

## Terapia gênica

### Gene therapy

Nance Beyer Nardi <sup>1</sup>  
Leonardo Augusto Karam Teixeira <sup>2</sup>  
Eduardo Filipe Ávila da Silva <sup>1</sup>

**Abstract** *Gene therapy is a medical intervention that involves modifying the genetic material of living cells to fight disease. Genes influence virtually every human disease, either by encoding for abnormal proteins, which are directly responsible for the disease, or by causing a susceptibility to environmental agents which induce it. Gene therapy is still experimental, and is being studied in clinical trials for many different types of diseases. The development of safe and effective methods of implanting normal genes into the human cell is one of the most important technical issues in gene therapy. Although much effort has been directed in the last decade toward improvement of protocols in human gene therapy, and in spite of many considerable achievements in basic research, the therapeutic applications of gene transfer technology still remain mostly theoretical. The potential for gene therapy is huge and likely to impact on all aspects of medicine.*

**Key words** *Viral and nonviral vectors, Gene therapy protocols, Gene transfer*

**Resumo** *Terapia gênica é um procedimento médico que envolve a modificação genética de células como forma de tratar doenças. Os genes influenciam praticamente todas as doenças humanas, seja pela codificação de proteínas anormais diretamente responsáveis pela doença, seja por determinar suscetibilidade a agentes ambientais que a induzem. A terapia gênica é ainda experimental, e está sendo estudada em protocolos clínicos para diferentes tipos de doenças. O desenvolvimento de métodos seguros e eficientes de transferência gênica para células humanas é um dos pontos mais importantes na terapia gênica. Apesar do grande esforço dirigido na última década para o aperfeiçoamento dos protocolos de terapia gênica humana, e dos avanços importantes na pesquisa básica, as aplicações terapêuticas da tecnologia de transferência gênica continuam ainda em grande parte teóricas. O potencial da terapia gênica é muito grande, devendo ainda causar grande impacto em todos os aspectos da medicina.*

**Palavras-chave** *Vetores virais e não-virais, Protocolos de terapia gênica, Transferência gênica*

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves 9.500. Caixa Postal 1.5053 91501-970 Porto Alegre RS. nardi@vortex.ufrgs.br

<sup>2</sup> Pesquisa Básica, Divisão de Medicina Experimental, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro.

A possibilidade de descrição genética do homem representa talvez o último nível de uma busca de autoconhecimento que teve início há milênios. A primeira etapa é representada pelos grandes filósofos da Antigüidade, que buscavam identificar a relação do homem com o universo. O segundo e terceiro grandes passos foram dados no século passado, quando Charles Darwin colocou o ser humano em perspectiva na escala evolutiva e Sigmund Freud revelou seu interior psíquico. Nos últimos cem anos, órgãos, tecidos, células e seus componentes foram revelados com um grande nível de detalhamento. Quarenta anos após a descoberta da estrutura do DNA por James Watson e Francis Crick, concluímos a primeira etapa do conhecimento humano ao nível molecular, que permite a identificação genética única de cada indivíduo.

O conhecimento dos genes responsáveis por características normais ou patológicas permite a plena aplicação dos princípios da medicina genômica, que deverá modificar os procedimentos médicos no diagnóstico e tratamento de várias doenças e onde se inclui a terapia gênica. Os princípios desta nova metodologia envolvem a introdução, no paciente portador de doenças genéticas ou outras, de genes responsáveis por proteínas que poderão ser benéficas. Em doenças causadas por mutações gênicas, a introdução de um gene normal poderá reverter o quadro clínico; em uma ampla gama de outros tipos de doenças, células geneticamente modificadas poderão ativar mecanismos de defesa naturais do organismo (como o sistema imune) ou produzir moléculas de interesse terapêutico.

A terapia gênica idealmente visaria substituir um gene defeituoso por um gene normal. A remoção de um gene do organismo é, entretanto, algo muito difícil de ser realizado, e desnecessário na maioria das vezes. Assim, os procedimentos envolvem, em geral, a introdução do gene de interesse, que deve ser completamente conhecido.

O gene de interesse (também chamado de transgene) é transportado por um vetor e está contido em uma molécula de DNA ou RNA que carrega ainda outros elementos genéticos importantes para sua manutenção e expressão. As formas de transferência deste vetor contendo o gene são muito variadas. Em primeiro lugar, é importante definir se é mais apropriado introduzir o gene diretamente no organismo (*in vivo*) ou se, alternativamente, células serão

retiradas do indivíduo, modificadas e depois reintroduzidas (*ex vivo*). Conforme detalhado a seguir, algumas das formas de transferência utilizam vírus, dos quais os principais são os retrovírus, os adenovírus e os vírus adeno-associados. Outras formas de transferência incluem a injeção direta do gene no organismo, bem como métodos utilizando princípios físicos (biolística, eletroporação) ou químicos (lipofecção). A avaliação do sucesso do procedimento envolve a análise da manutenção de expressão do gene nas células transformadas e a correção da doença.

Um dos tipos celulares mais visados pela terapia gênica são as células chamadas tronco do organismo. Estas células são mantidas durante toda a vida do indivíduo, e apresentam a propriedade de poder originar múltiplas linhagens de células maduras. As células-tronco hematopoiéticas, por exemplo, originam todas as células do sangue, de modo que a introdução nelas de um gene terapêutico garante que muitos tipos celulares diferentes expressem este gene e produzam a proteína de interesse. Outra abordagem da terapia gênica, bem como de outras formas de manipulação genética, pode envolver células-tronco embrionárias. Estas células apresentam maior potencial que as células-tronco do adulto, já que delas se originam não apenas alguns, mas sim **todos** os tipos de células que compõem o organismo. Além disso, as células-tronco do adulto são muitas vezes difíceis de serem localizadas *in vivo* e manipuladas *in vitro*, o que não acontece com as embrionárias. A utilização de células-tronco embrionárias, entretanto, depende da destruição de um embrião, em uma fase extremamente precoce de desenvolvimento (poucos dias). As questões éticas, que se impõem imperativamente frente às inúmeras possibilidades de utilização destas informações, são especialmente pertinentes ao se tratar das células-tronco embrionárias.

### Vetores de transferência gênica

Apesar do acúmulo de conhecimento sobre a constituição genética do homem e as metodologias para a manipulação genética, a aplicação da terapia gênica como uma rotina clínica tem esbarrado em diversos problemas de ordem técnica. Assim, é importante que mais esforços sejam aplicados na pesquisa e desenvolvimento de novos procedimentos, bem como no aprimoramento dos métodos disponíveis até o mo-

mento. Nesta seção discutiremos um dos elementos mais importantes no estabelecimento de um protocolo de terapia gênica, que é a utilização de vetores visando à efetiva correção de patologias com base molecular.

Transferência gênica é um termo que inclui todos os procedimentos que visam à entrada de algum material genético (na forma de DNA, RNA ou oligonucleotídeos) em células-alvo. Os agentes utilizados para esta entrada são conhecidos como vetores, palavra que vem do latim *vector* – significando “aquele que entrega”. O vetor ideal possui algumas características altamente desejáveis, entre as quais podemos destacar as seguintes: capacidade de acomodação de um transgene de tamanho ilimitado, baixa imunogenicidade e citotoxicidade, expressão estável do transgene, direcionamento para tipos específicos de células ou tecidos, baixo custo, fácil produção e manipulação e ainda possibilidade de regular a expressão do gene exógeno no tempo e/ou na quantidade. Até o presente momento, este vetor não pode ainda ser obtido. No entanto, entre as alternativas disponíveis, podemos sempre escolher aquele que melhor se adapte às características terapêuticas desejadas no tratamento.

O material genético a ser utilizado em experimentos de transferência gênica é mais comumente encontrado em duas formas: na forma plasmidial, onde um gene de interesse é inserido em um plasmídio de expressão eucariota, promovendo assim a síntese da proteína desejada nas células ou tecidos alvos, ou na forma viral, onde o transgene substitui regiões gênicas de certos vírus. Estas sequências virais são quase sempre as responsáveis pela patogenicidade nos hospedeiros. Assim, nestes vetores virais, o vírus ao ser modificado é atenuado e incapaz de causar qualquer quadro patológico. O material genético a ser introduzido também pode ser encontrado em algumas outras formas, como uma sequência de DNA linearizada (pouco útil pela baixa estabilidade na célula, já que este tipo de material é facilmente degradado por nucleases citoplasmáticas) ou um oligonucleotídeo. Além deste, DNA mitocondrial ou mesmo cromossomos artificiais (Harrington *et al.*, 1997) já foram estudados. Tais formas são ainda pouco empregadas, mas possuem um potencial de aplicação no futuro.

Os métodos de transferência gênica são geralmente divididos em três categorias: métodos físicos (o transgene é introduzido de maneira mecânica na células), métodos químicos (o ve-

tor é alguma substância de origem química) e métodos biológicos (emprego de organismos que naturalmente possuem a capacidade de transferir material genético, como os vírus ou algumas bactérias). A escolha do método a ser empregado é feita de acordo com a patologia, a célula ou tecido-alvo, o tamanho e tipo de transgene a ser expresso e o tempo e quantidade de expressão que se deseja obter, entre outros fatores. Atualmente, os métodos virais são os mais amplamente utilizados, mas as demais abordagens também possuem aplicações significativas.

Os métodos físicos são utilizados para introdução principalmente de plasmídios em células, já que o DNA transferido por esses métodos encontra-se preferencialmente nesta forma (Dani, 1999). Um dos métodos mais antigos, e com menor utilização prática até hoje, é o da microinjeção. Este sistema consiste na introdução de uma pequena quantidade de DNA diretamente no núcleo da célula-alvo com o auxílio de um aparelho denominado micromanipulador. Apesar de algumas vantagens, como a pequena quantidade de DNA necessário, este método não alcançou sucesso porque o número de células que pode ser transformado é geralmente muito baixo. Além disso, a operação de um micromanipulador é muito delicada e requer pessoal treinado e especializado. Em alguns tecidos, a injeção direta de DNA na forma plasmidial (método conhecido com injeção de DNA nu) com o auxílio de uma seringa mostrou algum sucesso na transferência gênica para um número limitado de células. As vantagens deste sistema são a facilidade de aplicação e a simplicidade, embora um número muito pequeno de células (geralmente restritas ao local de aplicação da injeção) seja transformada (Kalil *et al.*, 2001). Além disso, a aplicação está restrita a tecidos com um nível baixo de endonuclease (como músculo e cérebro). Um outro método físico bastante conhecido é a eletroporação. Neste sistema, pulsos elétricos alternados são aplicados a células que estão em contato com uma solução de DNA plasmidial. A corrente gerada é capaz de formar poros na superfície celular, facilitando a entrada do material genético nas células. Este método foi recentemente adaptado para utilização *in vivo*, aumentando a eficiência da injeção de DNA nu. Entretanto, a introdução de plasmídios *in vivo* geralmente acarreta uma elevada resposta imune contra o transgene, bem como contra toda a molécula de DNA. Por isto, estes sistemas vêm sendo muito utilizados atualmente para o de-

envolvimento de vacinas de DNA. Um outro método físico de grande importância é a biolística ou *gene gun* (do inglês, arma genética), onde microesferas de ouro ou tungstênio cobertas com DNA são aceleradas por um gás carreador, que projeta estas esferas contra células, promovendo a entrada deste DNA no núcleo das células bombardeadas. Este sistema é bastante eficiente, apesar de causar uma morte celular elevada, e vem sendo adaptado para utilização *in vivo* nas vacinas de DNA.

Os métodos químicos utilizam características do DNA e das membranas celulares para, utilizando compostos químicos, garantir a entrada de material genético nas células. Em geral, os compostos utilizados são catiônicos, ou seja, possuem carga total positiva. Assim, estes compostos interagem com as cargas negativas dos grupamentos fosfato do DNA e formam complexos. Tais complexos têm também uma carga geral positiva, eliminando a repulsão de cargas existente entre o DNA e os domínios extracelulares da maioria das proteínas de membrana, que também têm carga negativa. Assim, a entrada do complexo na célula por mecanismos celulares normais, como a endocitose, é facilitada. A co-precipitação de DNA com fosfato de cálcio foi um dos primeiros sistemas descritos, e apresenta algumas vantagens pela segurança, simplicidade e custo. No entanto, a eficiência e reprodutibilidade deste método são muito baixas. Apesar disso, procedimentos de transferência gênica com fosfato de cálcio são importantes até hoje, sendo bastante utilizadas na produção de vetores virais. Alguns dos protocolos mais modernos de transferência gênica incluem a utilização de compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica (Brown *et al.*, 2001). Tais métodos apresentam eficiências variáveis, mas que podem ser bastante elevadas (Teixeira *et al.*, 2001), além de facilitar o escape do material nucléico da ação das enzimas degradativas lisossomais. A expressão na maioria dos casos é transiente, mas alguns plasmídeos já foram desenvolvidos e mostraram uma expressão estável. Entre as vantagens da utilização de lipossomos e proteínas podemos citar a simplicidade, baixa imunogenicidade e, em certos casos (dependendo da composição do complexo), capacidade de direcionamento destes vetores para células específicas. No entanto, a utilização *in vivo* ainda é limitada pela especificidade reduzida e pela opsonização dos complexos por proteínas plasmáticas, que diminuem muito a eficiência da transfecção.

De todos os sistemas de transferência gênica, os virais são os atualmente mais utilizados nos estudos para desenvolvimento de protocolos de terapia gênica, devido principalmente à alta eficiência de transdução obtida com estes vetores. Todos os sistemas virais utilizados trabalham com vírus deficientes em replicação, que são capazes de transferir seu material genético para células-alvo mas não conseguem replicar-se e continuar seu ciclo infeccioso (Romano *et al.*, 2000). Esta incapacidade de replicação é obtida através da deleção de genes virais indispensáveis para a proliferação viral e com substituição destes por genes de interesse terapêutico. Os genes que apresentam alguma função importante no desenvolvimento da patologia também são deletados. Assim, as questões referentes à segurança de vetores virais podem ser administradas de maneira a diminuir os riscos destes vetores. Inúmeras famílias de vírus já foram utilizadas como vetores de transferência gênica, mas grande ênfase vem sendo dada principalmente a quatro famílias: os adenovírus, retrovírus (incluindo os lentivírus), vírus adeno-associado e, mais recentemente, os herpesvírus.

Os adenovírus são bastante utilizados principalmente devido à pouca patogenicidade e ao tropismo amplo por células humanas. No entanto, a grande imunogenicidade e a expressão gênica transiente relacionadas a estes vetores limitam suas aplicações. Atualmente, os adenovírus têm uma aplicação importante na transferência de genes suicidas a tumores. Os retrovírus são outro grupo de importância bastante acentuada em estudos de terapia gênica. Sua propriedade de integração ao genoma hospedeiro acentua a possibilidade de garantir uma expressão estável do transgene. O procedimento de terapia gênica em seres humanos cujos resultados foram mais satisfatórios, até o presente momento, foi realizado utilizando vetores virais pertencentes a esta família (Vírus da Leucemia Murina de Moloney) (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Nos últimos anos, o gênero lentivírus desta família tem recebido muita atenção, principalmente pela capacidade de infectar também células quiescentes. A produção de retrovírus recombinantes onde ocorre a substituição das proteínas de envelope do vírus original possibilitou a ampliação do tropismo celular destes vetores. No entanto, questões de segurança ainda são importantes na manipulação de vetores virais baseados em vírus como o HIV. Assim, os lentivírus de mamíferos não pri-

matas (como o Vírus da Imunodeficiência Felina – FIV) têm tido uma importância cada vez maior, e são uma das alternativas mais interessantes no desenvolvimento de novos vetores. Ainda assim, problemas como a mutagênese insercional (causada pela integração aleatória dos retrovírus no genoma hospedeiro) e o silenciamento da expressão do transgene são questões que merecem um estudo mais aprofundado.

Os vírus adeno-associados (família Parvoviridae) possuem algumas vantagens em relação aos demais sistemas virais, como integração sítio-específica, tropismo ampliado e ausência de patogenicidade. No entanto, a limitação do tamanho do transgene carreado, a necessidade de vírus auxiliares para a produção destes vetores e, em certos casos, a perda da capacidade de integração sítio-dirigida têm limitado a utilização destes vetores. Por último, devemos destacar a importância dos vetores baseados em herpesvírus, que vêm ganhando um destaque grande pelo seu tropismo bastante elevado por células nervosas. Assim, acredita-se que a utilização destes vírus para procedimentos de transferência gênica em células do sistema nervoso seja uma alternativa bastante viável no futuro.

### Os principais alvos da terapia gênica

Tanto doenças hereditárias como adquiridas têm sido alvos constantes de estratégias de terapia gênica. O tratamento de doenças humanas através da transferência de genes foi originalmente direcionado para doenças hereditárias, causadas normalmente por defeitos em um único gene, como a fibrose cística, as hemofilias, hemoglobinopatias e distrofias mus-

culares. Entretanto, a maioria dos experimentos clínicos de terapia gênica atualmente em curso está direcionada para o tratamento de doenças adquiridas como a Aids, doenças cardiovasculares e diversos tipos de câncer (de mama, de próstata, de ovário, de pulmão e leucemias). Isso se deve basicamente ao fato de as doenças adquiridas apresentarem uma alta incidência na população mundial quando comparada com as freqüências das doenças monogênicas. Dessa forma, ensaios clínicos bem-sucedidos para essas enfermidades poderiam trazer benefícios a um número muito maior de pacientes. Mais da metade dos protocolos clínicos de terapia gênica hoje em curso apontam para o tratamento de algum tipo de câncer como doença-alvo. Em segundo lugar, aparecem as doenças monogênicas, correspondendo a 12% dos protocolos clínicos aprovados, seguidas, em um grande crescente, pelas doenças infecciosas, contribuindo com 6% dos protocolos, basicamente voltados para o combate da Aids. Esses três grandes grupos englobam quase 90% de todos os pacientes que estão sob algum tipo de tratamento através da terapia gênica ao redor do mundo (Tabela 1) (Dani, 2000; *The Journal of Gene Medicine Website*).

Como toda nova proposta de tratamento, a terapia gênica deve ser testada em protocolos pré-clínicos – estudos *in vitro*, com células em cultura, seguidos por experimentação em modelos animais – e em protocolos clínicos, que se desenvolvem em uma série de etapas ou fases. Na fase I, os estudos envolvem um pequeno número de pacientes e avaliam sua reação a diferentes formas de administração do tratamento (via, dose, freqüência), principalmente com relação a aspectos de segurança. Os proto-

**Tabela 1**

Número de protocolos clínicos em curso e número de pacientes em tratamento por grupo de doenças-alvo para a terapia gênica.

Doença-alvo	Número de protocolos	Porcentagem (%)	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Câncer	376	63.1	2.389	69.0
Doenças monogênicas	75	12.6	309	8.9
Doenças infecciosas	38	6.4	408	11.8
Doenças vasculares	46	7.7	59	1.7
Outras doenças	11	1.8	19	0.5
Uso de genes marcadores	48	8.1	274	7.9
Voluntários saudáveis	2	0.3	6	0.2
<b>Total</b>	<b>596</b>	<b>100</b>	<b>3.464</b>	<b>100</b>

Fonte: *The Journal of Gene Medicine Website*, setembro 2001.

colos de fase II envolvem um número de pacientes um pouco maior (cerca de 20 a 50) e, além de continuar a análise de aspectos de segurança, iniciam a avaliação da eficiência do tratamento. Tendo sido aprovado nesta fase, tem início a fase III do protocolo, que atinge um número bem maior de pacientes (podendo chegar a milhares) e compara, empregando métodos estatísticos adequados, a nova proposta em estudo com um tratamento padrão, já bem estabelecido. E assim, um protocolo clínico pode alcançar a quarta e última fase onde a terapia a ser disponibilizada passa a ser produzida em larga escala com o objetivo de comercialização e entrada no mercado consumidor.

O primeiro protocolo a alcançar a terceira fase de ensaio clínico visa ao tratamento de um tumor cerebral maligno, o glioblastoma. Nesse procedimento, células de camundongos modificadas *in vitro* para produzir partículas retrovirais específicas são injetadas diretamente no local exato do tumor no cérebro do paciente. Os retrovírus produzidos por essas células transduzem somente células em divisão, e, portanto, atingem diretamente as células tumorais e as células vasculares que irrigam essa região. Uma vez dentro das células em divisão, os retrovírus codificam um gene específico (HSTk, gene da timidina quinase do vírus herpes simplex) que irá afetar e bloquear a síntese de DNA nessas células, levando-as a morte. Outra abordagem interessante no tratamento do câncer é o uso de vetores de transferência gênica como vacinas tumorais. Alguns protocolos clínicos para melanomas malignos e carcinomas de cabeça e pescoço baseiam-se na injeção de determinados vetores na massa tumoral, capazes de expressar antígenos específicos de leucócitos humanos (HLA, *human leukocyte antigen*). Esses antígenos rotulam as células tumorais como estranhas ao ambiente do organismo em questão e permitem o recrutamento de células do sistema imunológico do próprio indivíduo para combater o câncer. As abordagens para o tratamento da Aids através da terapia gênica também têm se aproveitado do modelo de vetores vacinais, onde retrovírus que codificam para segmentos gênicos do HIV são injetados, em via intramuscular, induzindo um aumento na resposta imunológica de linfócitos T citotóxicos contra o vírus. Outros protocolos que também têm avançado com um sucesso considerável são direcionados para o tratamento das doenças monogênicas, como 1) a deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA) que oca-

siona um comprometimento severo do sistema imunológico do indivíduo; 2) a fibrose cística que é a doença hereditária letal mais comum nos Estados Unidos e; 3) as hemofilias A e B que ocupam uma posição de destaque no cenário mundial de doenças hereditárias e apresentam uma série de vantagens como modelo de estudo para a terapia gênica (Anderson, 1998).

Em 1994, 50 protocolos de terapia gênica já tinham sido aprovados e eram administrados a 200 pacientes. Hoje, sete anos mais tarde, perto de 600 ensaios clínicos estão em curso e disponíveis a aproximadamente 3.500 pacientes. Os Estados Unidos e a Inglaterra juntos respondem por mais de 85% dos protocolos e somente 5% de todos os protocolos aprovados são realizados fora dos Estados Unidos ou da Europa. O Brasil não apresenta qualquer protocolo clínico em curso aprovado no campo da terapia gênica até o presente momento. O papel nacional no âmbito mundial da transferência gênica ainda é bastante incipiente, porém promissor. Estudos pré-clínicos *in vitro* já estão sendo desenvolvidos nas principais universidades e centros de pesquisa do país, basicamente em São Paulo, no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul, com amplas perspectivas de expansão para modelos *in vivo* e talvez, futuramente, para a proposta de protocolos clínicos. Ainda na América do Sul, o Chile e principalmente a Argentina têm desenvolvido estudos pré-clínicos consistentes e avançando para modelos animais com resultados extremamente promissores na terapia contra o câncer através da vacinação. Fora do eixo América do Norte e Europa, países como Japão, Austrália e Israel também têm contribuído significativamente na área da terapia gênica para algumas doenças (OBA, Office of Biotechnology Activities).

Passados mais de dez anos desde a realização do primeiro protocolo clínico, em maio de 1990, no National Institutes of Health (NIH, Bethesda, EUA), o panorama das fases dos protocolos clínicos aprovados em curso é bastante desfavorável. Menos de 1% dos protocolos clínicos (apenas quatro até o momento) avançaram pelas fases I e II que testam a segurança e a eficácia do método, respectivamente (Tabela 2). Além disso, não existe um único procedimento que tenha obtido êxito considerável, atingindo a fase IV e que esteja consequentemente na iminência de alcançar o mercado para comercialização. Alguns dos pontos críticos que têm dificultado o avanço da terapia gênica são discutidos no tópico seguinte.

**Tabela 2**

Número de protocolos clínicos em curso e número de pacientes em tratamento por fase de andamento dos ensaios.

Fase do protocolo clínico	Número de protocolos	Porcentagem (%)	Número de pacientes	Porcentagem (%)
Fase I	395	66.3	1.802	52.0
Fase I/II	125	21.0	904	26.1
Fase II	68	11.4	507	14.6
Fase II/III	4	0.7	–	–
Fase III	4	0.7	251	7.2
<b>Total</b>	<b>596</b>	<b>100</b>	<b>3.464</b>	<b>100</b>

Fonte: *The Journal of Gene Medicine Website*, setembro 2001.

### Problemas, perspectivas e o futuro da terapia gênica

Apesar dos diversos protocolos clínicos aprovados para a transferência de genes em humanos, os benefícios reais alcançados até o momento com a terapia gênica são frustrantes e estão muito aquém das propostas iniciais. Muitas barreiras ainda necessitam ser transpostas para que sejam alcançados resultados satisfatórios. Os métodos de transferência gênica disponíveis, ainda que variados, são pouco eficientes e apresentam sérias limitações quanto ao direcionamento celular. O desenvolvimento de sistemas de transferência gênica híbridos que somem vantagens de vetores virais e não-virais pode proporcionar uma melhora na eficiência de transfecção e na manutenção a longo prazo da expressão do gene de interesse *in vivo*. Além disso, a utilização de vetores virais em ensaios clínicos em humanos levanta questões sobre a segurança do método em relação a mutagênese insercional e o alto potencial imunogênico desses vírus. A baixa expressão e a ausência de mecanismos precisos de regulação do gene de interesse na célula-alvo dificultam ainda mais o avanço da terapia gênica como ferramenta terapêutica. O estudo dos mecanismos relacionados à regulação da expressão gênica pode permitir uma modulação mais refinada das regiões promotoras e a consequente ativação/repressão do gene de interesse *in vivo*. Outro ponto importante e que também requer maior atenção se refere à biologia da célula-alvo. Uma melhor caracterização e o desenvolvimento de técnicas para a identificação e o isolamento dessas células poderá facilitar o direcionamento dos vetores e aumentar a eficiência de transfecção (Verma & Somia, 1997).

Além disso, a exemplo do que ocorre com toda nova tecnologia, a terapia gênica também tem levantado diversas discussões nos planos éticos e filosóficos que permanecem em debate. Existem hoje grandes discussões acerca das propostas para a aprovação dos primeiros ensaios clínicos de terapia gênica a serem realizados durante a vida intra-uterina ou ainda em células germinativas como forma de tratamento para doenças hereditárias. Muitos esforços no campo da pesquisa básica ainda são necessários para que a terapia gênica possa realmente proporcionar uma melhora significativa e sem riscos aos pacientes e, além disso, representar uma prática rotineira bem-sucedida no futuro. Infelizmente, os conceitos e as idéias em torno da terapia gênica estão, hoje, muito mais avançados do que as metodologias necessárias para satisfazer seus objetivos (Zanjani & Anderson, 1999).

Interações entre áreas multidisciplinares como a biologia molecular, biologia celular, imunologia, fisiologia e genética clínica serão de extrema importância para uma melhor compreensão dos processos relacionados à terapia gênica. O aprendizado nesses mais de dez anos de estudo em todas essas áreas foram imprescindíveis para a reformulação das perguntas e o redirecionamento dos objetivos a serem alcançados com a terapia gênica. Apesar das atuais dificuldades e da falta de conhecimento em diversos tópicos, a continuidade da prática da terapia gênica irá certamente revolucionar a prevenção e o tratamento de diversas doenças que hoje assolam a humanidade.

O conhecimento científico deve ser acompanhado pela sabedoria, o que não tem sido habitual na história da humanidade. Grandes empresas têm desenvolvido e tomado posse dessas descobertas, e seu emprego em ativida-

des economicamente importantes pode não acompanhar o interesse da sociedade como um todo. Estes assuntos devem ser discutidos amplamente, de modo a permitir um maior nível de consciência da população em geral. Nos países mais desenvolvidos, onde a comunidade acompanha melhor o progresso científico, tem sido observada uma divisão muito grande com relação às opiniões sobre a terapia gênica. Os opositores temem, por um lado, as conseqüências de um processo novo e pouco previsível, e por outro sua utilização em uma nova onda de eugenia, colocando freqüentemente a questão “estamos brincando de ser Deus?”. A corrente a favor da experimentação genética argumenta

que esta questão deveria ser igualmente aplicada à utilização de medicamentos e outros procedimentos clínicos que alteram o curso normal de qualquer doença, e que o já extenso desenvolvimento destas pesquisas e seu grande potencial para a cura de doenças que afetam grande parte da humanidade continuam justificando o investimento. A grande questão seria: existem limites para a experimentação científica? Finalmente, deve ser lembrado que qualquer mal que possa resultar da pesquisa para a espécie humana não será causado por qualquer descoberta, mas sim da utilização que o homem fizer dela.

## Referências bibliográficas

- Anderson WF 1998. Human gene therapy. *Nature* 392 (6679 Suppl):25-30.
- Brown MD, Schatzlein AG & Uchegbu IF 2001. Gene delivery with synthetic (non-viral) carriers. *International Journal of Pharmaceutics* 229:1-21.
- Cavazzana-Calvo M *et al.* 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288(5466):669-672.
- Dani SU 1999. The challenge of vector development in gene therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:133-145.
- Dani SU 2000. Terapia gênica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 12: 28-33.
- Harrington JJ, Van Bokkelen G, Mays RW, Gustashaw K & Willard HF 1997. Formation of *de novo* centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nature Genetics* 15(4):345-355.
- Kalil RAK *et al.* 2001. Modelo experimental de transfeção gênica em miocárdio normal de cães: perspectivas de terapia gênica para o tratamento da cardiopatia isquêmica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* (no prelo).
- OBA. Office of Biotechnology Activities. Recombinant DNA Advisory Committee (RAC). National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. <http://www.nih.gov/od/oba/>
- Romano G, Michell P, Pacilio C & Giordano A 2000. Latest development in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 18:19-39.
- Teixeira LA, Fricke CH, Bonorino CB, Bogo MR & Nardi NB 2001. An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *Journal of Biotechnology* 88(2):159-165.
- The Journal of Gene Medicine Website. Gene Therapy Clinical Trials. Wiley InterScience, John Wiley & Sons Ltd. <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- Verma IM & Somia N 1997. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-242.
- Zanjani ED & Anderson WF 1999. Prospects for *in utero* human gene therapy. *Science* 285:2.084-2.088.