UNIFESP e em anos anteriores em Buenos Aires.

Pelo fato de a terapia gênica ser uma área multidisciplinar, ela engloba conhecimentos oriundos da Medicina, biologia molecular e celular, e outras áreas básicas e inovadoras. Assim sendo, o conhecimento gerado tem caráter científico e tecnológico direcionado a medicina. Dentro desse contexto, o objetivo desse centro é agregar pessoas de diferentes áreas – motivo pelo qual o nome do centro foi definido como Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica. Muitos médicos, de diversos setores, participam do nosso grupo de pesquisadores em diversos projetos, contribuindo para a consolidação da terapia gênica no país.

O assunto que abordarei é uma das minhas linhas de pesquisas que estamos conseguindo colocar na fase clínica: terapia gênica para isquemia crônica crítica de membros. Este tipo de estudo será um bom exemplo até onde os acadêmicos poderão chegar na fase clínica; quem sabe, posteriormente, alguém possa montar uma empresa de biotecnologia também com base nesses estudos, o que é muito importante do ponto de vista sócio-econômico e acadêmico-tecnológico.

Primeiro vamos entender a patologia selecionada como alvo do estudo: a isquemia crônica crítica de membros, que segundo a estatística afeta cerca de 500 a 1.000 pacientes em cada um milhão. No Brasil, isso resulta em cerca de 100 mil a 200 mil pacientes (1000 a 3000 casos novos todos os anos). É, portanto, um problema sério do ponto de vista epidemiológico. Até o momento, a única forma de tratar esta doença é via cirurgia de revascularização, um procedimento com cerca de 5 a 10 horas de duração e que muitas vezes não soluciona a doença totalmente. Retomando estatísticas extremamente relevantes, cerca de 50% desses pacientes conseguem uma melhora parcial ou integral através dessa cirurgia. Outros 25% não têm opção terapêutica e sofrem amputação. Os demais casos representam impossibilidade de tratamento e óbitos decorrentes da isquemia. Assim, vemos que esse é um problema seríssimo.

Quem sofre desse tipo de problema? Um diabético tem cerca de 50% de chance de ter este problema, que é um fator mais agravante da sua condição física. No momento, portanto, a terapia gênica e a terapia celular (ou seja, uso de células-tronco), representam terapias alternativas para esse tipo de doença. Mais do que uma nova terapia – e vocês perceberão ao longo do tempo – é uma inovação em relação à cirurgia, em relação à forma e à complexidade.

A terapia gênica para doenças vasculares, tanto para membros ou coração, teve seu início logo após o primeiro ensaio clínico de terapia gênica em 1990. A primeira publicação relacionada a esse tópico ocorreu em 1996, mas o resultado não foi muito bom. O trabalho de 1998, no qual o vetor foi injetado intramuscular, teve excelente resultado e representou a força propulsora da terapia gênica para doenças isquêmicas.

Hoje há mais de mil protocolos clínicos de terapia gênica, sendo que, entre eles, mais ou menos cem são direcionados para o estudo clínico de terapia gênica para doenças vasculares de membros e cardiovasculares. Para isquemia de membros, particularmente, há cerca de 20 casos.

Vamos entender como seria o processo da terapia gênica – válido, obviamente, também para qualquer outra estratégia de terapia gênica. A escolha adequada de um gene é o primeiro passo importante para o sucesso da terapia gênica. Os resultados dos projetos genoma, transcriptoma e farmacogenômica podem auxiliar na escolha de um gene para uma determinada doença.

Segundo passo: qual seria o meio de transferência desse gene? Diariamente, entramos em contato com diferentes genes (ou seja, DNA). Por exemplo, logo após uma refeição, normalmente são consumidos cerca de 400g a 500 g de comida e, por consequência, cerca de dezenas de gramas de DNA. Se o DNA entrasse em nossas células facilmente, estaríamos fazendo terapia gênica automaticamente, o que não é o caso. Ou seja: colocar DNA em nossas células é uma tarefa difícil. Como fazer isso? Para solucionar essa questão, desenvolveu-se a tecnologia dos vetores. Existem várias formas de construir vetores. Uma das formas mais comuns

é utilizar vírus, porque o vírus é um produto evolutivo de milhões de anos capaz de infectar muito bem as nossas células. Então, como transformar um vírus em um vetor? Baseando-se no conhecimento de genoma viral em nível molecular, seus genes nocivos são removidos e os genes terapêuticos são inseridos no lugar. As proteínas virais necessárias para a formação de vetor viral são fornecidas *in trans*, ou seja, através de uma linhagem de célula modificada para expressar os genes virais necessários.

E qual via de terapia gênica? Uma vez que você monta o sistema de vetor, dependendo do seu alvo (o cérebro, o fígado, o coração), temos de escolher uma via de terapia gênica. Duas vias de transferência de vetor podem ser usadas: *in vivo* ou *ex vivo*. A introdução direta de um vetor em um órgão ou na circulação sanguínea de pacientes é conhecida como transferência gênica *in vivo*. Por outro lado, os órgãos alvos de terapia gênica podem ser modificados geneticamente a partir das células obtidas por biópsia e depois essas células são introduzidas novamente no paciente. Nesse caso, o processo é denominado de transferência gênica *ex vivo*.

Onde queremos chegar com a terapia gênica para tratar pacientes com isquemia de membros? A terapia que existe hoje é a cirurgia. É um processo extremamente invasivo, doloroso e longo. Nós queremos chegar a um nível de solução para outras terapias gênicas também, onde uma simples injeção de vetor seja suficiente para a obtenção de efeito terapêutico. Imaginemos um cenário hipotético: um dia alguém irá desenhar esses vetores e deixá-los na prateleira de uma farmácia e posteriormente alguém irá lá comprá-los para fazer uma injeção intramuscular, para que seu próprio organismo produza novos vasos evitando todo aquele sofrimento.

Os vetores derivados de adenovírus e de plasmídeo são os mais usados para terapia gênica para isquemia de membros, pois ambos são eficientes para transferência gênica *in vivo* pela via intramuscular.

O Dr. Jeffrey Isner publicou em 1998 um estudo de grande importância: cerca de dez pacientes com problema de isquemia crônica e crítica de membros foram selecionados para estudo de terapia gênica. Através de imagens de raio X tiradas antes e depois de oito semanas (antes e dois meses depois da aplicação do protocolo de terapia gênica, portanto), pode-se perceber nítida diferença na quantidade de vasos. O mais impressionante de tudo isso é que a estratégia dele para abordar o problema da isquemia nesses pacientes foi extremamente simples. Foram injetadas intramuscularmente soluções de plasmídeo contendo o gene VEGF (fator de crescimento endotélio vascular): 4 miligramas de DNA no total, por 30 dias, o que permitiu que ele alcançasse esses resultados fantásticos e impactantes! Todo esse sonho que eu tinha comentado no começo, relacionado à resolução desse problema de circulação com base simplesmente nas injeções intramusculares de DNA, Isner realizou com êxito, já em 1998.

Houve um paciente em particular que foi acompanhado pelo próprio pesquisador - antes da terapia gênica esse paciente estava também com úlcera. De um a

três meses depois, avaliações não apenas visuais, mas também fisiológicas, como a medição do índice chamado ABI (índice de tornozelo e braquial) para determinar a relação da pressão de tornozelo e do braquial, foram realizadas. Por que avaliar o tornozelo? Como esse paciente tem problema circulatório, a pressão local cai bastante. O valor de ABI 0,3 é crítico e o paciente pode sofrer amputação. Após tratamento com terapia gênica, no período de tempo mencionado, as análises mostraram que o índice subiu de 0,3 para 0,6. Este incremento tem um valor terapêutico muito grande.

Outro ponto importante mostrado neste estudo é o nível de expressão do gene VEGF após terapia gênica. O uso de vetor plasmidial fez com que a produção do VEGF fosse transiente, onde a duração da produção do fator foi de aproximadamente uma semana, mas suficiente para obter esses resultados surpreendentes.

O que chama atenção é o seguinte: no caso de uma doença hereditária, o paciente já nasce com esse problema em todas as células. As estratégias para terapia, portanto, concentram-se na modificação permanente do maior número de células desses pacientes. No caso de doença isquêmica, como a isquemia de membros, o tratamento precisa ser diferente, porque essa é uma doença que surge com decorrer do tempo. Os fatores como o fumo, o diabetes e a velhice contribuem fortemente para o surgimento e para a piora desta doença. Nesse caso, não é bom produzir um fator terapêutico por muito tempo, particularmente quando esse fator é um mensageiro como o VEGF. Por quê? Da mesma forma que esse VEGF é responsável pela formação de vasos, ele também pode promover a formação de vasos nos tumores. Ou seja, se o paciente tem suspeita de algum tumor, ele pode melhorar a circulação, mas também pode melhorar o crescimento do tumor. Por isso é preciso tomar cuidado antes de submeter os pacientes em uma terapia deste tipo.

Um outro trabalho apresentado por um grupo do Japão utilizou outro fator de crescimento chamado fator de crescimento hepático, com racional experimental semelhante ao do grupo do Isner, onde um vetor foi elaborado na base de plasmídeo e injetado pela via intramuscular. Como falei anteriormente, o índice ABI é um indicador muito importante para avaliação dessa doença, e houve melhora significativa nesses pacientes após terapia gênica.

Os estudos desse grupo estão indo muito bem, tanto é que esse estudo de terapia gênica para isquemia crítica de membros já está na Fase 3. O que significa Fase 3? Significa que, terminando o estudo, esse produto e esse processo já poderão ser usados na rotina médica.

O que nós estamos fazendo lá no Centro de terapia gênica para isquemia crítica de membros? Aqueles fatores que mencionei anteriormente, ou seja, VEGF ou HGF, são importantes porque promovem o crescimento dos vasos a partir de células endoteliais ou de células precursoras. Todo mundo sabe que o endotélio é um elemento essencial para a formação de vasos. Para idealizar uma nova forma de terapia gênica, foi preciso entender melhor os mecanismos moleculares e celulares

de formação de vasos. Durante a embriogênese, os vasos são formados via vasculogênese a partir das células primitivas. Como será isso? Todos nós fomos formados a partir de uma única célula fecundada, correto? O que significa que essa célula contém todas as informações genéticas necessárias para formação de um indivíduo, ou seja, tecidos, sangue, vasos, etc. Isso é o que acontece durante a embriogênese, onde as células primitivas são formadas e a partir dessas células novos vasos são formados, o que nós chamamos de vasculogênese. Foi visto recentemente que isso também acontece na fase adulta. Estas células são um tipo de célula-tronco – já utilizadas em terapia atualmente.

Outro mecanismo de formação de vasos é angiogênese. É um processo mais comum que acontece a todo momento com a isquemia. A isquemia induz brotamento de vasos pequenos (capilares) a partir de um vaso principal. É um processo rápido, mas para a necessidade fisiológica a isquemia pode não atender à demanda necessária.

O terceiro processo chamamos de arteriogênese, o que considero mais importante fisiologicamente. Quando você tem um vaso principal, estes são acompanhados de vasos colaterais de menor calibre, mas são bem maiores do que os capilares. A diferença parcial de oxigênio provocada pela isquemia local leva à expressão de uma série de genes para remodelamento de vasos colaterais, o que leva à formação de vasos mais calibrosos.

Nosso raciocínio antes de montar um novo protocolo de terapia gênica para isquemia de membros iniciou com objetivo de promover os três processos de formação de vasos simultaneamente. Entre vários genes candidatos, o gene que funcionou melhor foi o GM-CSF (granulocyte colony stimulating factor). Esse é um fator importante e bem conhecido pelos hematologistas, pois é utilizado para mobilizar as células-tronco para transplante de medula óssea. Recentemente foi descoberto que é um fator importante para arteriogênese por inibir a morte de monócitos, que são importantes para arteriogênese.

Além disso, ele é um agente quimiotático para os granulócitos. Quando você tem um enfarte ou isquemia de membros, isso leva a um processo inflamatório. Com isso, os granulócitos são atraídos ao local, e uma das atividades biológicas promovidas por essas células é a produção de fatores de crescimento, como o VEGF, o responsável pela angiogênese. A junção dessas informações nos levou à utilização desse gene para tratamento de isquemia de membros, por ter possibilidade de induzir vasculogênese, angiogênese e arteriogênese.

Segunda etapa da montagem de um processo de terapia gênica é a escolha de um vetor adequado para isquemia de membros. Nesse caso, desenhamos novas moléculas a partir de plasmídeo. Por que plasmídeo? Porque é uma molécula fácil de desenhar, fácil de manipular, mais fácil de produzir do que os vetores virais - como os derivados de HIV. Do ponto de vista da biossegurança, os vetores plasmidiais também são os melhores. Falei que um DNA entrar em uma célula é uma

tarefa difícil, mas sabe-se que existe todo um mecanismo molecular para que o mesmo chegue até o núcleo.

Em função disso, planejei uma série de moléculas que pudessem funcionar melhor em situações de isquemia. Sabemos que, quando temos isquemia, essas células alteram o padrão de expressão gênica para salvar as células e os tecidos isquêmicos através de formação de novos vasos. Baseado nestas informações desenhamos uma série de vetores, inserindo nos mesmos essas informações.

Para demonstrar a funcionalidade do protocolo de terapia gênica elaborado *in vivo*, é necessário ter um modelo animal com isquemia de membros. Isto é feito cirurgicamente fechando a circulação da artéria principal, que é a artéria femoral, e outras artérias colaterais locais.

Com isso, observamos que esses animais sofreram de necrose depois de uma semana, onde alguns perderam patas, outros ficaram com necrose nos dedos e outros nas unhas. Este estudo foi realizado com a autorização do protocolo pelo comitê de ética da UNIFESP e também do comitê interno de biossegurança.

Depois de quatro semanas de terapia gênica, o que aconteceu com esses animais? Hoje posso falar que mais de 100 animais foram testados e nenhum deles perdeu a pata. Pelo contrário, a maioria deles estava com unhas ainda enegrecidas, outros com a pata levemente enegrecida, mas enfim, todos tinham pata inteira - não somente inteira, mas pata *funcional*.

Se a terapia gênica trouxe tudo isso de melhoramento visual, o que teríamos em termos de ganho de massa muscular? Se olharmos os animais normais, eles têm mais ou menos 200 mg de massa muscular. Se não tratarmos esses animais isquêmicos, eles perdem cerca de 50% de massa muscular, enquanto que os animais tratados com terapia gênica recuperam praticamente 100% da massa.

Se houve aumento de massa muscular, é de se esperar que a força também seja recuperada. Percebam o que acontece: animais normais conseguem levantar mais de 70 g de peso, mas os animais isquêmicos não levantam nem 10 g depois de quatro semanas. Os animais tratados, contudo, recuperaram praticamente 100% da força.

Com a conclusão desses estudos pré-clínicos, recentemente (março 2007) um protocolo clínico de terapia gênica com GM-CSF foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, e estamos aguardando a decisão final.