

TERAPIA GÊNICA

Sergio U. Dani

Médico pela Universidade Federal de Minas Gerais; Doutor em Medicina pela Universidade de Hannover, Alemanha; Livre-Docente em Genética pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; Bolsista do Programa Jovem Pesquisador em Centro Emergente, da FAPESP; Diretor de Pesquisa & Desenvolvimento da Genon Ltda. sudani@rgm.fmrp.usp.br

Vetores para terapia gênica

Fotos cedidas pelo autor

Terapia gênica é o tratamento de doenças baseado na transferência de material genético. Em sua forma mais simples, a terapia gênica consiste na inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos, para substituir ou complementar esses genes causadores de doenças. A maioria das tentativas clínicas de terapia gênica atualmente em curso são para o tratamento de doenças adquiridas, como AIDS, neoplasias malignas e doenças cardiovasculares, mais do que para doenças hereditárias. Em alguns protocolos, a tecnologia da transferência gênica vem sendo usada para alterar fenotipicamente uma célula de tal modo a torná-la antigênica e assim desencadear uma resposta imunitária. De maneira análoga, um gen estranho pode ser inserido em uma célula para servir como um marcador genotípico ou fenotípico, que pode ser usado tanto em protocolos de marcação gênica quanto na própria terapia gênica. O panorama atual indica que a terapia gênica não se limita às possibilidades de substituir ou corrigir genes defeituosos, ou eliminar seletivamente células marcadas. Um espectro terapêutico muito mais amplo se apresenta à medida em que novos sistemas são desenvolvidos para permitir a liberação de proteínas terapêuticas, tais como hormônios, citocinas, anticorpos, antígenos ou novas proteínas recombinantes. A terapia gênica é a esperança de tratamento para um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos convencionais, das hereditárias e degenerativas às diversas formas de câncer e doenças infecciosas.

A tecnologia básica envolvida em qualquer aplicação da terapia gênica é a transferência gênica. Vários métodos atuais de transferência gênica e suas vantagens e desvantagens estão listados nas Tabelas 1 a 3. A maneira mais simples de transferir genes para células e tecidos é por meio da inoculação de DNA puro, com técnicas de *microinjeção*, *eletroporação* e o *método biobalístico*. Métodos mais elaborados e mais eficientes incluem a administração de DNA encapsulado (*e.g.*, *lipossomos*); ou através de vetores virais, que podem ser

fragmentos de DNA de vírus contendo o DNA a ser transferido; ou mesmo a partícula viral formada por proteínas virais empacotando um DNA viral modificado de maneira a tornar o vetor menos tóxico, menos patogênico ou não-patogênico.

A palavra *vetor*, que deriva do Latim *vector* (“aquele que carrega, entrega”) define o agente que constitui ou contém os genes a serem transferidos e expressos em uma célula receptora. Os diversos tipos de vetores são utilizados com o objetivo de levar o DNA terapêutico ao núcleo das

Tabela 1
Métodos Químicos para Introdução de Genes em Células de Mamíferos

Método	Vantagens	Desvantagens
DNA-fosfato de cálcio	Morte celular durante o procedimento é mínima; importante na produção de vetores virais recombinantes; simples e barato; expressão pode ser transitória ou estável;	Só <i>ex vivo</i> ; transfecção é baixa; baixo nível de expressão do transgen;
DNA-DEAE dextran	Mais reprodutível que o método anterior;	Só <i>ex vivo</i> ; transfecção é baixa e transitória; só funciona em alguns tipos celulares
DNA-lípide (lipossomos)	Não se integram ao genoma hospedeiro; uso <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ; carregam grandes pedaços de DNA (tão grandes como cromossomos inteiros); direcionáveis; não-imunogênicos; preparações livres de contaminantes (cf. vetores virais); alto grau de pureza; padronização	Baixa eficiência de transfecção em relação aos sistemas virais; expressão transitória do transgen; leve toxicidade celular; podem ser inibidos por componentes séricos
DNA-proteína DNA-lípide-proteína	Maior direcionamento	-
HACs (cromossomos artificiais)	Não se integram no genoma; inserções maiores são possíveis; melhor controle transcricional	Em desenvolvimento

células-alvo. Outra forma de transferência da mensagem genética envolve a entrega de RNA diretamente ao citoplasma das células, mas o RNA é mais instável que o DNA, o que limita a aplicação dessa modalidade de transferência gênica. O uso de mitocôndrias ou DNA mitocondrial (mtDNA) como vetores gênicos citoplasmáticos tem aplicação potencial na reposição do mtDNA a células com deficiência no metabolismo energético da fosforilação oxidativa causada por mutações no mtDNA. Afora o núcleo, a mitocôndria é a única organela que possui seu próprio DNA.

Uma questão-chave da terapia gênica é a escolha do vetor adequado a cada situação. Um vetor ideal seria aquele que pudesse acomodar um tamanho ilimitado de DNA inserido, fosse disponível em uma forma concentrada, pudesse ser facilmente produzido, pudesse ser direcionado para tipos específicos de células, não permitisse replicação autônoma do DNA, pudesse garantir uma expressão gênica a longo prazo e fosse não-tóxico e não-imunogênico. Tal vetor ainda não existe e nenhum dos sistemas de entrega de DNA atualmente disponíveis para transferência gênica *in vivo* é perfeito com respeito a qualquer um desses pontos. Até a presente data, quatro sistemas de transferência gênica (DNA plasmidial complexado, vetores retrovirais, vetores adenovirais e vetores baseados no vírus adeno-associado) foram os mais usados em tentativas de terapia gênica em humanos, totalizando uma experiência clínica de cerca de três mil pacientes em todo o mundo.

DNA Plasmidial Complexado

Um vetor plasmidial é uma molécula de DNA circular purificada, construída por meio de técnicas do DNA recombinante para conter, além do gen terapêutico de interesse, sequências regulatórias tipo promotores e intensificadores, para facilitar e controlar a expressão do gen. Vetores de DNA plasmidial podem ser introduzidos nas células por uma variedade de métodos. O mais óbvio deles, conceitualmente, é a injeção direta, que exige técnicas sofisticadas para injeção em escala microscópica. Essa técnica, entretanto, é limitada pelo fato de que somente um número relativamente pequeno de células pode ser injetado em um determinado momento. Apesar das tentativas de automatizar as técnicas de microinjeção, o pequeno número de células que podem ser injetadas por vez continua sendo uma grande limitação. Esse método de transferência gênica poderá ter interesse e de utilidade clínica se um pequeno número de células purificadas da medula óssea forem injetadas e condições de cultivo celular forem encontradas para expandi-las substancialmente. Entretanto, ainda existirá o problema da

expressão transitória, pois a maioria das células injetadas com o vetor não será capaz de manter a expressão por longo prazo. Isso exige outras melhorias na sequência do vetor, de modo a aumentar, por exemplo, a eficiência de sua integração.

Aumento da eficiência de transfecção do DNA plasmidial purificado pode ser obtido com a formação de algum tipo de complexo: lipídico, protéico, ou misto. Após a aplicação desse complexo nas células em cultura ou *in vivo*, uma porção substancial das células endocita o DNA e é capaz de transportar pelo menos parte dele para o núcleo, onde o DNA é expresso transitoriamente por alguns dias (**Figura 1**). A não ser que o DNA plasmidial tenha a capacidade de integração dirigida, apenas uma fração muito pequena (geralmente muito menos de 1 por cento) das células retêm o DNA permanentemente, incorporando-o em seus cromossomos e continuam a expressar os genes introduzidos.

Vetores Virais

Vírus são vetores gênicos por excelência e vêm evoluindo há milhões de anos na natureza em associação com virtualmente todos os organismos, de bactérias até plantas e animais. Os sistemas biomoleculares específicos de transferência, recombinação e expressão gênica adotados pelos vírus constituem instrumentos poderosos para a construção de vetores mais eficientes e seguros, com indicações precisas de uso. Bacteriófagos, baculovirus, retrovirus, adenovirus e virus adeno-associados são exemplos de vírus que foram modificados com sucesso pelas técnicas do DNA recombinante e já possuem aplicações na pesquisa, na agricultura e na medicina. Conceitualmente, não é surpreendente que vírus de animais estejam sendo usados como vetores para a transferência de genes para células de mamíferos. Conforme listado na **Tabela 3**, vários vírus vêm sendo explorados desta maneira.

Vetores Retrovirais

Um retrovirus murino, o vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV), foi o primeiro sistema vetorial desenvolvido para aplicações clínicas da terapia gênica. Os conceitos gerais da produção e uso desse tipo de vetor estão ilustrados na **Figura 2**: Por meio de técnicas de DNA recombinante, os genes no genoma viral necessários para a reprodução do MoMuLV, genes *gag*, *pol* e *env*, são removidos e substituídos por um gen de interesse. O que sobra do retrovirus são seus elementos regulatórios: as repetições terminais longas (LTR), que funcionam como sinais de integração do provirus e promotores da transcrição e um sinal de empacotamento, para permitir que o RNA transcrito seja acomodado em uma partícula viral. Para a

produção dos vetores retrovirais contendo o gen de interesse, é utilizada uma *linhagem celular de empacotamento* contendo os genes *gag*, *pol* e *env* incorporados ao genoma destas células. Os vetores são produzidos em altos títulos nas células de empacotamento e a seguir purificados e injetados no paciente (terapia gênica *in vivo*) ou postos em contato com células colhidas do paciente e mantidas em condições de cultivo celular (terapia gênica *ex vivo*). Os vetores têm a habilidade de entrar nas células-alvo, transcrever seu RNA na forma de DNA (graças à atividade da enzima *transcritase reversa*), e se integrar estavelmente em um cromossomo da célula como resultado da presença das sequências regulatórias retrovirais remanescentes. Uma vez integrado, o gen inserido pode ser expresso para produzir a proteína terapêutica desejada. O vetor retroviral, desprovido dos genes para a replicação viral, não é competente para a replicação (diz-se que o vetor é “defectivo”), e por isso não é capaz de produzir mais vírus competentes dentro da célula-alvo. Portanto, o vetor age como um agente final de transferência gênica, deixando uma cópia de sua sequência no genoma da célula-alvo.

Vetores Adenovirais

Os adenovírus humanos são DNA-vírus, não envelopados, com um genoma dupla-fita linear de, aproximadamente, 36 kb, encapsulado em um capsídeo icosaédrico medindo 70-100 nm de diâmetro. O capsídeo contém em seus vértices espículas por onde se dá a interação com receptores celulares. Na natureza, os adenovírus são capazes de infectar células do trato respiratório e gastrointestinal, causando gripes, gastroenterites em crianças ou conjuntivites epidêmicas. As glândulas adenóides são um de seus alvos e de onde se originou o nome adenovírus. Infecções envolvendo o trato urinário, vias hepáticas e o sistema nervoso central podem ocorrer esporadicamente. A maioria, senão a totalidade dos adultos já foi exposta ao adenovírus e já possui anticorpos anti-adenovírus. Ao contrário dos retrovirus, os adenovírus se replicam independentemente da divisão da célula hospedeira, e seu cromossomo raramente se integra ao genoma da célula, permanecendo episomal na maioria das vezes. A integração parece ocorrer somente na presença de altos níveis de infecção em células em divisão, mas esse evento não contribui significativamente para a utilidade destes vírus como vetores. Os vetores adenovirais possuem um largo espectro de infectividade celular que inclui virtualmente todas as células pós-mitóticas e mitóticas (**Figura 3**), e também podem ser produzidos em elevados títulos.

Tabela 2**Métodos Físicos para Introdução de Genes em Células de Mamíferos**

Método	Vantagens	Desvantagens
Microinjeção direta	Alta taxa de transfecção; evita a degradação citoplasmática e lisossomal do material injetado; técnica muito trabalhosa; requer células muito bem isoladas	Só <i>ex vivo</i> ; potencial para uso em terapia gênica da linhagem germinativa apresenta problemas técnicos e éticos
Eletroporação	Alta taxa de transfecção	Só <i>ex vivo</i> ; muita morte celular torna o procedimento pouco eficiente
Injeção de plasmídeo	Simplicidade; 2-19 kb podem ser facilmente transferidos para músculo; uso em vacinação gênica	Baixa porcentagem de fibras expressam o transgen após a injeção; uso restrito a pele, timo e músculo estriado
Injeção balística de DNA	Alta taxa de transfecção; entrega de doses precisas; uso em vacinação gênica	Expressão transitória; lesão celular considerável no centro da região atingida pelo disparo

A estrutura genômica dos adenovírus é mais complexa que a dos retrovírus. O genoma adenoviral codifica aproximadamente 15 proteínas. A expressão gênica viral ocorre de uma maneira ordenada e é dirigida, em grande parte, pelos genes E1A e E1B, localizados na porção 5' do genoma adenoviral. Esses genes possuem funções de transativação para a transcrição de vários genes virais e da célula hospedeira. Como estes genes da região E1 estão envolvidos na replicação do adenovírus, sua remoção torna o vírus incompetente para replicação ou "defectivo". A remoção também cria espaço para a inserção de um gen de interesse terapêutico. A região E3, cujo produto está envolvido na habilidade do vírus de escapar do sistema imunológico do organismo hospedeiro, também pode ser substituída por um DNA exógeno.

Para a produção de vetores adenovirais, é necessário utilizar, a exemplo do que ocorre com vetores retrovirais defectivos, uma linhagem de células empacotadoras contendo genes virais que transcomplementam o vetor defectivo a ser produzido. As etapas principais de produção e uso de um vetor adenoviral estão ilustradas na **Figura 4**. Uma das modalidades começa pela produção de um plasmídeo ou cosmídeo contendo o genoma do adenovírus com deleções em algumas regiões especiais, como a região E1. A deleção de E1 torna o vírus defectivo. O gen de interesse pode ser clonado nestas regiões deletadas, e o plasmídeo ou cosmídeo pode ser multiplicado em uma cultura de bactéria. O plasmídeo ou cosmídeo purifi-

cado é então transfectado para as células empacotadoras onde ele é empacotado na forma de partículas adenovirais defectivas. Os vetores adenovirais assim produzidos são isolados do meio de cultivo das células empacotadoras, e purificados por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de céso, que também concentra o vetor em suspensões com elevada titulação (mais de 10^{13} UFP ml⁻¹), ou por cromatografia. O vírus purificado é estável em uma variedade de tampões aquosos e pode ser congelado por períodos prolongados sem perda de atividade.

Uma estratégia alternativa de produção de vetores adenovirais consiste em preparar um plasmídeo no qual o gen de interesse é flanqueado por seqüências de DNA adenovirais. Estas seqüências servem como regiões controle e contêm sinais de empacotamento e sítios para a recombinação com DNA genômico adenoviral, que será usado para reconstituir adenovirions defectivos dentro da célula empacotadora. A transfecção desse plasmídeo para células empacotadoras, juntamente com o DNA genômico de adenovírus com deleções selecionadas (e.g., E1, E3) leva, por meio de *recombinação homóloga*, à formação de partículas adenovirais com o(s) transgen(es) substituindo as regiões previamente deletadas. Portanto, tanto a clonagem direta, quanto a recombinação homóloga podem ser usadas para produzir adenovirions defectivos. Com o desenvolvimento de novas linhagens de células de empacotamento contendo um número cada vez maior de genes adenovirais para a

transcomplementação, já é possível produzir vetores adenovirais contendo um número cada vez menor de seqüências adenovirais e um número cada vez maior de seqüências exógenas. Um vetor adenoviral "all deleted" foi produzido recentemente. Esse vetor possuía 28 kb de DNA exógeno (gen da distrofina) e apenas 8 kb de seqüências adenovirais.

Vetores Adeno-Associados

Algumas características desfavoráveis dos vetores adenovirais e retrovirais revisitas na **Tabela 3** incluem a incapacidade de integração do DNA dos vetores adenovirais ao genoma da célula hospedeira, ocasionando uma expressão instável e a integração aleatória do DNA dos vetores retrovirais ao genoma hospedeiro, podendo acarretar mutagênese insercional ativadora de proto-oncogenes celulares humanos ou inativação de genes supressores de tumor. Além disso, esses vetores podem provocar resposta imunológica dos tipos humoral e celular e podem ser patogênicos.

Vetores alternativamente indicados para contornar esses problemas são baseados no vírus adeno-associado (AAV, *adeno-associated virus*), um pequeno vírus de DNA, não envelopado, não patogênico, pertencente à família Parvoviridae. O AAV possui uma única molécula de DNA fita simples de 4681 bases, com repetições terminais invertidas (ITRs, *inverted terminal repeats*). Os ITRs são seqüências palindrômicas de 145 pares de bases envolvidas na regulação do ciclo celular do AAV, dispostas nas porções terminais 5' e 3' do genoma viral, que servem como origem e iniciadores para a replicação do DNA. Flanqueadas pelas ITRs, duas amplas *mol-duras abertas de leitura* codificam uma proteína regulatória e outra estrutural denominadas *rep* e *cap*, respectivamente. A região de leitura situada na porção 5' (gen *rep*) codifica quatro proteínas não-estruturais envolvidas com a replicação genômica. A porção 3' contém o gen *cap*, que codifica três proteínas estruturais para a formação do capsídeo viral.

O AAV é considerado um *dependovirus* porque somente é capaz de se replicar em uma célula na presença de um vírus auxiliar (adenovírus ou vírus da herpes), que lhe forneça, em transcomplementação, os fatores auxiliares essenciais para sua replicação. Na ausência do vírus auxiliar, o genoma do AAV integra-se, preferencialmente, em um sítio específico (AAVS1) no braço curto do cromossomo 19, entre q13.3 e qter, utilizando para isso os ITRs, com alta freqüência e estabilidade, para estabelecer uma infecção latente tanto em células mitóticas quanto em células pós-mitóticas. Recentemente, formas episomais do vírus também foram identifica-

das e a integração em sítios não específicos foi documentada, porém não há, até o momento, nenhuma relação destas formas com oncogênese insercional. O provírus latente pode ser recuperado e replicado através de uma superinfecção com o vírus auxiliar.

O vírus adeno-associado tem despertado grande interesse como um vetor potencial para transferência de genes em tentativas de terapia gênica humana. Entre as suas propriedades mais favoráveis estão: (I) nenhuma relação com doenças humanas; (II) poder de infecção de uma ampla gama de linhagens celulares derivadas de diferentes tecidos; (III) a sua habilidade de integrar dentro do genoma hospedeiro e estabelecer uma infecção latente. Este tipo de integração pode ocorrer em células que não estejam em processo de divisão, embora aconteça com uma frequência menor que em células em divisão. Soma-se a estas características favoráveis o tipo de integração proporcionado pelo AAV. A capacidade de transdução com AAV recombinante (rAAV) tem sido demonstrada em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo as diferenciadas, o que sugere um grande potencial desse sistema de vetor para transferência gênica *in vivo* para órgãos como músculo, fígado, sistema nervoso central e pulmão.

Vetores rAAV são derivados de plasmídeos que carregam os ITRs flanqueando o gen exógeno de interesse. Esses vetores podem ser empacotados dentro do capsídeo do AAV pela co-transfecção em células infectadas com (I) adenovírus, e (II) um segundo plasmídeo de empacotamento contendo os genes *rep* e *cap* (Figura 5). O rAAV é recuperado em células lisadas e o vírus auxiliar é removido. Desta forma, quatro elementos são requeridos para o empacotamento do vetor AAV: (I) células eucarióticas em cultura, (II) as proteínas responsáveis pela replicação do genoma viral e síntese do capsídeo, (III) o DNA do vetor e (IV) o vírus auxiliar.

As desvantagens de utilizar partículas rAAV como vetores de transferência gênica estão no tamanho do seu genoma (acima de 5 kb ocorre interferência no encapsulamento viral), o que limita a clonagem de determinados genes, e a dificuldade de produzir o vetor viral em grandes quantidades. Entretanto, vários melhoramentos têm sido obtidos na produção e uso de vetores baseados em AAV. A dificuldade de produzir estes vetores em larga escala foi minimizada pela utilização de

Tabela 3

Métodos Biológicos para Introdução de Genes em Células de Mamíferos

Vetores	Vantagens	Desvantagens
Retrovirais	Alta taxa de transdução; amplo espectro de hospedeiro (somente células em divisão); sistema muito bem estudado e conhecido; integração no genoma hospedeiro; proteínas do vetor não expressas no hospedeiro	Imunogênico; requer células em divisão; risco de mutagênese insercional; risco de reversão para o tipo selvagem; inativação pelo complemento; baixos títulos; baixa taxa de entrega <i>in vivo</i>
Adenovirais	Amplo espectro de hospedeiro (células mitóticas e não mitóticas); altos títulos; alta eficiência de transdução; genoma viral episomal; vírus selvagem causa doença leve; não envelopado	Imunogênico; reversão para o tipo selvagem; período curto de expressão gênica em células em divisão (depuração do epissomo); “vazamento” de proteínas virais
Adeno-associados	Amplo espectro de hospedeiro; nenhuma doença humana associada; infecta células em divisão ou paradas; integração dirigida é preferencial	Limite ao empacotamento de DNA; integração não é sempre sítio-dirigida; imunogênico (?)
Híbridos Adenovirus-AAV	Amplo espectro; altos títulos; alta eficiência de transdução; integração dirigida	Imunogênico
Herpes simples	Episomal; pode induzir infecção latente por toda a vida (especialmente no CNS); acomoda insertos grandes; produção de altos títulos	Imunogênico; vírus diferentes têm seletividade diferente; EBV é oncogênico; ativação de vírus latente; baixa eficiência de transdução; expressão transitória nos vetores atuais; sistema em desenvolvimento
HIV	Infectam e transduzem células mitóticas e pós-mitóticas, por longo prazo	Sistema pouco conhecido; eficiência baixa <i>in vivo</i>
Vaccinia	Potencial para desenvolvimento de uma grande variedade de vacinas gênicas	Uso limitado aos indivíduos não previamente vacinados; uso não indicado em imunossuprimidos

plasmídeos contendo sequências de ITR e sua multiplicação em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. A restrição ao tamanho do genoma viral também foi minimizada, visto que esses plasmídeos não precisam ser encapsulados em um capsídeo viral, podendo ser introduzidos em células eucarióticas utilizando a técnica de transfecção com lipossomos, sem prejuízo do amplo espectro de infectividade celular característico do AAV.

Combinações de

Elementos Virais e Não-Virais

A combinação de elementos virais e não-virais tem sido usada para aumentar a eficiência da transferência gênica para células em cultura. Um exemplo de combinação de elementos virais e não virais é uma alternativa ao uso de partículas de rAAV

mencionada anteriormente, e consiste na construção de plasmídeos com sequências de ITR delimitando genes de interesse para promover a transformação gênica em células eucarióticas e conferir maior persistência do DNA transfetado, se comparada àquela obtida com plasmídeos convencionais sem os ITRs. Os vírus AAV podem ser substituídos por esse tipo de construção complexada em lipossomos, pois os níveis de expressão gênica e retenção do transgen nas células transfectadas por esses complexos são semelhantes aos níveis obtidos com partículas virais encapsuladas.

Mitocôndrias e DNA Mitochondrial

A mitocôndria é a única organela que possui seu próprio DNA (mtDNA). Em princípio, as mitocôndrias se assemelham

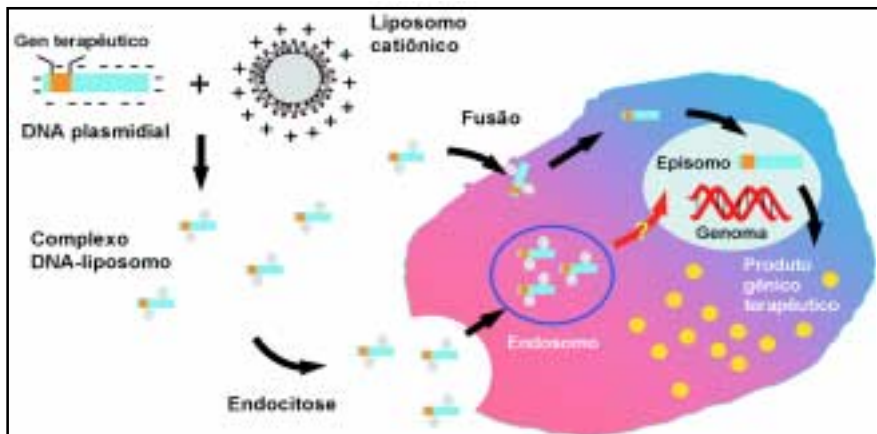


Figura 1. Os complexos formados entre lipídios ou fosfolipídios e DNA constituem lipossomos. Lipossomos catiônicos são geralmente preparados a partir de fosfolipídios bipolares e consistem de um núcleo hidrofílico, delimitado por uma camada lipídica externa. Os lipídios catiônicos formam interações eletrostáticas com a molécula fortemente aniônica do DNA de maneira espontânea, promovendo o encapsulamento do ácido nucleico. Os lipossomos assim produzidos possuem um amplo espectro de infectividade celular

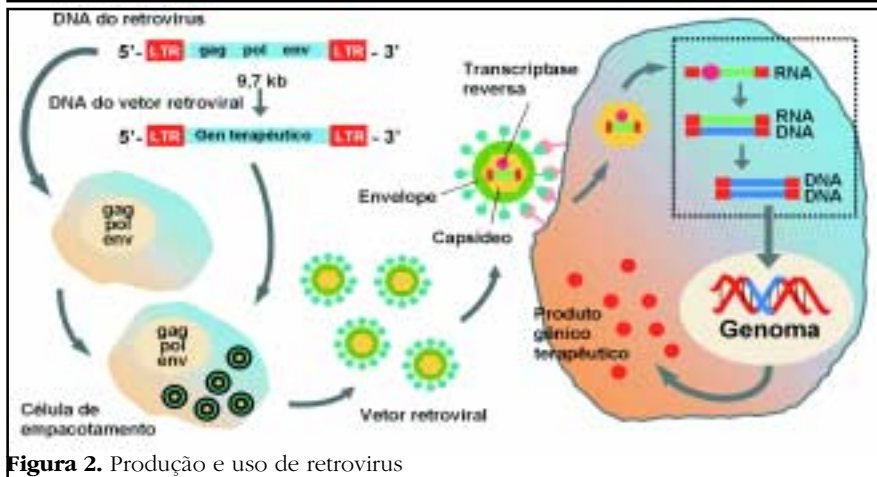


Figura 2. Produção e uso de retrovírus

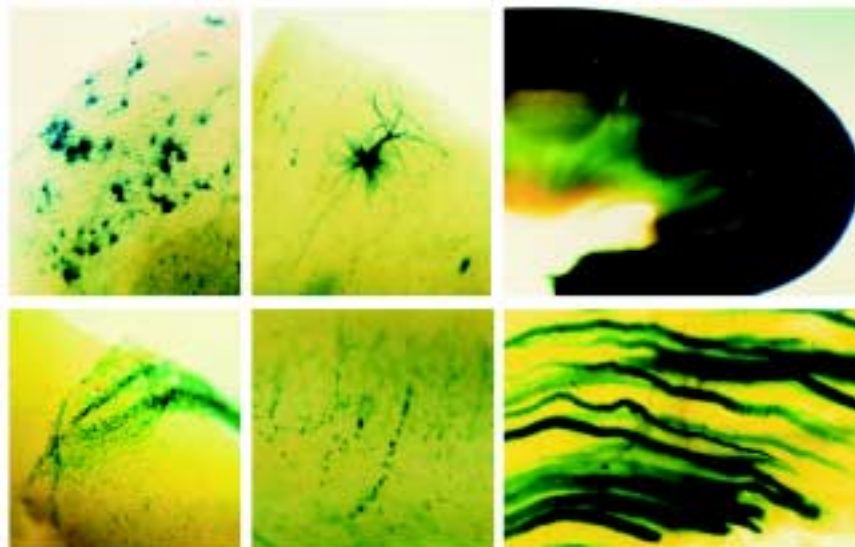


Figura 3. Amplo espectro de infectividade celular de um vetor adenoviral carregando o gen *LacZ* de *E. coli*, que codifica a enzima beta-galactosidase. A expressão do gen é denotada pela cor azul do substrato X-gal, metabolizado pela enzima nas células infectadas pelo vetor. No sentido horário, começando pelo canto superior direito: (I) córtex renal de coelho, após infusão intracarotídea do vetor; (II) fibras de músculo estriado esquelético de rato, após injeção intramuscular do vetor; (III) células endoteliais em capilar de cérebro de rato, após infusão intracarotídea do vetor; (IV) fibroblastos na pia mater de rato, após injeção intraparenquimal do vetor; (V) astrócitos no córtex cerebral de rato, após injeção estereotáxica do vetor; (VI) neurônio piramidal do córtex do giro do cíngulo, após injeção estereotáxica do vetor no hipocampo de rato

aos lipossomos utilizados em transferência gênica, constituídos de membranas lipídicas envolvendo moléculas de DNA. Uma vez que mitocôndrias podem ser purificadas por ultracentrifugação de homogenizados celulares, elas poderiam ser utilizadas como vetores de transferência gênica. Mitocôndrias isoladas do sangue de doadores podem ser fundidas a células receptoras, gerando híbridos de citoplasma (cibridos) viáveis. O uso de mitocôndrias ou do DNA mitocondrial (mtDNA) como vetores gênicos tem aplicação potencial na reposição do mtDNA a células com deficiências no metabolismo energético da fosforilação oxidativa causadas por mutações. Mutações no mtDNA estão ligadas a um grande número de síndromes degenerativas neuromusculares com padrão de herança materna. Além disso, mutações no mtDNA ocorrem em células da linhagem somática e se acumulam durante o envelhecimento e em condições de stress oxidativo, e podem explicar boa parte dos fenótipos característicos da idade avançada, como fraqueza muscular, doença de Alzheimer e doença de Parkinson.

Conclusão e Perspectivas

Várias doenças incuráveis pelos métodos terapêuticos convencionais representam perspectivas futuras para a aplicação da terapia gênica. Contudo, ainda existem limitações com relação à eficiência e direcionamento dos vetores de transferência gênica da geração atual. Os vetores virais recombinantes são os veículos mais potentes para a transferência gênica, mas a resposta imunológica do hospedeiro e as dificuldades de produção em larga escala e padronização ainda são grandes barreiras para seu uso clínico. A entrega de DNA via lipossomos ou via direcionamento a receptores celulares oferece alternativas elegantes para a transferência mediada por vírus, mas os níveis de expressão gênica obtidos com esses métodos precisam ser melhorados significativamente antes que eles possam ser utilizados para o tratamento de doenças humanas. Além disso, nosso conhecimento do controle transcricional é incompleto. Estes campos estão sob intensa investigação; os métodos de transferência gênica *ex vivo* e *in vivo* estão em franco desenvolvimento e esperam-se avanços consideráveis na próxima década.

O desenvolvimento de sistemas altamente eficientes de empacotamento viral e o refinamento dos processos de purifica-

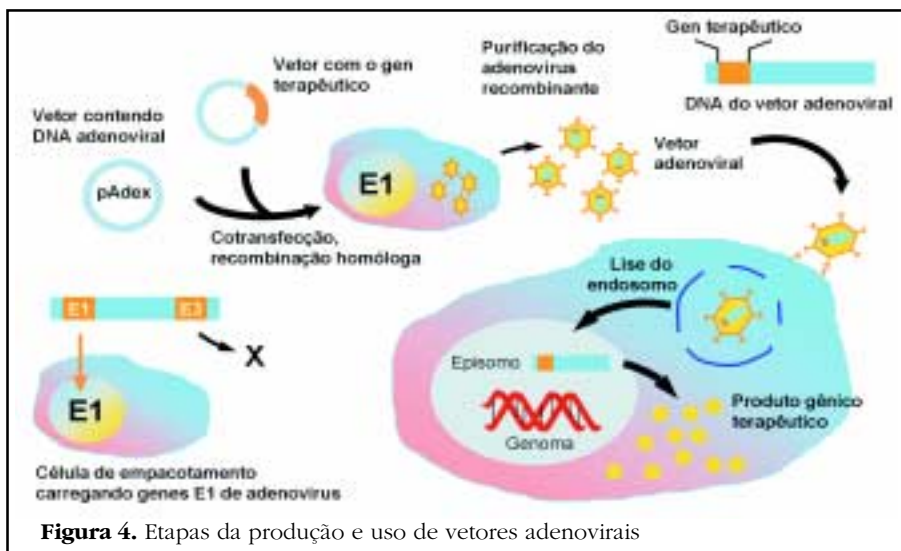


Figura 4. Etapas da produção e uso de vetores adenovirais

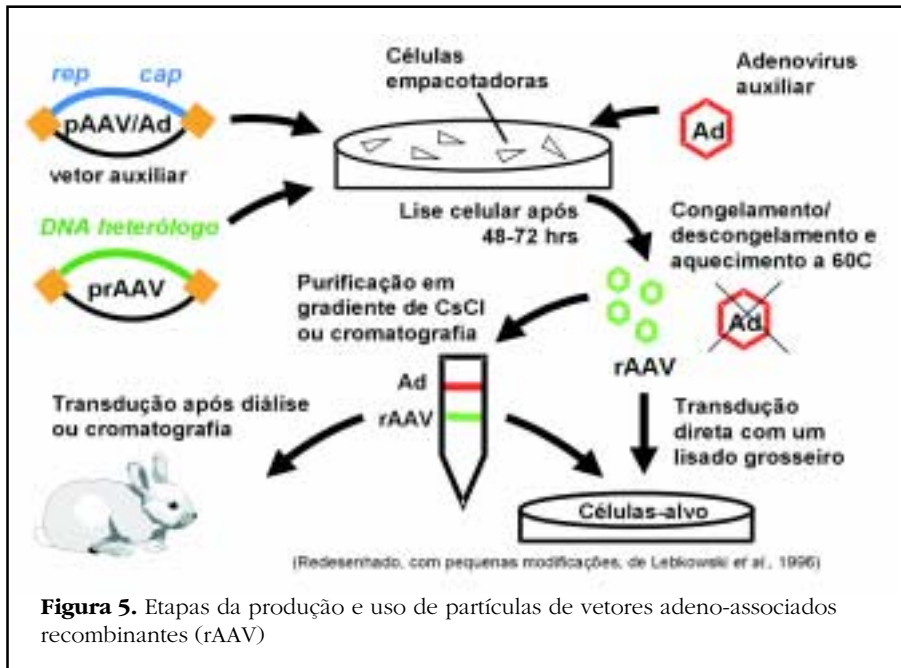


Figura 5. Etapas da produção e uso de partículas de vetores adeno-associados recombinantes (rAAV)

ção e concentração poderão melhorar os títulos dos vetores virais para valores que poderão permitir a transferência gênica pela administração sistêmica. O direcionamento da entrega poderá ser possível pela incorporação de anticorpos de cadeia única contra antígenos de superfície ou ligantes para receptores transmembrânicos incorporados ao envelope de retrovírus ou proteínas penton de adenovírus, e há sinais encorajadores de que essa estratégia possa alcançar sucesso. A médio prazo, espera-se a chegada de “vetores de desenho” incorporando os elementos mais úteis dos sistemas virais e sintéticos disponíveis atualmente, com variações dependendo da aplicação. Por exemplo, as repetições terminais invertidas (ITR) dos vírus adeno-associados, que promovem integração cromossomal estável, podem ser combinadas com seqüências de outros vetores com maior capacidade de acomodação de insertos. A integração pode ser aumentada através do empacotamento de uma enzima

recombinase funcional com a construção de expressão gênica em complexos lipossomais direcionados a uma célula específica com anticorpos ou proteínas ligantes de receptores. A longo prazo, novos métodos de entrega poderão ser desenvolvidos para a transferência intranuclear de cromossomos artificiais humanos (HACs) carregando grupos inteiros de genes com seus elementos naturais de controle. No futuro, a pesquisa básica deverá tentar definir os elementos genômicos que tornam possível o controle temporal e espacial da expressão gênica durante a vida de um indivíduo. Avanços nessas áreas irão requerer desenvolvimentos paralelos no desenho de vetores, antes que os conhecimentos possam ser utilizados na prática clínica.

Da grande quantidade e criatividade dos sistemas de vetores e métodos de transfecção gênica que estão sendo desenvolvidos, parece claro que, no futuro, haverá uma grande escolha de métodos diferen-

tes para as diferentes aplicações clínicas. Isso certamente ampliará as oportunidades para o uso da transferência gênica no contexto clínico. A terapia gênica promete ser uma área fértil de pesquisa científica e clínica por muitos anos, e não há dúvida que se tornará uma prática clínica importante neste novo século. A terapia gênica poderá representar uma mudança de paradigma da medicina, com importantes repercussões para a sociedade.

Leituras recomendadas

Balagué C, Kalla M, Zhang W-W. 1997. Adeno-associated virus rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J. Virology* 71:3299-3306.

Dani, S.U. 1998. Terapia Gênica. Capítulo 90, in Dani, R. *Gastroenterologia Essencial*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Dani SU. 1999. Terapia Gênica: O Objetivo Final. Cap. 14 in Rossi, BM, Pinho, M. *Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião*. São Paulo, Editora Lemar, pp. 261-289.

Dani SU. 1999. The challenge of vector development in gene therapy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32:133-145.

Dani SU, Uetsuki T, Nishimura I, Saito I, Yoshikawa K. 1998. Improved adenovirus-mediated gene transfer to neurons in the brain: Effect of intraparenchymal injection of hypertonic mannitol and concentration of the vector particles in the infusate. *Virus Reviews and Research* 3(1-2):41-49.

Darquet A-M, et al. 1997. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Therapy* 4:1341-1349.

Hartikka, J., et al. 1996. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 7:1205-1217

Lebkowski JS, et al. 1988. Adeno-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol Cell Biol* 8(10):3988-96

Lebkowski JS, Okarma TB, Philip R. 1996. The challenges of recombinant adeno-associated virus manufacturing: alternative use of adeno-associated virus plasmid/liposome complexes for gene therapy applications. *Curr Top Microbiol Immunol* 218:51-9

Philip, R., et al. 1994. Efficient and sustained gene expression in primary T lymphocytes and primary and cultured tumor cells mediated by adeno-associated virus plasmids DNA complexed to cationic liposomes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2411-2418.

Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y., Debs, R. 1993. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261, 209-211.