

# Terapia gênica em genética molecular com diferentes vetores de clonagem

A terapia gênica é uma técnica para introduzir o material genético de um gene em um paciente que não possui esse gene por causa de uma mutação. Existem diferentes tipos de vírus usados como vetor para terapia gênica em humanos, incluindo Retrovírus, Adinovírus, Lentivírus, Poxvírus e Vírus Herpes. Tanto as células saudáveis quanto as cancerosas podem ser um alvo. Ex de direcionar células saudáveis. Uma maneira é substituir um gene ausente ou alterado por um "normal". Ex de direcionamento de células cancerosas. Os cientistas podem atingir as células cancerosas com genes que podem ser usados para destruir as células. Nesta técnica, as células cancerígenas são introduzidas nos chamados "genes suicidas". A terapia gênica em células germinativas tem o potencial de afetar não apenas o indivíduo, mas também seus filhos. Quaisquer alterações genéticas nas células reprodutivas ou alterações feitas no embrião antes do estágio de diferenciação afetariam todos os futuros descendentes dessa pessoa. Isso faz uma distinção vital, afetando grandes questões éticas. Terapia de linha germinativa (como espermatozoides, óvulos e seus precursores de células-tronco).



Ela é Ph.D. em Biotecnologia, com microbiologia, Engenharia Genética, Genética Molecular e Engenharia de Proteínas, pesquisadora, criadora, inventora e autora, professora da University College of Al-Turath University college, bacharelado em Microbiologia e mestrado em Biologia Molecular em Microbiologia pela Al-Mustan.



Nebras Rada Mohammed



EDIÇÕES  
NOSSO CONHECIMENTO



## Terapia gênica em genética molecular com diferentes vetores de clonagem

*Terapia gênica com aplicações médicas em humanos*

**Nebras Rada Mohammed**

**Nebras Rada Mohammed**

**Terapia gênica em genética molecular com diferentes vetores de  
clonagem**

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**Nebras Rada Mohammed**

# **Terapia gênica em genética molecular com diferentes vetores de clonagem**

**Terapia gênica com aplicações médicas em  
humanos**

FOR AUTHOR USE ONLY

**ScienciaScripts**

**Imprint**

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this work is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

This book is a translation from the original published under ISBN 978-620-5-50924-1.

Publisher:

Scientia Scripts

is a trademark of

Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L Publishing group

Str. Armeneasca 28/1, office 1, Chisinau-2012, Republic of Moldova, Europe

Printed at: see last page

**ISBN: 978-620-5-34645-7**

Copyright © Nebras Rada Mohammed

Copyright © 2022 Dodo Books Indian Ocean Ltd. and OmniScriptum S.R.L  
Publishing group

FOR AUTHOR USE ONLY

**Terapia Genética em Genética Molecular  
com Diferentes Vectores de Clonagem em  
Humanos com Doenças Crónicas e  
Cancro**

**Subtítulo**

**Terapia Genética com Aplicações  
Médicas em Humanos**

**Por**

**Nebras Rada Mohammed**

**Universidade de Al-Turath**

**Departamento de Engenharia Biomédica**

**Iraque**

## Índice

Capítulo 1	8
Capítulo 2	14
Capítulo 3	32
Capítulo 4	57
Capítulo 5	84
Capítulo 6	90
Capítulo 7	127

FOR AUTHOR USE ONLY

## Sobre o Autor



### **Nebras Rada Mohammed**

Ela é doutorada. em Biotecnologia, com um mestrado em Microbiologia, Engenharia Genética, Genética Molecular e Engenharia de Proteínas, uma investigadora, criadora, inventora e autora, uma professora no Colégio Universitário da Universidade de Al-Turath, uma licenciatura em Microbiologia e um mestrado em Biologia Molecular em Microbiologia da Universidade Al-Mustansiriya, uma árbitro, residente internacional e consultora Em laboratórios médicos, uma perita em laboratórios médicos e detentora do título de um projecto cientista, um árbitro, uma editora distinta, um apoiante de prata de plataformas científicas, um presidente de um comité numa sociedade científica, recebendo elogios da propriedade intelectual internacional, o Prémio da Melhor Mulher Árabe 2020, também o Prémio da Melhor Personalidade Comunitária, o Prémio da Melhor Investigação 2019, também o Prémio da Melhor Investigação 2020 e um

Prémio Americano pela invenção de 2020 pelo GUIA  
Americano Comissão Mundial de Investimento na América

FOR AUTHOR USE ONLY

## Prefácio

A terapia genética é uma técnica para introduzir o material genético de um gene num paciente que carece desse gene por causa de uma mutação.

Vectores, a forma como se insere o gene "normal" na célula do doente é por vectores. Existem diferentes tipos de vírus utilizados como vector para terapia genética em humanos, incluindo Retrovírus, Adinovírus, Lentivírus, Poxvírus e Vírus de Herpes.

Tanto as células saudáveis como as cancerosas podem ser um alvo. Ex de visar células saudáveis. Uma forma é substituir um gene em falta ou alterado por um gene "normal". Ex de visar as células cancerígenas. Os cientistas podem visar as células cancerosas com genes que podem ser utilizados para destruir as células. Nesta técnica, as células cancerígenas são introduzidas naquilo a que se chama "genes suicidas".

A terapia genética em células da linha germinal tem o potencial de afectar não só o indivíduo, mas também os seus filhos. Qualquer alteração genética nas células reprodutivas ou alterações feitas no embrião antes da fase de diferenciação, afectaria toda a descendência futura dessa

pessoa. Isto faz uma distinção vital, afectando as principais questões étnicas.

Terapia da linha germinal (tais como espermatozóides, óvulos, e os seus precursores de células estaminais. A engenharia da linha germinal nos seres humanos continua a ser apenas uma perspectiva altamente controversa. Para que o gene introduzido seja transmitido normalmente à descendência, é necessário não só que seja inserido na célula, mas também que seja incorporado nos cromossomas por recombinação genética.

Terapia genética do cancro utilizando genes supressores de tumores, terapia genética em combinação com terapia de radiação para que possam tratar o cancro do pulmão em 19 pacientes diferentes. Injecções de agulha Intratumoral de Ad-p53 nos dias 1, 18 e 32 do tratamento.

Técnicas de manipulação ex vivo transferidas para as células cultivadas em cultura, as células transformadas são seleccionadas, multiplicadas e depois introduzidas no doente. evita a rejeição do sistema imunitário os tecidos como as células hematopoiéticas e as células da pele que podem ser removidas do corpo.

### 1. Electroporação

2. Lipossomas
3. Fosfato de cálcio
4. Balas de ouro (disparadas dentro de uma arma pressurizada de hélio)
5. Retrotransposições (genes de salto - primeiros dias)
6. Cromossomas artificiais humanos.

FOR AUTHOR USE ONLY

## Capítulo 1

### Terapia Genética

A terapia genética é uma técnica para introduzir o material genético de um gene no paciente que sofre de defeito de gene porque ocorre mutação no gene.

A terapia genética é uma técnica para introduzir o material genético de um gene num paciente que não tem esse gene por causa de uma mutação

Vectores: A forma como se insere o gene "normal" na célula do doente é por vectores.

Os vectores mais comuns que são utilizados na terapia genética são os vectores de vírus

Porquê os vírus?

Os vírus ao longo do tempo da evolução evoluíram para infectar as células com grande especificidade. Os vírus tendem a ser muito eficientes na transfecção do seu próprio ADN para o genoma da célula hospedeira. Isto permite-lhes produzir novas partículas virais no período de síntese da célula.

## **Tipos de Vírus**

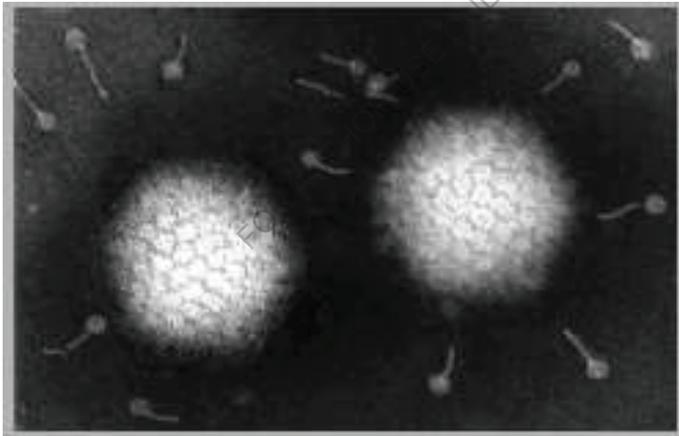
1-Retrovírus

2-Adinovírus

3-Lentivírus

4-Poxvírus

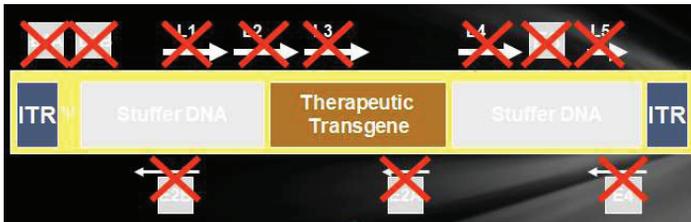
5- Vírus de Herpes



**Figura (1): Adenovírus**

**Adenovírus**

Genoma de ADN duplamente encajado, 36 kb. Entrada através de receptor CAR e co-receptor integrador. "Gutless"; Helper-dependent; Minimal Ad.

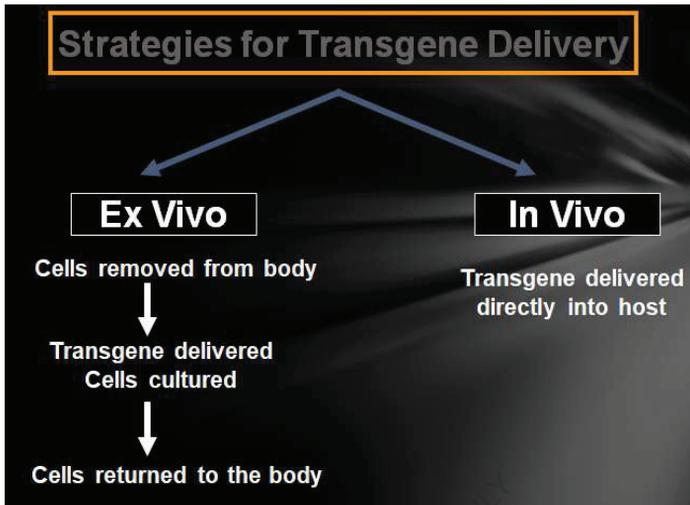


**Figura (2): Vector Adenoviral de última geração.**

### Que vírus utilizar?

Depende

- Quão bem transferem os genes para as células.
- Que células podem reconhecer e infectar.
- Quer alterem o ADN da célula de forma permanente ou temporária.



**Figura (3): Estratégias para a entrega de transgene.**

Que células são as células-alvo

Tanto as células saudáveis como as cancerosas podem ser um alvo

Ex de visar células saudáveis

- Uma maneira é substituir um gene em falta ou alterado por um gene "normal"

Ex de visar as células cancerígenas

- Os cientistas podem visar as células cancerosas com genes que podem ser utilizados para destruir as células. Nesta técnica, as células cancerígenas são introduzidas no que se chama "genes suicidas".

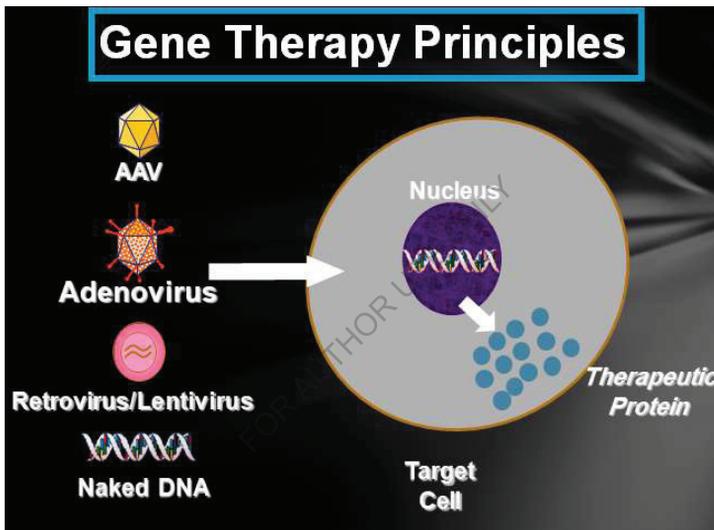
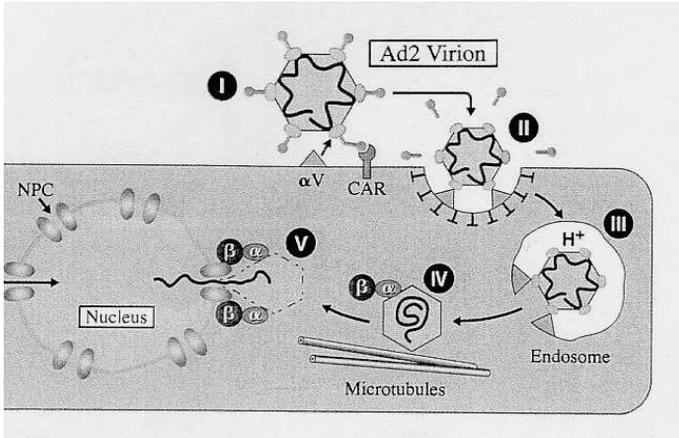


Figura (4): Princípios da Terapia Genética.



**Figura (5): Entrada de Célula Adenovirus.**

FOR AUTHOR USE ONLY

## Capítulo 2

### **Antigénios tumoral**

é uma substância antigénica produzida em células tumorais , desencadeia uma resposta imunitária no hospedeiro . Os antigénios tumorais são marcadores tumorais úteis na identificação de células tumorais com testes diagnósticos e são potenciais para utilização em terapia do cancro, para melhorar a resposta imunológica do hospedeiro contra os chamados antigénios tumorais, utilizando estratégias virais por transferência de antigénios tumorais para fornecer a informação genética completa de uma proteína.

### **Os antigénios tumoral dividem-se em duas categorias principais:**

A primeira categoria são aqueles codificados por genomas virais, estes são alvos atraentes para ataques imunoterapêuticos, as células capazes de responder a estes antigénios não deveriam ter sido removidas do repertório por mecanismos centrais de tolerância-indução, pelo que a interferência por outros factores (tais como tolerância

periférica ou mecanismos de fuga) é teoricamente mínima. O sucesso da terapia dirigida ao EBV em pacientes transplantados e ao HPV em pacientes com cancro do colo do útero sugere que, em circunstâncias ideais, este tipo de resposta pode de facto ser eficaz.

A segunda categoria de antigénios são antigénios próprios alterados por alterações genéticas e tornados mais visíveis por sobreexpressão se os tumores acumularem mutações múltiplas durante o processo de transformação maligna e fornecerem alvos de tratamento. Tem sido observada actividade clínica com vectores poxvirais portadores de MUC1.

### **Classificação dos antigénios tumorais**

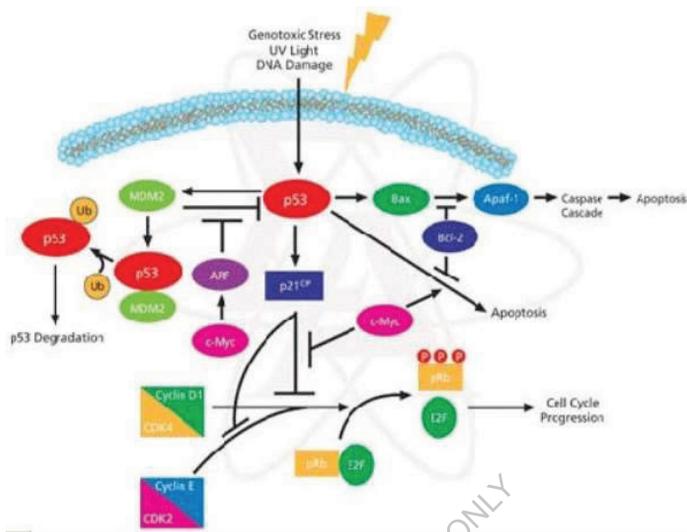
Inicialmente, os antigénios tumorais eram amplamente classificados em duas categorias, com base no seu padrão de expressão:

- Antígenos Tumor-específicos (TSA) que estão presentes apenas em células tumorais e não em qualquer outra célula

- Antígenos associados a tumores (TAA), que estão presentes em algumas células tumorais e também em algumas células normais.

Esta classificação, porém, é imperfeita porque muitos antígenos que se pensa serem específicos de um tumor acabaram por ser expressos também em algumas células normais. A classificação moderna dos antígenos tumorais é baseada na sua estrutura molecular e fonte.

Substituição de genes defeituosos (p53, BRCA1, RB, p16). Ambos os genes p53 e BRCA1 parecem inibir as células cancerígenas que carecem de mutações nestes genes que as chamadas estratégias de correção genética podem ter um potencial mais amplo do que inicialmente se acreditava, p16, também chamado MTS1 (múltiplo gene supressor do tumor 1) é conhecido por ser um importante gene supressor do tumor, especialmente no cancro do pulmão de células não pequenas. Mais de 900 pacientes foram tratados por produtos de transferência genética .



**Figura (6): Caminho p53.**

### O que os Genes podem fazer

Os genes, que são transportados em cromossomas, são as unidades físicas e funcionais básicas de hereditariedade. Os genes são sequências específicas de bases que codificam instruções sobre como fazer proteínas. São as proteínas que desempenham a maioria das funções vitais e até constituem a maioria das estruturas celulares.

## **Porquê os distúrbios genéticos**

Quando os genes são alterados para que as proteínas codificadas sejam incapazes de desempenhar as suas funções normais, podem resultar perturbações genéticas

Todos nós transportamos alguns Genes defeituosos, alguns são aparentes e muitos em aparente.

- Cada um de nós transporta cerca de meia dúzia de genes defeituosos.
- Continuamos a não ter consciência deste facto, a menos que nós, ou um dos nossos parentes próximos, estejamos entre os muitos milhões que sofrem de uma doença genética.

Cerca de uma em cada dez pessoas tem, ou irá desenvolver numa fase posterior, uma desordem genética hereditária, e sabe-se que aproximadamente 2.800 condições específicas são causadas por defeitos (mutações) em apenas um dos genes do paciente.

## **Herdamos dos Pais**

- A maioria de nós não sofre quaisquer efeitos nocivos dos nossos genes defeituosos porque transportamos duas

cópias de quase todos os genes, um derivado da nossa mãe e o outro do nosso pai.

- As únicas exceções a esta regra são os genes encontrados nos cromossomas sexuais masculinos.

Os machos têm um cromossoma X e um Y, o primeiro da mãe e o segundo do pai, pelo que cada célula tem apenas uma cópia dos genes destes cromossomas.

### **Lei das Sucessões**

- Na maioria dos casos, um gene normal é suficiente para evitar todos os sintomas da doença.
- Se o gene potencialmente nocivo for recessivo, então a sua contraparte normal executará todas as tarefas atribuídas a ambos.
- Só se herdarmos dos nossos pais duas cópias do mesmo gene recessivo é que uma doença se desenvolverá.

### **O que é terapia genética? Porque é utilizada?**

Terapia genética = Introdução de genes normais nas células que contêm genes defeituosos para reconstituir um produto proteico em falta

GT é utilizado para corrigir um fenótipo deficiente para que quantidades suficientes de um produto genético normal sejam sintetizadas → para melhorar uma desordem genética.

### **Terapia génica**

É um tratamento ou cura para doenças causadas por genes defeituosos. Envolve a adição de uma cópia normalmente funcional dos genes a células afectadas suficientes para restaurar o funcionamento normal.

### **Para conceber e realizar um tratamento de terapia genética, um investigador deve**

1. Identificar os genes responsáveis pela desordem.
2. Fazer cópias do gene normal.
3. Inserir as cópias em vectores.
4. "Infectar" as células afectadas com os vectores.

Activar o gene para que a transcrição e tradução tenham lugar.

### **Quais as células visadas?**

Terapia genética somática o genoma do receptor é alterado, mas a alteração não é passada para a geração seguinte.

Terapia genética da linha germinal, as células sexuais são alteradas com o objectivo de passar estas alterações à sua descendência.

Mas, isto não está a ser activamente investigado, pelo menos não pelos humanos, embora muita discussão esteja a ser conduzida sobre o seu valor e desejabilidade.

### **Como é feita a Terapia Genética ?**

Gene da linha germinal, a terapia seria a transferência permanente de um gene para espermatozóides ou óvulos. As gerações futuras seriam "curadas". A terapia genética das células somáticas (células do corpo) é idealmente apenas a transferência de genes para as células afectadas.

As células somáticas são uma abordagem não reprodutiva mais conservadora e segura, porque afecta apenas as células visadas no paciente, e não é transmitida às gerações futuras.

### **Tipos de Terapia Genética**

Terapia com células somáticas (a maioria das células do corpo). Até agora, toda a terapia genética nas pessoas tem sido dirigida às células somáticas.

### **Como é feita a Terapia Genética?**

- Modificação de células somáticas transferindo as sequências genéticas desejadas para o genoma.
- Células somáticas necessárias para assegurar que os genes inseridos não sejam transportados para a geração seguinte.

### **Efeitos da célula somática**

São de curta duração porque as células da maioria dos tecidos acabam por morrer e são substituídas por novas células, são

necessários tratamentos repetidos ao longo da vida do indivíduo para manter o efeito terapêutico.

## **Terapia genética somática (duas categorias)**

### **1- In vivo**

Onde os genes são alterados em células ainda no corpo. As abordagens baseadas na recombinação in vivo são especialmente incomuns, porque para a maioria das construções de ADN a recombinação tem uma probabilidade muito baixa.

### **2- Ex vivo**

Onde as células são modificadas fora do corpo e depois transplantadas de novo para dentro. Técnicas in vivo Isto é feito no caso de tecidos cujas células individuais não podem ser cultivadas in vitro em número suficiente (como as células do cérebro) e/ou onde a reimplantação das células cultivadas no paciente não é eficiente. Lipossomas e certos vectores virais são utilizados para este fim devido à falta de qualquer outro modo de selecção.

**Utilizar normalmente vectores virais**

- Vírus: portador do gene desejado é geralmente "aleijado" para incapacitar a sua capacidade de causar doenças.
- Os métodos virais provaram ser os mais eficientes até à data.
- Muitos vectores virais podem integrar de forma estável o gene desejado no genoma da célula alvo.

Técnicas de manipulação ex vivo transferidas para as células cultivadas em cultura, as células transformadas são seleccionadas, multiplicadas e depois introduzidas no doente. evita a rejeição do sistema imunitário os tecidos como as células hematopoiéticas e as células da pele que podem ser removidas do corpo.

7. Electroporação
8. Lipossomas
9. Fosfato de cálcio
10. Balas de ouro (disparadas dentro de uma arma pressurizada de hélio)
11. Retrotransposições (genes de salto - primeiros dias)
12. Cromossomas artificiais humanos.

**Tabela (1): Diferença entre os sistemas de entrega de genes in vivo e ex vivo.**

In vivo	Ex vivo
Less invasive	More invasive
Technically simple	Technically complex
Vectors introduced directly	No vectors introduced directly
Safety check not possible	Safety check possible
Decreased control over target cells Close control possible	Close control possible

### Sítios alvo para a Terapia Genética

Os genes terapêuticos têm de ser entregues em locais-alvo específicos para um tipo específico de doença.

**Tabela (2): Células-alvo para a transferência de genes.**

Disease	Target Cells
Cancer	Tumor cells, antigen presenting cells (APCs), blood progenitor cells, T cells, fibroblasts, muscle cells
Inherited monogenic disease	Lung epithelial cells, macrophages, T cells, blood progenitor cells, hepatocytes, muscle cells
Infectious disease	T cells, blood progenitor cells, antigen presenting cells (APCs), muscle cells
Cardiovascular disease	Endothelial cells, muscle cells
Rheumatoid arthritis	Sinovial lining cells
Cubital tunnel Syndrome	Nerve cells

### Sítios alvo para a Terapia Genética

Os genes terapêuticos têm de ser entregues em locais-alvo específicos para um tipo específico de doença.

**Tabela (3): Células-alvo para a transferência de genes.**

Disease	Target Cells
Cancer	Tumor cells, antigen presenting cells (APCs), blood progenitor cells, T cells, fibroblasts, muscle cells
Inherited monogenic disease	Lung epithelial cells, macrophages, T cells, blood progenitor cells, <u>hepatocytes</u> , muscle cells
Infectious disease	T cells, blood progenitor cells, antigen presenting cells (APCs), muscle cells
Cardiovascular disease	Endothelial cells, muscle cells
Rheumatoid <u>arthritis</u>	<u>Sinovial lining cells</u>
Cubital tunnel Syndrome	Nerve cells

## Limitações da Terapia Genética

### 1- Entrega de Gene

- Tropismo limitado dos vectores virais
- Dependência do ciclo celular por alguns vectores virais (i.e. mitose necessária)

### 2- Duração da actividade genética

- A entrega não-integrante será transitória (expressão transitória)
- A entrega integrada será estável

### **Segurança dos pacientes**

- Hiper-resposta imune (reações de hipersensibilidade dirigidas contra componentes vectoriais virais ou contra transgenes expressos em células tratadas)
- A integração não é controlada → oncogenes pode estar envolvida no ponto de inserção → cancro?

### **Linha germinal Terapia Genética**

- A terapia genética em células da linha germinal tem o potencial de afectar não só o indivíduo, mas também os seus filhos.
- Qualquer alteração genética nas células reprodutivas ou alterações feitas no embrião antes da fase de diferenciação, afectaria toda a descendência futura dessa pessoa. Isto faz

uma distinção vital, afectando as principais questões étnicas.

Terapia da linha germinal (tais como espermatozóides, óvulos, e os seus precursores de células estaminais. A engenharia da linha germinal nos seres humanos continua a ser apenas uma perspectiva altamente controversa. Para que o gene introduzido seja transmitido normalmente à descendência, é necessário não só que seja inserido na célula, mas também que seja incorporado nos cromossomas por recombinação genética.

### **Acrescentar um novo cromossoma**

- Experimentação vista com a introdução de 47<sup>th</sup> cromossoma.
- Existe ao longo de 46<sup>th</sup> cromossoma, grande vector capaz de carregar código genético, que esperamos que o sistema imunitário não ataque.



**Figura (7): Cromossoma novo.**

### **Aplicações**

1. Cura de doenças genéticas
2. Correção dos genes do cancro
3. Induzindo as células cancerosas a produzir toxinas para que se matem
4. Bloqueio dos genes virais (por exemplo, VIH)

5. Criação de células estaminais a partir de células somáticas

## **O futuro**

- Terapia genética em células sexuais de portadores
- Terapia genética em óvulos fertilizados

## **Como funciona a terapia genética?**

Na maioria dos estudos de terapia genética, um gene "normal" é inserido no genoma para substituir um gene "anormal", causador de doenças.

## Capítulo 3

### Vector

Uma molécula portadora utilizada para entregar o gene terapêutico às células alvo do paciente. (o vector mais comum é um vírus). Os vectores são geneticamente alterados para transportar o ADN humano normal. O novo ADN gera então um produto proteico funcional e restaura a célula alvo a um estado normal.

### Escolha dos Vectores

#### Vectores virais:

- Vetrovírus
- Adenovírus
- Vírus adeno-associado
- Vírus do Herpes Simplex

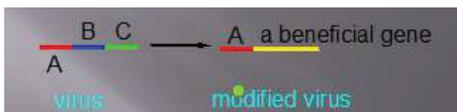
#### Vectores não-virais

- Liposome
- Conjuntos DNA-polímero
- ADN nu

O sistema vectorial ideal teria as seguintes características:

- 1- Uma capacidade de carga adequada;
- 2- Para ser indetectável pelo sistema imunitário;
- 3- Ser não-inflamatório;
- 4- To ser seguro para os pacientes com inflamação pulmonar pré-existente;
- 5- Ter uma eficiência suficiente para corrigir a fibrose cística  
Fenótipo.
- 6- Ter uma longa duração de expressão e/ou a capacidade de ser re-administrado em segurança.

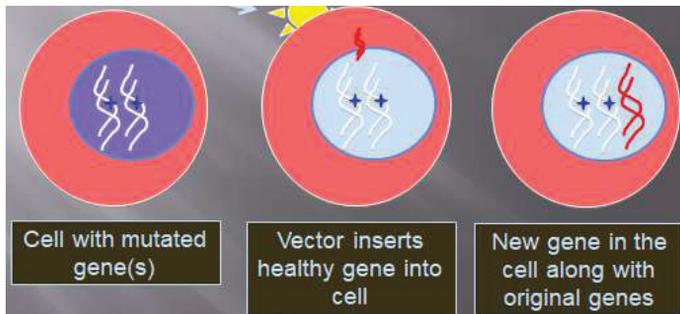
### Como consertá-lo



- É encontrado um vírus que se replica através da inserção dos seus genes no genoma da célula hospedeira. Este vírus tem três genes A, B e C.
- O Gene A codifica uma proteína que permite que este vírus se insira no genoma do hospedeiro.
- Genes B e C causam de facto a doença a que este vírus está associado.
- Substituir B e C por um gene benéfico. Assim, o vírus modificado poderia introduzir o seu 'bom gene' no genoma da célula hospedeira sem causar qualquer doença.
- Assim, utilizamos o vírus modificado para reparar a "janela partida".

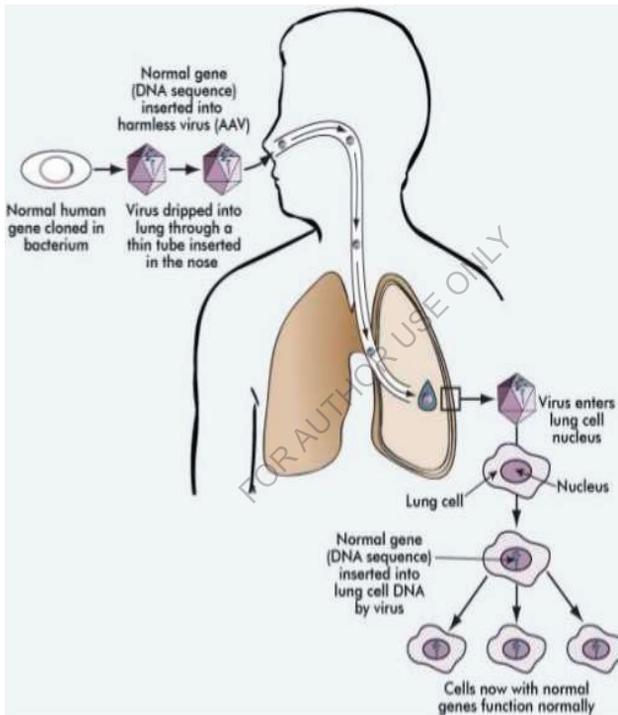
### Como é feito?

Vector Viral Portador de Gene Saudável



**Figura (7):** Vector viral com gene mutante.

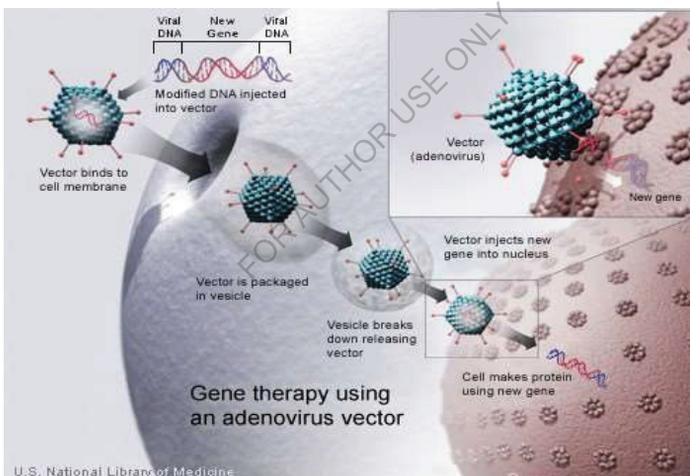
As proteínas funcionais são criadas a partir do gene terapêutico, fazendo com que a célula volte a um estado normal.



**Figura (8): Terapia génica com sequência genética normal (ADN) inserida em vírus inofensivos (AAV).**

## Porquê os vírus

Os vírus são utilizados porque desenvolveram uma forma de encapsular e entregar os seus genes às células humanas. As células alvo, tais como o fígado ou as células pulmonares do paciente são infectadas com o vector viral, este descarrega o seu material genético contendo o gene humano terapêutico para a célula alvo.



**Figura (9): Terapia gênica utilizando o vector Adenovírus.**

Terapia gênica usando um vector Adenovírus. Um novo gene é inserido num vector de adenovírus, que é

utilizado para introduzir o ADN modificado numa célula humana.

Se o tratamento for bem sucedido, o novo gene fará uma proteína funcional.

### **Vírus como Vectores**

- Replicar inserindo o seu ADN numa célula hospedeira
- A terapia genética pode utilizá-la para inserir genes que codificam uma proteína desejada para criar o traço desejado
- Quatro tipos diferentes
  - Adenovírus
  - Vírus Adeno-Associado (AAV)
  - Retrovírus
  - Vírus do Herpes Simplex (HSV).

### **Sucessos da Terapia Genética**

Embora nenhuma terapia genética tenha sido aprovada pela FDA para venda, algumas doenças têm sido experimentalmente bem sucedidas:

- Melanoma (cancro da pele)
- Deficiências graves de Immuno combinadas
- Cegueira Hereditária
- Anemia falciforme

### **Problema**

A replicação de vírus defeituosos afecta negativamente a capacidade normal do vírus de espalhar genes no corpo

- Depende da difusão e disseminação
- Impedido por pequenos espaços intercelulares para o transporte

Restrito por ligandos de ligação viral na superfície celular→  
por isso não pode avançar muito. Mais de 5000 doentes foram tratados nos últimos ~12 anos em todo o mundo.

### **Entrega de Gene não viral**

- **Introdução directa:**

Introdução do ADN terapêutico nas células-alvo. Esta abordagem é limitada na sua aplicação porque só pode ser utilizada com determinados tecidos e requer grandes quantidades de ADN.

- **Lipossoma:**

Criação de uma esfera lipídica artificial com um núcleo aquoso. Este carrega o ADN terapêutico, é capaz de passar o ADN através da membrana da célula alvo.

- **Ligação química :**

Ligando quimicamente o ADN a uma molécula que se ligará a receptores celulares especiais. Uma vez ligados a estes receptores, as construções terapêuticas de ADN são engolfadas pela membrana celular e passam para o interior da célula alvo.

- **47º cromossoma (humano artificial):**

Existiriam autonomamente ao lado da norma 46, não afectando o seu funcionamento ou causando quaisquer mutações.

Seria um grande vector capaz de transportar quantidades substanciais de código genético, devido à sua construção e autonomia, o sistema imunitário do organismo não o atacaria.

## **Qual é a situação actual da investigação em terapia genética?**

- A Food and Drug Administration (FDA) ainda não aprovou nenhum produto de terapia genética humana para venda.
- A terapia genética actual é experimental e não se tem revelado muito bem sucedida em ensaios clínicos. Poucos progressos foram feitos desde que o primeiro ensaio clínico de terapia genética começou em 1990.
- Em Janeiro de 2003, quando a FDA suspendeu temporariamente todos os ensaios de terapia genética utilizando vectores retrovirais em células estaminais sanguíneas.

Cientistas dos Institutos Nacionais de Saúde (Bethesda, MD) trataram com sucesso o melanoma metastático em dois pacientes, utilizando células T assassinas geneticamente redireccionadas para atacar as células cancerígenas. Este estudo constitui a primeira demonstração de que a terapia genética pode ser eficaz no tratamento do cancro.

A interferência de RNA ou o silenciamento de genes pode ser uma nova forma de tratar a Huntington. Peças curtas de RNA

de cadeia dupla (RNAs curtos e interferentes ou siRNAs) são utilizadas pelas células para degradar o RNA de uma determinada sequência. Se um siRNA for concebido para corresponder ao RNA copiado de um gene defeituoso, então o produto proteico anormal desse gene não será produzido.

Universidade da Califórnia, Los Angeles, a equipa de investigação introduz genes no cérebro usando lipossomas revestidos num polímero chamado polietilenoglicol (PEG).

A transferência de genes para o cérebro é um feito significativo porque os vectores virais são demasiado grandes para atravessar a "barreira hemato-encefálica". Este método tem potencial para tratar a doença de Parkinson. Que factores têm impedido a terapia genética de se tornar um tratamento eficaz para a doença genética.

### **Natureza de curta duração da terapia genética:**

Antes da terapia genética poder tornar-se uma cura permanente para qualquer condição, o ADN terapêutico introduzido nas células-alvo deve permanecer funcional e as células que contêm o ADN terapêutico devem ser de longa duração e estáveis.

## **Problemas**

Com a integração do ADN terapêutico no genoma e a rápida divisão de muitas células impedem a terapia genética de alcançar quaisquer benefícios a longo prazo. Os pacientes terão de ser submetidos a múltiplas rondas de terapia genética.

### **Que factores têm impedido a terapia genética de se tornar um tratamento eficaz para doenças genéticas?**

- Resposta imunitária : Sempre que um objecto estranho é introduzido nos tecidos humanos, o sistema imunitário é concebido para atacar o invasor.
- O risco de estimular o sistema imunitário de forma a reduzir a eficácia da terapia genética é sempre um risco potencial.

Além disso, a melhor resposta do sistema imunitário aos invasores que já viu antes torna difícil a repetição da terapia genética nos doentes

### **Que factores têm impedido a terapia genética de se tornar um tratamento eficaz para doenças genéticas?**

- Problemas com vectores virais - Os vírus, enquanto portadores de escolha na maioria dos estudos de terapia genética, apresentam uma variedade de problemas potenciais à toxicidade do paciente, respostas imunitárias e inflamatórias, e problemas de controlo dos genes e de direccionamento.
- Além disso, há sempre o receio de que o vector viral, uma vez dentro do paciente, possa recuperar a sua capacidade de causar a doença.

### **Que factores têm impedido a terapia genética de se tornar um tratamento eficaz para doenças genéticas?**

Perturbações multigénicas - As condições ou perturbações que surgem de mutações num único gene são os melhores candidatos à terapia genética. Infelizmente, algumas das perturbações mais comuns, tais como doenças cardíacas, tensão arterial elevada, doença de Alzheimer, artrite e diabetes, são causadas pelos efeitos combinados de variações em muitos genes. Perturbações multigenes ou multifactoriais

como estas seriam especialmente difíceis de tratar de forma eficaz utilizando a terapia genética.

### **À compreensão:**

- Os cientistas sabem pouco sobre o funcionamento dos milhares de genes. Tentar uma terapia sem este conhecimento iria abordar poucos genes de uma doença em particular
- ou seja, anemia falciforme

#### Anemia falciforme

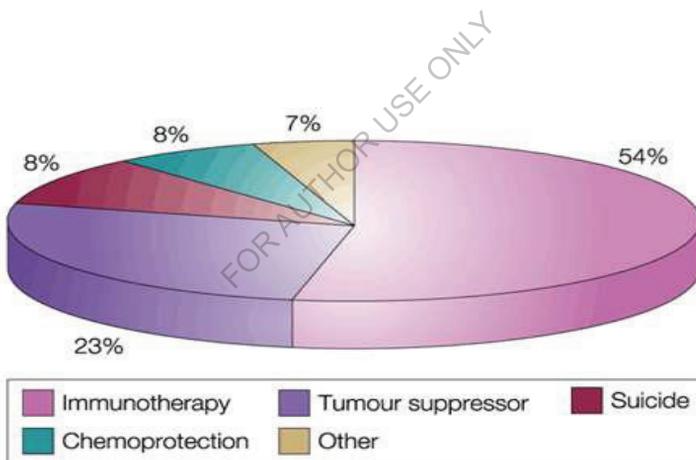
- Causado por erro no gene que informa o nosso corpo sobre como fazer hemoglobina
- Prevalente nos afro-americanos
- Por muito mortal que seja o erro, este aumentou a taxa de sobrevivência daqueles que também tinham malária na região
- A maioria das doenças genéticas envolve mais do que um gene, apenas algumas doenças genéticas envolvem apenas um

- Estas perturbações multigenes também envolvem o ambiente, tais como dieta, exercício, tabagismo, etc.
- Os elevados custos associados ao desenvolvimento desta tecnologia, e os regulamentos que precisavam de ser implicados com as experiências são grandes obstáculos para os experimentadores neste campo.
  
- Primeira tentativa de Terapia Genética Humana  
Começou em 1990, usando estratégia *ex vivo*, onde as células do paciente eram cultivadas em laboratório e incubadas com vectores
- Transplantado de volta ao paciente
- Tentativa de tratar 2 doenças genéticas, incluindo crianças com deficiência imunitária, bem como pessoas com níveis elevados de colesterol sérico.

### **Objectivo da terapia genética**

- Um gene normal pode ser inserido num local não específico dentro do genoma para substituir um gene não-funcional. Esta abordagem é mais comum.

- Um gene anormal poderia ser trocado por um gene normal através de uma recombinação homóloga.
- O gene anormal poderia ser reparado através de mutação inversa selectiva, que devolve o gene à sua função normal.
- O regulamento (o grau em que um gene é ligado ou desligado) de um determinado gene pode ser alterado.



**Figura (10): Modificação genética directa de células em pacientes.**

### **Objectivos da terapia genética**

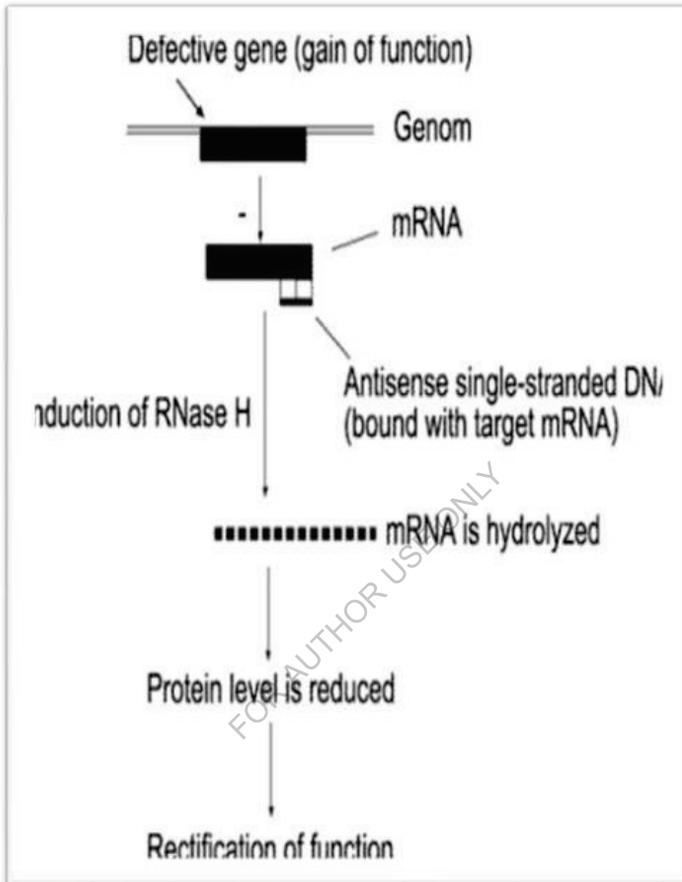
- 1- Terapia genética da linha germinal
- 2- Terapia genética com células somáticas
- 3- Aumento de genes
- 4- Substituição de genes

Inibição específica da expressão genética

Morte celular direccionada

- 1- Terapia génica
- 2- Terapia antissenso (suprimir a expressão genética)
- 3- Aumento de genes (suplemento de gene defeituoso)
- 4- Terapia antissenso.

FOR AUTHOR USE ONLY



**Figura (11): Rectificação da função por gene defeituoso.**

Compensa as mutações genéticas que produzem proteínas destrutivas.

As principais estratégias envolvidas são

1) Pequenos trechos de DNA sintético que visam as transcrições do mRNA de proteínas anormais, impedindo a sua tradução

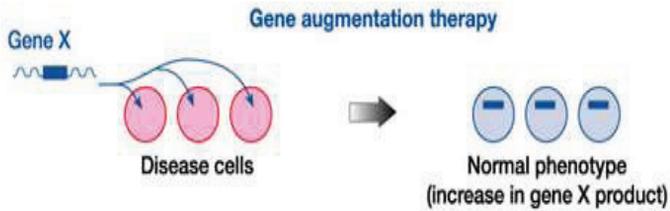
OU pequenas moléculas de RNA (siRNA) utilizadas para degradar transcrições aberrantes de RNA

2) Fornecer um gene para uma proteína (anticorpo intracelular) que possa bloquear a actividade da proteína mutante

3) conceber híbridos de ADN/ARN que possam reparar directamente o gene mutante

### **Aumento de genes**

A maioria das terapias simplesmente adiciona um gene útil num tipo de célula seleccionada para compensar a versão em falta ou defeituosa. Útil no tratamento da perda de mutações funcionais, tais como os Genes Tumor.



**Figura (12): Terapia de aumento de genes.**

### **Abordagem directa**

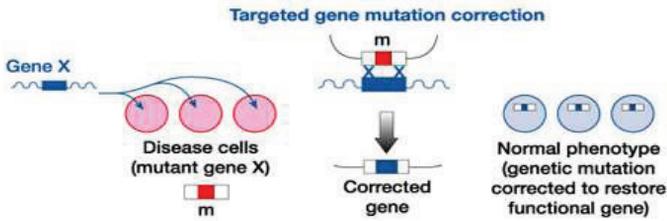
Induzir as células cancerosas a fazer uma proteína que matará a célula.

### **Abordagem indirecta**

Estimular uma resposta imunitária contra células seleccionadas ou eliminar o fornecimento de sangue.

### **Substituição de genes**

Esta estratégia substitui a cópia mutante por uma cópia in situ que funcione correctamente. Útil para o ganho de mutações funcionais, tais como oncogenes.



**Figura (13): Correção da mutação genética alvo.**

### **Três desafios na terapia genética**

- 1) Empacotar o gene
- 2) Proteger o gene
- 3) entrega dirigida ao núcleo e libertação de uma forma activa

### **Vectoros**

"Cavalos de Tróia" que introduzem sorrateiramente o gene na célula. Moléculas portadoras concebidas especificamente para entrar nas células e depositar genes terapêuticos.

### **Os vectoros podem ser virais ou não-virais**

## **Vectores adenovirais**

- 1- Não inserir no genoma
- 2- Temporário
- 3- Falta de especificidade
- 4- Forte resposta imunitária

FOR AUTHOR USE ONLY

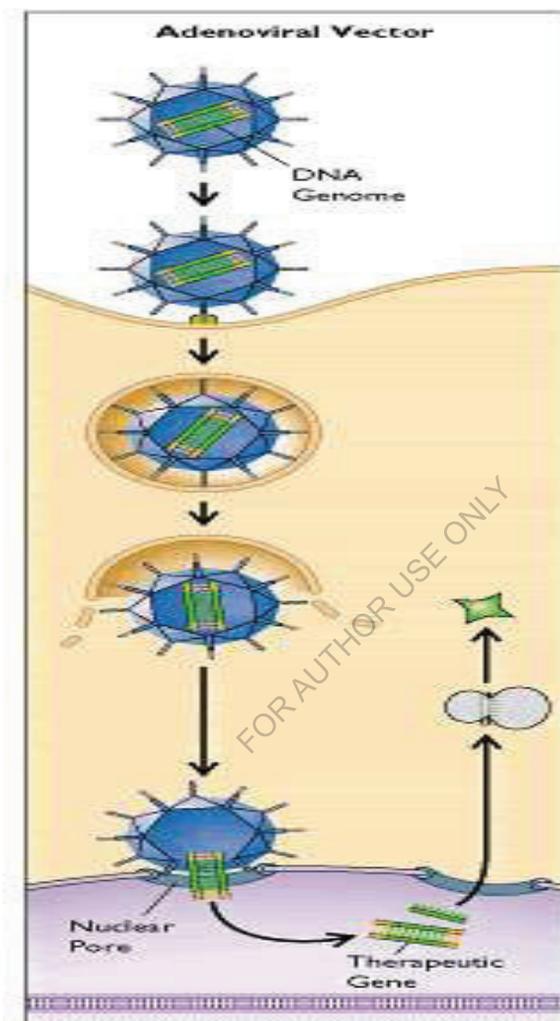
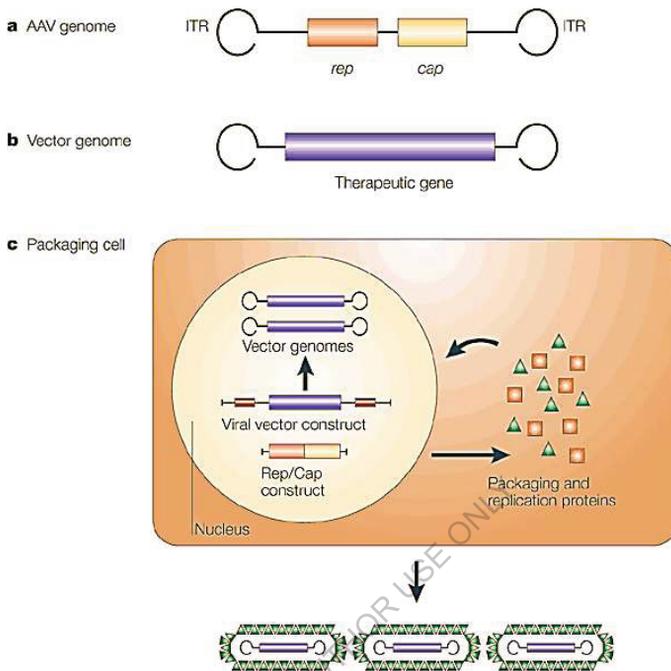
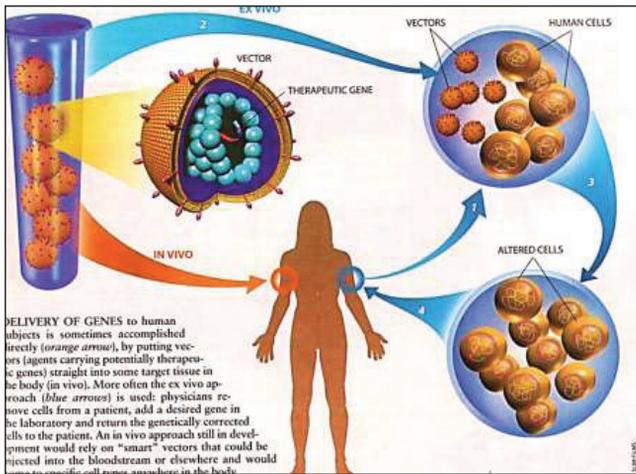


Figura (14): Vectores virais associados ao adenovírus.



**Figura (15): Integrar-se no genoma, mas de tamanho pequeno.**

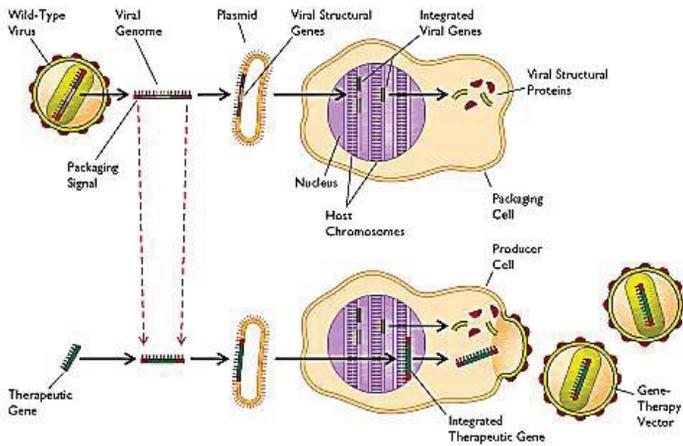
## Métodos de entrega vectorial



**Figura (15): Métodos de entrega vectorial.**

### **Estratégia vetorial viral**

Os genes de replicação e virulência podem ser substituídos por genes terapêuticos



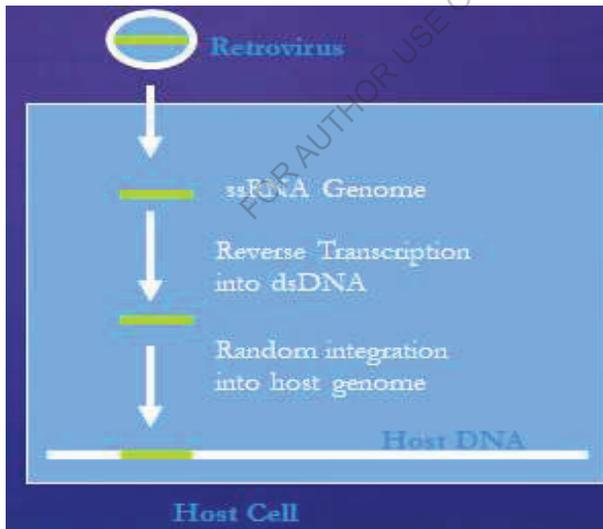
**Figura (16): Gene terapêutico por vector de terapia genética com vírus de tipo selvagem.**

## Capítulo 4

### Retrovírus

Retrovírus incluindo lentivírus, VIH e vetores baseados em MMLV.

- Genoma de RNA isolado
- Membrana lipídica envolvida
- Gama de hospedeiros determinada por proteínas de envelope



**Figura (17): Retrovírus com transcrição inversa por integração aleatória no genoma do hospedeiro.**

## O Genoma Retroviral



**Figura (18): O Genoma Retroviral.**

### **Repetição Terminal Longa (LTR):**

Necessária para integração no genoma do hospedeiro

$\Psi$  (Psi):

$\Psi$  sinal de embalagem

*mordaca:*

Embalagem do genoma viral em partículas virais

*pol:*

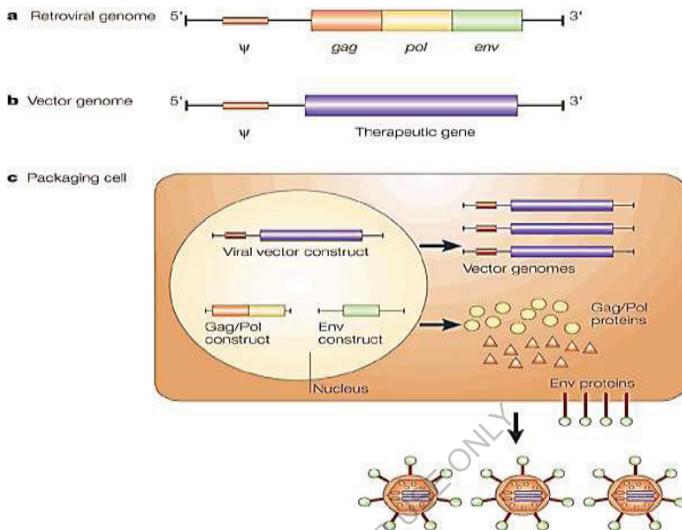
Polimerase viral necessária para a replicação viral

*inveja:*

Proteínas do envelope viral, necessárias para a entrada em células hospedeiras, ditam a gama de hospedeiros

### **Vectores retrovirais**

- Os vectores retrovirais são baseados no vírus da leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), que é capaz de infectar tanto o rato como as células humanas.
- Os genes virais, gag, pol e inveja, são substituídos pelo transgene de interesse e expressos em plasmídeos na linha de células de embalagem.
- Como os genes não essenciais carecem da sequência de embalagem, não estão incluídos na partícula de virião.
- Para evitar que a recombinação resulte na replicação de retrovírus competentes, todas as regiões de homologia com a espinha dorsal vectorial são removidas.

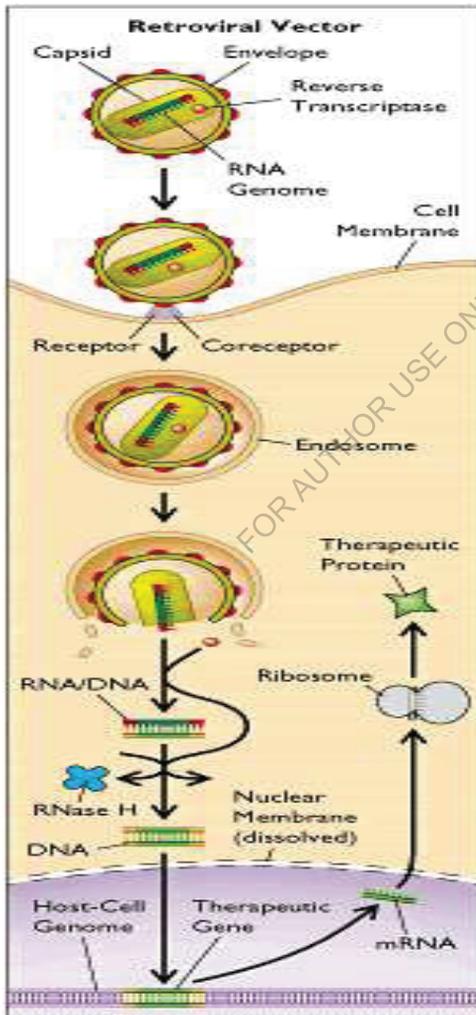


**Figura (19):** Vetores retrovirais.

## Vetores retrovirais

Concebidos para introduzir genes de célula e de depósito Os vetores especiais são construídos através da eliminação ou alteração da sequência nativa em vetores retrovirais e lentivíricos, para evitar a geração de retrovírus

competentes de replicação (RCR) tipicamente causados por recombinação homóloga.



**Figura (20): Via Retroviral vector com gene terapêutico para o genoma da célula hospedeira.**

**Vectores retrovirais**

**Vantagens**

- 1) expressão a longo prazo
- 2) baixa toxicidade
- 3) alta capacidade
- 4) baixa imunidade anti-vectorial permitindo a repetição da administração

**Problemas**

Falta de especificidade celular:  
Promíscuo: genes depositados em vários tipos de células, resultando em eficiência reduzida do alvo e efeitos fisiológicos indesejados

Emenda aleatória no ADN do hospedeiro resultando na perturbação normal do gene e/ou alteração na função do gene.

## Vectoros retrovirais de embalagem

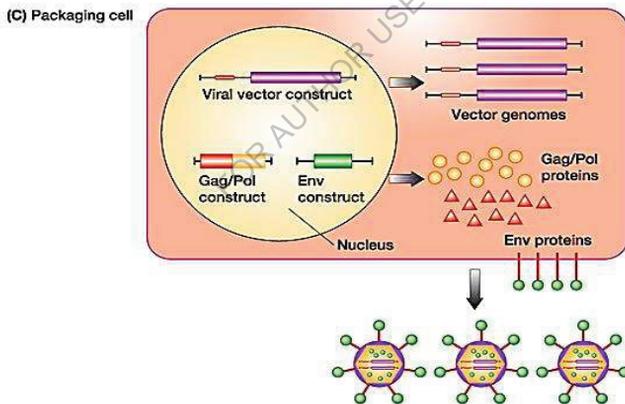
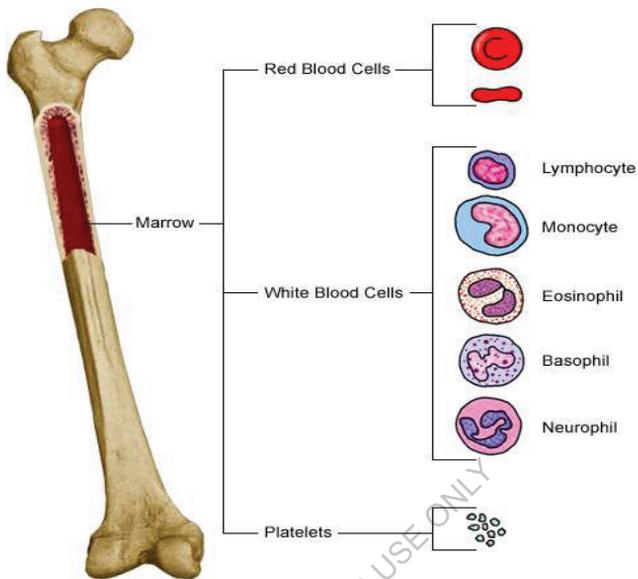


Figura (21): Parte2 de 2 genética molecular humana.

Gag, pol e genes de injeira em fragmentos fisicamente separados sem sequência  $\Psi$ . As proteínas virais recombinantes são infecciosas mas deficientes em termos de replicação.

### **Terapia génica em pacientes com X-SCID**

Rara condição causada pela falta ou redução do sistema imunitário ("síndrome da bolha do bebé"). Os doentes XSCID (bebé na bolha) não podem fazer linfócitos T, e os seus linfócitos B não conseguem fazer anticorpos essenciais para combater infecções. Sem linfócitos T e B, os doentes desenvolvem infecções graves na infância e podem morrer, a menos que lhes seja feito um transplante de medula óssea.



**Figura (21): Imunodeficiência Combinada Grave (SCID)**

A X-SCID, ou mais conhecida como a doença "bebé na bolha", é causada por mutações no gene IL2RG. O gene codifica a subunidade gama do receptor da interleucina-2. A proteína produzida pelo gene IL2RG é um receptor de sinais químicos.

Os sinais químicos dirigem o crescimento e activação das células do sistema imunitário. O gene é agora chamado de "cadeia gama comum" porque a proteína é incorporada em receptores para vários tipos diferentes de sinais.

O gene IL2RG está localizado no braço longo (q) do cromossoma X na posição 13.1. O gene abrange aproximadamente 4,2kb, e tem sete intrões e oito exões. Os exons 5 e 7 têm pontos quentes de mutação. O X-SCID é a forma mais comum de SCID e estima-se que seja responsável por 46% a 70% de todos os casos SCID.

Terapia genética por injeção de células estaminais autólogas CD34+ hematopoiéticas (HSCs) retroproduzidas por via viral.

Mutagénesse de inserção perto do promotor do proto-oncogene LMO2.

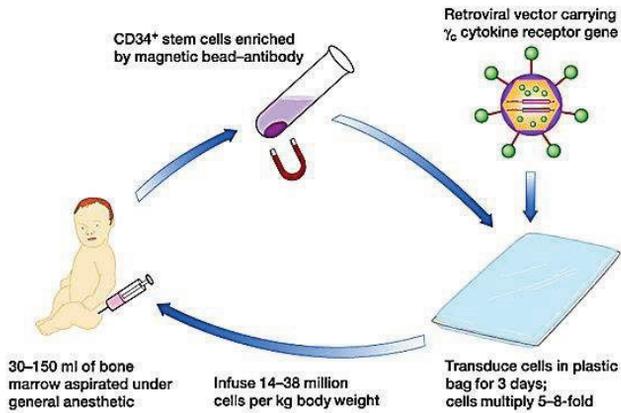


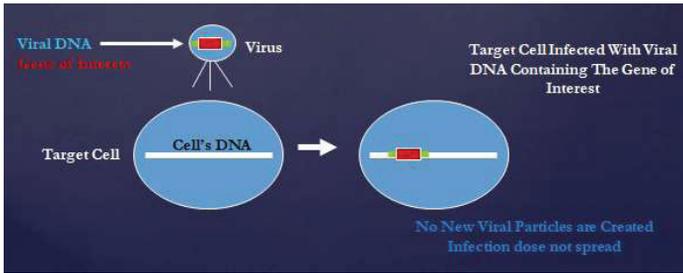
Figure 21-11 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

**Figura (22): 2/11 X-SCID pacientes desenvolveram leucemia.**

### **Replicação de Vectores Virais Deficientes**

Geneticamente concebida para que a infecção viral não se espalhe

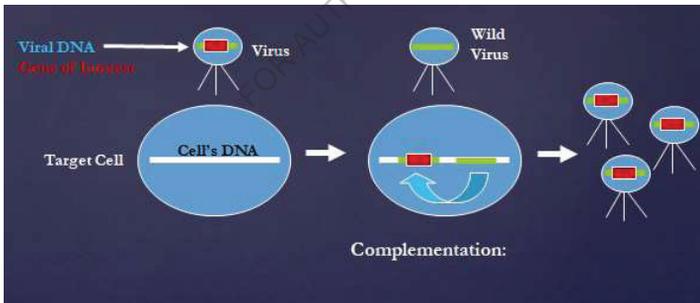
O ADN viral não contém os genes virais necessários para fazer mais vírus.



**Figura (23):** Célula-alvo infectada com ADN viral contendo o gene de interesse.

### Resgate de Vírus Deficientes de Replicação

Super infecção com vírus selvagens.



**Figura (25):** Super infecção com vírus selvagens.

O genoma do vírus selvagem fornece as proteínas em falta necessárias para que o vector viral se reproduza. A célula

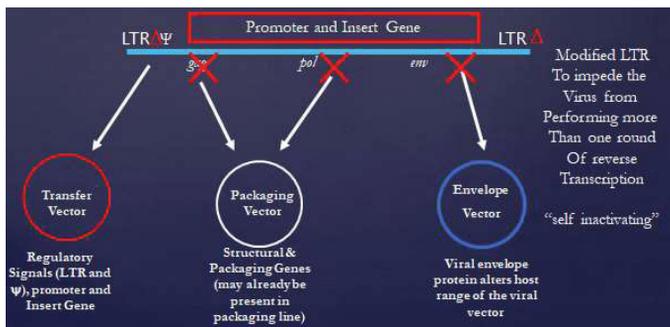
super infectada funciona de forma semelhante a uma linha de embalagem.

O genoma do vírus selvagem recombina aleatoriamente com o vector viral, fornecendo material genético suficiente para que o vector viral se possa replicar.

O vírus resgatado resultante pode possuir pedaços do gene original inserido. O genoma viral é impossível de prever devido à recombinação aleatória. O vírus pode apresentar virulência alterada.

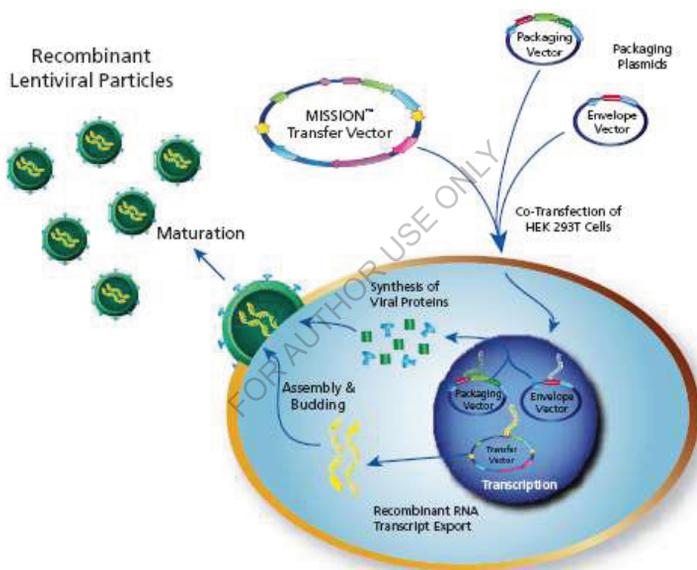
### Desenho de Replicação de Vectores Lentivirais Incompetentes (3ª Geração)

O vector viral é "eviscerado" tanto quanto possível para criar espaço para o gene inserido e para dividir o genoma viral em regiões de acção cis - e trans-



**Figura (26): Desenho de Vectores Lentivirais Incompetentes de Replicação (3ª Geração).**

### Embalagem de Partículas Recombinantes Lentivirais

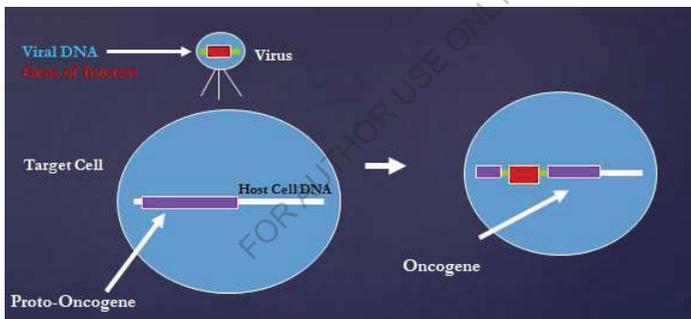


**Figura (27): Embalagem de Partículas Lentivira Recombinantes.**

Os três plasmídeos contendo os componentes do genoma viral são transformados na linha de embalagem para criar as

partículas virais infecciosas. São utilizados múltiplos plasmídeos, pelo que seriam necessários múltiplos eventos de recombinação para reconstituir uma replicação de vírus competente.

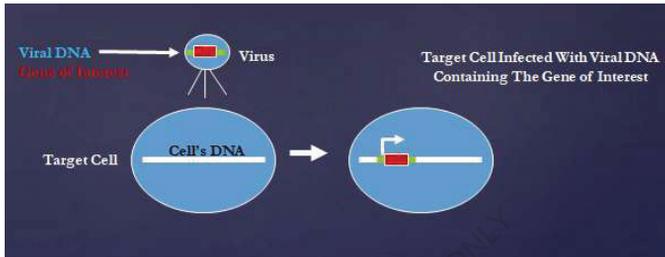
### Riscos associados ao Retrovírus com Mutagênese de Inserção



**Figura (28): Riscos associados ao Retrovírus com Mutagênese de Inserção**

A integração aleatória do genoma viral pode perturbar os genes hospedeiros endógenos. De especial preocupação. É a perturbação de proto-oncogenes, o que pode levar a um aumento do risco de cancro.

## Riscos associados aos Vectores Retrovirais de Transdução Viral



**Figura (29): Riscos associados aos Vectores Retrovirais: Transdução Viral.**

Os indivíduos infectados com o vector viral podem exprimir o gene inserido no local da infecção.

### Limitações dos vectores retrovirais

- Uma limitação crítica dos vectores retrovirais é a sua incapacidade de infectar células não divisórias, tais como as que constituem músculo, cérebro, pulmão e tecido hepático.

- As células do tecido alvo são removidas, cultivadas in vitro e infectadas com o vector recombinante, as células alvo produzem a proteína estranha e são então transplantadas de volta para o animal (terapia genética ex vivo).
- Problemas com o corte da expressão, a expressão prolongada é difícil de alcançar.
- A expressão é reduzida pela acção do interferão inflamatório sobre os LTR virais, à medida que o ADN retroviral se integra, os promotores dos LTR virais são inactivados.
- Possibilidade de integração aleatória do ADN vectorial no cromossoma hospedeiro.

## Características do **vector** retroviral

### Vantagens

- Integração: expressão permanente
- Pseudo-vírus datilografado

### Desvantagens

- Só infectando células divisórias
- Mutagénesse de inserção (formação de tumores)

- Activar oncogenes
- Inibir genes supressores de tumores

### **Vectores Lentivirais**

- Pertencem à família do retrovírus, mas podem infectar tanto as células divisoras como as não divisoras.
- São mais complicados que os retrovírus, contendo seis proteínas adicionais, tat, rev, vpr, vpu, nef e vif.
- O vírus da imunodeficiência humana (VIH) foi desactivado e desenvolvido como um vector para o fornecimento de genes in vivo.
- Baixa resposta imunitária celular, portanto boa possibilidade de fornecimento de genes in vivo com expressão sustentada ao longo de seis meses.
- Sem resposta potente de anticorpos.

### **Sintomas Prováveis de Infecções Adquiridas no Laboratório com Vectores Retro/Lentivirais**

- Febre / sintomas semelhantes aos da gripe

- Possível inflamação dos tecidos infectados
- A integração aleatória do genoma viral no genoma hospedeiro pode resultar em mutagénese e oncogénese insercional
- Expressão dos genes inseridos nos tecidos infectados (oncogenes, mediadores inflamatórios e toxinas são de especial preocupação)

### **Vectoros de herpesvírus**

- HSV-1 é uma doença ligeira
- dsDNA Linear
- 50 kb de ADN estrangeiro podem ser acomodados (150 kb para a nova geração de vectoros)
- Vírus neurotrópico
- Vírus defeituosos altamente eliminados (metade dos 80 genes do herpes podem ser eliminados) + linhas de células de embalagem com estirpes mutantes.

### **O primeiro caso**

- A primeira terapia genética foi realizada em 14 de Setembro<sup>th</sup>, 1990

- Ashanti DeSilva foi tratada para SCID

### **Imunodeficiência combinada de Sever**

- Os médicos removeram-lhe os glóbulos brancos, inseriram o gene em falta no leucócito, e depois colocaram-nos de novo na sua corrente sanguínea.
- Isto fortaleceu o seu sistema imunitário
- Só funcionou durante alguns meses

Um caso de leucemia numa criança SCID tratada com um vector retroviral

- No total, mais de 1000 pessoas receberam terapia genética retroviral
- Um bebé francês tratado com vector retroviral há 3 anos
- Uma doença semelhante à leucemia desenvolveu-se este Verão.
- Nove outras crianças tratadas ao mesmo tempo não mostram sinais de leucemia
- Mas o efeito secundário ainda não é um risco suficientemente grande para que as experiências genéticas para crianças com uma doença imunitária frequentemente fatal parem
- As pessoas que recebem terapia genética retroviral devem ser avisadas sobre o risco de desenvolver leucemia

Ensaio bem sucedido de um ano de terapia genética para a doença de Parkinson

- Neurologic, uma empresa de biotecnologia, anunciou que completou com sucesso o seu marco histórico ensaio de Fase I de terapia genética para a Doença de Parkinson utilizando vectores AAV.
- Este foi um estudo de 12 pacientes com quatro pacientes em cada uma das três coortes escalonadas de dose. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia local e todos os 12 pacientes tiveram alta do hospital no prazo de 48 horas após o procedimento, e foram seguidos durante 12 meses. Os resultados primários da concepção do estudo, segurança e tolerabilidade, foram alcançados com sucesso. Não foram notificados quaisquer eventos adversos relacionados com o tratamento.

### **Tabela (5): Vectores baseados em vírus RNA**

**Vectors Based on RNA Viruses**

<b>Features</b>	<b>Retroviral</b>	<b>Lentiviral</b>	<b>Alphaviral</b>
Maximum Insert size	7-7.5 kb	7-7.5 kb	5 kb
Concentrations viral particles/ml	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>9</sup>
Route of gene delivery	Ex vivo	Ex/ In vivo	In vivo
Integration	Yes	Yes	No
Duration of expression in vivo	Shorter than theorized	Long	Short
Stability	Good	Not tested	Good
Ease of Preparation scale up	Pilot scale up up to 20-50 liters	Not known	Not known
Immunological problems	Few	Few	Unknown
Pre-existing host immunity	Unlikely	Unlikely, except in AIDS patients	No
Safety problems	Insertional mutagenesis?	Insertional mutagenesis?	Few

**Tabela (6): Vetores baseados em vírus de ADN**

Vectors Based on DNA and on DNA Viruses

Features	Adenoviruses	Adeno-associated viruses	Herpesviruses	Vaccinia virus	Naked DNA /Lipid DNA
Maximum Insert size	7.5 kb	4.5kb	~30kb	>25 kb	Unlimited size
Concentrations viral particles/ml	>10 <sup>10</sup>	>10 <sup>12</sup>	>10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>9</sup>	No limitation
Route of gene delivery	Ex/In vivo	Ex/In vivo	Ex vivo	Ex/In vivo	Ex/In vivo
Integration	No	Yes/No	No	No	very poor
Duration of expression in vivo	Short	Long	Short/ Long in CNS?	Short	Short
Stability	Good	Good	Unknown	Good	Very good
Ease of Preparation scale up	Easy to scale up	Difficult to purify, difficult to scale up	Not yet tried	Vaccine production facilities exist	Easy to scale up
Immunological problems	Extensive	Not known	Not known	Extensive	None
Pre-existing host immunity	Yes	Yes	Yes	Diminishing as unvaccinated population grows	No
Safety	Inflammatory response, toxicity	Inflammatory response, toxicity	Neurovirulence? Insertional mutagenesis	Disseminated vaccinia in immunocompromised hosts	None?

**Tabela (7): Pistas clínicas de terapia genética para doenças monogénicas nos Estados Unidos em 2000.**

Clinical Trials of Gene Therapy for Monogenic Diseases in the United States in 2000

Disease	Gene	Vector	Number of Trials	Number of patients	Results
Gaucher disease	GC <sup>c</sup>	Retrovirus	3	9	One trial shows long term elevation of GC expression, other trials primarily Phase I
OTC deficiency	OTC	Adenovirus	1	14	Trial suspended after one fatality (see text)
ADA-SCID	ADA + NeoR	Retrovirus	1	6	Ongoing since 1990
Cystic Fibrosis	CFTR	Adenovirus	9	83	Some correction of defect in 30% of patients, but inflammation at clinical doses, and reduction in therapeutics with repeated injection.
		AAV	4	36	Some correction of defect, Phase II study started
		Cationic Lipids	4	25	30% to 50% of patients showed improvement
Chronic granulomatous	p17 phox/ gp91 phox	Retrovirus	3	9	Phase I/II, study closed in 1998
Familial hypercholesterolemia	LDLR	Retrovirus	1	5	Phase I, closed in 1994

**Tabela (8): Outros trilhos clínicos de terapia genética nos Estados Unidos em 2000.**

Other Clinical Trials of Gene Therapy in the United States in 2000

Disease	Gene	Vector	Number of Trials	Number of patients	Results
<b>Chronic Diseases</b>					
Rheumatoid arthritis	IRAP	Retrovirus	1	7	?
Artery disease and restenosis	VEGF	Naked DNA	2	29	?
<b>Infectious Diseases</b>					
AIDS	HIV-IT(V)	Retrovirus	3	298	Most gene trials for HIV are in Phase I, with a few in phase II. Few results reported.
	CD4-Zeta TcR	Retrovirus	3	54	
	Anti-HIV ribozyme	Retrovirus	2	12	
	TK + HyR	Retrovirus	2	14	
	Antisense to TAR	Retrovirus	3	17	

**Tabela (9): Rastos clínicos de transferência de genes para terapia do cancro nos Estados Unidos em 2000.**

Clinical Trials of Gene Transfers for Cancer Therapy in the United States in 2000

Location	Gene	Vector	Number of Trials	Number of patients	Phase
Brain cancers					
Neuroblastoma	IFN $\gamma$	Retrovirus	1	4	I
	IL-2	Retrovirus	1	12	I
	IL-2	Adenovirus	1	6	I
Central nervous system tumor	TK	Adenovirus	2	22	I
Pediatric tumor	TK	Retroviral producing cells	1	2	I
Adult brain tumor	TK	Retroviral producing cells	1	15	I
Ovarian cancer					
	HSV-TK	Adenovirus	1	10	I
	TK	Retroviral producing cells	3	42	I
	BRCA-1	Retrovirus	1	40	I/II
	p53	Adenovirus	1	16	I
Small cell lung cancer					
	IL-2 + NeoR	Lipofection	1	8	I
	Anti-sense to k-ras	Retrovirus	1	9	I
	p53	Adenovirus	2	59	I/II
Prostate cancer					
	GM-CSF	Retrovirus	1	8	I/II
	PSA	Poxvirus	1	3	I
	HSV-TK	Adenovirus	1	18	I
Breast cancer					
	BRCA-1	Retrovirus	1	21	I
	E1A	Lipofection	1	16	I
	MDR-1+ NeoR	Retrovirus	4	39	I
	CD80	Lipofection	1	15	I
	CEA	Poxvirus	4	53	I
	CEA	RNA transfer	1	30	I

Para corrigir um defeito genético através da transferência de uma cópia normal funcional do gene para as células

- Nos anos 80, os avanços na biologia molecular já tinham permitido a sequenciação e clonagem de genes humanos. Os cientistas à procura de um método de produção fácil de proteínas, como a proteína deficiente em insulina diabética, investigaram a introdução de genes humanos no

ADN bacteriano. As bactérias modificadas produzem então a proteína correspondente, que pode ser colhida e injectada em pessoas que não a podem produzir naturalmente.

- Os cientistas deram o passo lógico de tentar introduzir genes directamente nas células humanas, concentrando-se nas doenças causadas por defeitos unigénicos, tais como fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular e anemia falciforme, doença do nervo óptico, reparação e regeneração de feridas, e doença cardiovascular.
- Contudo, isto tem sido muito mais difícil do que modificar bactérias simples, principalmente devido aos problemas envolvidos no transporte de grandes secções de ADN e na sua entrega ao local certo no genoma.

## **Como entregar genes a células específicas, tecidos e animais inteiros? (Métodos de entrega)**

### **Métodos de entrega de genes**

#### **Vectores virais:**

##### **1- Adenovírus**

2- Retrovírus

3- Lentivírus

4- Vírus adeno-associado (AAV)

5- Herpes simplex virus (HSV)

**Baseado em vectores não-virais**

- ADN nu (ADN plasmídico): injeção ou arma genética
- Lipossomas (lípidos catiónicos): misturar com genes
  - 1- Ex-vivo
  - 2- In vivo

FOR AUTHOR USE ONLY

## Capítulo 5

### **Vectores virais na terapia genética**

Gene terapia, a introdução de ácidos nucleicos nas células com o objectivo de alterar o curso da condição médica ou da doença.

#### **Administração**

- 1- Células ex vivo removidas, geneticamente modificadas, transplantadas de volta para um paciente.
- 2- Transferência directa in vivo de material genético para o paciente.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios não-vivos cujo tamanho vai de 20 a 300nm de diâmetro. São compostos de um RNA ou de um núcleo de ADN de fio simples ou duplo, rodeados por uma camada protetora de proteínas e, em tipos mais complexos, de um envelope lipídico adicional. A sua principal função é entregar o seu genoma na célula hospedeira.

Os vírus atacam os seus hospedeiros e introduzem o seu material genético na célula hospedeira como parte do seu ciclo de replicação. Este material genético contém

"instruções" básicas de como produzir mais cópias destes vírus, desviando a maquinaria normal de produção do organismo para servir as necessidades do vírus. A célula hospedeira executará estas instruções e produzirá cópias adicionais do vírus, levando a que cada vez mais células fiquem infectadas. Alguns tipos de vírus inserem fisicamente os seus genes no genoma do hospedeiro.

Isto incorpora os genes desse vírus entre os genes da célula hospedeira durante o tempo de vida dessa célula. Vírus como este poderiam ser utilizados como veículos para transportar genes "bons" para uma célula humana.

Primeiro, um cientista removeria os genes do vírus que causam a doença. Depois, substituiriam esses genes por genes que codificassem o efeito desejado (por exemplo, a produção de insulina no caso de diabéticos). Este procedimento deve ser feito de tal forma que os genes que permitem ao vírus inserir o seu genoma no genoma do seu hospedeiro sejam deixados intactos.

### **Porquê usar o viral**

- Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios

- Muito eficiente na transferência de ADN viral para células hospedeiras
- Células-alvo específicas: dependendo das proteínas de fixação viral (capsid ou glicoproteínas)
- Substituição de genes: genes não essenciais de vírus são eliminados e genes exógenos são inseridos

### **Vírus como Vectores**

Qualquer vírus pode potencialmente ser utilizado para exprimir genes estranhos. Os diferentes vírus são mais adequados para diferentes tipos de utilizações. A integração pode ser importante, tal como em muitos usos da terapia genética. Vírus maiores podem exprimir mais e maiores genes estranhos, mas são mais difíceis de manipular. Os promotores de acção Cis para replicação e embalagem do genoma devem ser compreendidos. Os ensaios clínicos de terapia genética dependem de retrovírus ou adenovírus para fornecer o gene desejado.

**Outros vírus utilizados como vectores incluem vírus adeno-associados, lentivírus, vírus da varíola, alfavírus, e vírus do herpes.**

Estes vírus diferem na forma como transferem genes para as células que reconhecem e são capazes de infectar, e se alteram o ADN da célula de forma permanente ou temporária

### **Factores de risco**

Os vírus podem geralmente infectar mais do que um tipo de célula. Assim, quando os vectores virais são utilizados para transportar genes para o corpo, podem infectar células saudáveis, bem como células cancerígenas. Outro perigo é que o novo gene possa ser inserido no local errado no ADN, causando possivelmente mutações prejudiciais ao ADN ou mesmo cancro. Isto ocorreu em ensaios clínicos para pacientes com imunodeficiência combinada grave ligada ao X (X-SCID), nos quais as células estaminais hematopoiéticas foram transduzidas com um transgénico correctivo usando um retrovírus, e isto levou ao desenvolvimento de leucemia de células T em 4 de 20 pacientes.

Outras preocupações incluem a possibilidade de que os genes transferidos possam ser sobreexpressos, produzindo tanta proteína em falta que seja prejudicial; que o vector viral possa causar uma reacção imunitária; e que o vírus possa ser

transmitido do doente para outros indivíduos ou para o ambiente.

No entanto, este modo básico de introdução de genes mostra actualmente muitas promessas e os médicos e cientistas estão a trabalhar arduamente para corrigir quaisquer problemas potenciais que possam existir. Utilizam testes em animais e outras precauções para identificar e evitar estes riscos antes da realização de quaisquer ensaios clínicos em humanos.

### **Potenciais usos dos vectores virais**

Terapia genética para substituir um gene em falta ou inadequado. Cura de doenças expressando um reagente para , por exemplo, matar células cancerígenas. Imunização através da expressão de um antígeno de um agente patogénico. Expressão de genes em células cultivadas para estudo científico.

### **O Vector Ideal para a Transferência Genética**

- Elevada concentração de vírus, permitindo que muitas células sejam infectadas ou transduzidas

- Conveniência e reprodutibilidade da produção
- Capacidade de transduzir células divisoras e não divisoras
- Capacidade de se integrar num local específico no cromossoma anfitrião, ou de ser mantido com sucesso como episódio estável
- Uma unidade transcripcional que pode responder à manipulação dos seus elementos reguladores
- Capacidade de visar o tipo de célula desejada
- Nenhum componente que elicite uma resposta imunitária

## Capítulo 6

### Introdução de Genes nos Animais

**Tabela (10): Métodos e principais limitações do gene de inserção.**

<b>Métodos</b>	<b>Principais Limitações</b>
Fosfato de Calicium	
DEAE Dextran	
Eficiência	Baixo
Lipídios catiónicos, Lipossomas	
Injecções directas de ADN	Baixa Eficiência
Electroporação	
Expressão transitória	

**Tabela (11): Vectores virais com grandes limitações**

<b>Vectores virais</b>	<b>Principais Limitações</b>
Papova (SV40, Polioma)	Tamanho, gama de hospedeiros
Papiloma (BPV)	Tamanho, Integração, Transformação

Adeno associado (AAV)	Tamanho, produção
Adeno	Tamanho, antigenicidade, DNA episomal, toxicidade
Herpes/Vaccinia	Patogénico, citotóxico, lítico
Retrovírus	Incapacidade de infectar células pós-mitóticas
Lentiviruses	Segurança, integração

### **Doenças genéticas**

- 1- Fibrose Cística
- 2- Perturbações do sangue
- 3- Distrofia Muscular
- 4- Diabetes

### **Doenças Adquiridas**

- 1- Cancro
- 2- Cardiovascular
- 3- Perturbações neurológicas
- 4- Doença Infecciosa (SIDA)

**Tabela (12): Células-alvo com doenças por defeito e incidência.**

Disease	Defect	Incidence	Target Cells
Severe combined immunodeficiency (SCID)	Adenosine deaminase (ADA) in 25% of SCID patients	Rare	Bone-marrow cells or T lymphocytes
Hemophilia	A Factor VII deficiency	1:10,000 males	Liver, muscle, fibroblasts or bone marrow cells
	B Factor IX deficiency	1:30,000 males	
Familial hypercholesterolemia	Deficiency of low-density lipoprotein (LDL) receptor	1:1 million	Liver
Cystic fibrosis	Faulty transport of salt in lung epithelium	1:3000 Caucasians	Airways in the lungs
Hemoglobinopathias thalassemsias	(Structural) defects in the $\alpha$ or $\beta$ globin gene	1:600 in certain ethnic groups	
Gaucher's disease	Defect in the enzyme glucocerebrosidase	1:450 in Ashkenazi Jews	Bone marrow cells, macrophages
$\alpha_1$ antitrypsin deficiency inherited emphysema	Lack of $\alpha_1$ antitrypsin	1:3500	Lung or liver cells
Duchenne muscular dystrophy	Lack of dystrophin	1:3000 males	Muscle cells

**Tabela (13): Vectores baseados em vírus RNA.**

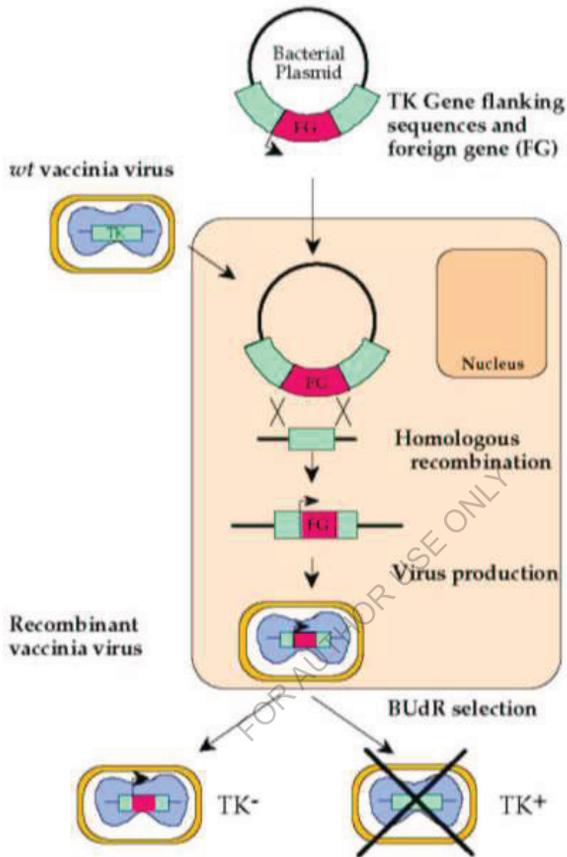
<b>Vectors Based on RNA Viruses</b>			
<b>Features</b>	<b>Retroviral</b>	<b>Lentiviral</b>	<b>Alphaviral</b>
Maximum Insert size	7-7.5 kb	7-7.5 kb	5 kb
Concentrations viral particles/ml	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>8</sup>	>10 <sup>9</sup>
Route of gene delivery	Ex vivo	Ex/In vivo	In vivo
Integration	Yes	Yes	No
Duration of expression in vivo	Shorter than theorized	Long	Short
Stability	Good	Not tested	Good
Ease of Preparation scale up	Pilot scale up up to 20-50 liters	Not known	Not known
Immunological problems	Few	Few	Unknown
Pre-existing host immunity	Unlikely	Unlikely, except in AIDS patients	No
Safety problems	Insertional mutagenesis?	Insertional mutagenesis?	Few

**Figura (14): Vectores baseados em ADN e vírus de ADN.**

Vectors Based on DNA and on DNA Viruses

Features	Adenoviruses	Adeno-associated viruses	Herpesviruses	Vaccinia virus	Naked DNA /Lipid DNA
Maximum Insert size	7.5 kb	4.5kb	~30kb	>25 kb	Unlimited size
Concentrations viral particles/ml	>10 <sup>10</sup>	>10 <sup>12</sup>	>10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup> -10 <sup>9</sup>	No limitation
Route of gene delivery	Ex/In vivo	Ex/In vivo	Ex vivo	Ex/In vivo	Ex/In vivo
Integration	No	Yes/No	No	No	very poor
Duration of expression in vivo	Short	Long	Short/ Long in CNS?	Short	Short
Stability	Good	Good	Unknown	Good	Very good
Ease of Preparation scale up	Easy to scale up	Difficult to purify, difficult to scale up	Not yet tried	Vaccine production facilities exist	Easy to scale up
Immunological problems	Extensive	Not known	Not known	Extensive	None
Pre-existing host immunity	Yes	Yes	Yes	Diminishing as unvaccinated population grows	No
Safety	Inflammatory response, toxicity	Inflammatory response, toxicity	Neurovirulence? Insertional mutagenesis	Disseminated vaccinia in immunocompromised hosts	None?

## Vector de Expressão Recombinante do Vírus da Vaccinia



**Figura (30):** Vector de expressão do vírus da Vaccinia Recombinante

Construção de um vírus vacinal infeccioso que expressa o gene HA do vírus da gripe.

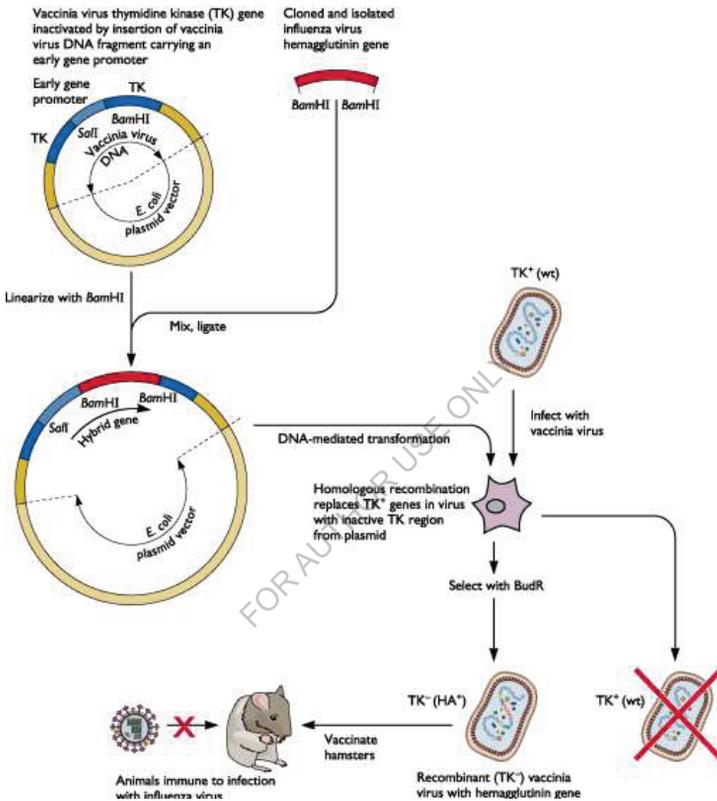
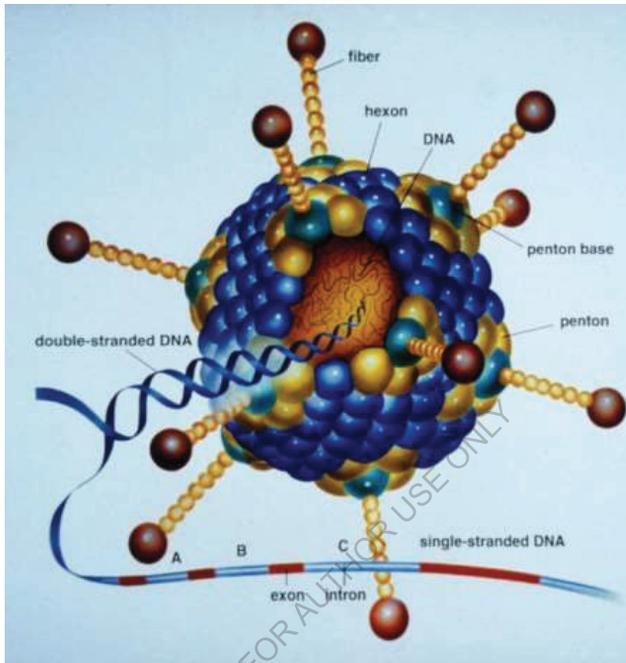


Figura (31): Construção de um vírus vacinal infeccioso que expressa o gene HA do vírus da gripe.

## Estrutura de partículas de Adenovírus



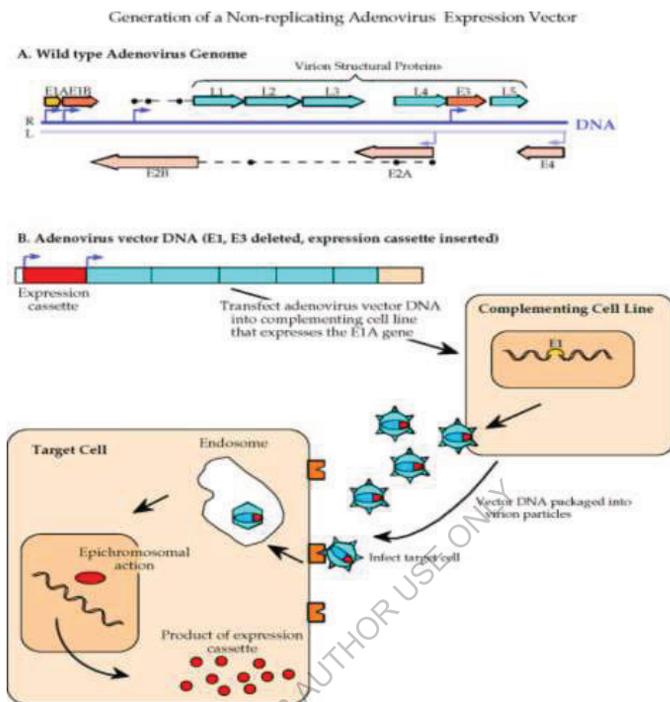
**Figura (32): Estrutura de partículas de adenovírus**

- Partícula não envelopada
- Contém ADN linear de fio duplo
- Não se integra no genoma do hospedeiro

- Replica como um elemento episomal no núcleo

### **Vectores adenovirais:**

Os vírus de ADN duplo encalhado, geralmente causam doenças respiratórias benignas; os serótipos 2 e 5 são utilizados como vectores. Podem infectar células divididas e não divididas, podem ser produzidas com títulos elevados. Vectores adenovírus deficientes de replicação podem ser gerados através da substituição do gene E1 ou E3, que é essencial para a replicação. Os vectores recombinantes são então replicados em células que expressam os produtos do gene E1 ou E3 e podem ser gerados em concentrações muito elevadas. As células infectadas com adenovírus recombinante podem expressar o gene terapêutico, mas como os genes essenciais para a replicação são eliminados, o vector não se pode replicar.



**Figura (33):** Vectores adenovirais.

### Vectores adenovirais - Limitações

Os vectores adenovirais podem infectar células in vivo, levando-as a exprimir níveis elevados do transgene. No entanto, a expressão dura pouco tempo (5-10 dias pós-infecção).

- A resposta imune é a razão por detrás da expressão a curto prazo.

- A reacção imune é potente, provocando tanto a resposta "celular" de matar células como a resposta "humoral" de produzir anticorpos.

- A resposta humoral resulta na geração de anticorpos às proteínas adenovirais e previne qualquer infecção subsequente se for dada uma segunda injeção do adenovírus recombinante.

### **Vectores adenovirais:**

#### **Vantagens:**

- 1- Título superior
- 2- Transdução eficiente de células não divisórias in vitro e in vivo.

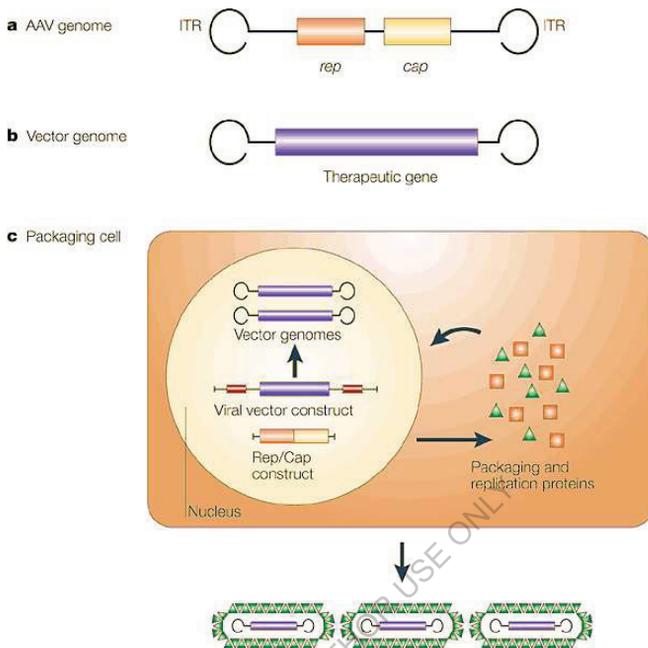
#### **Desvantagens:**

- 1- Toxicidade
- 2- Resposta imunológica
- 3- Exposição prévia

### **Vectores virais adeno-associados:**

- AAV é um vírus de ADN simples, não patogénico e isolado, dependente do vírus helper (geralmente adenovírus) para replicar.
- Tem dois genes (tampa e rep), ensanduichados entre repetições terminais invertidas que definem o início e o fim do vírus e contêm a sequência de embalagem.
- O gene cap codifica as proteínas do capsid viral e o produto do gene rep está envolvido na replicação e integração viral.
- Pode infectar uma variedade de tipos de células e, na presença do produto do gene rep, o ADN viral pode integrar-se preferencialmente no cromossoma humano 19.

### **Vectores AAV**



**Figura (33): Vetores AAV**

Para produzir um vector AAV, os genes *rep* e *cap* são substituídos por um transgene.

- O comprimento total da inserção não pode exceder 4,7 kb, o comprimento do genoma do tipo selvagem.
- A produção do vector recombinante requer que o *rep* e a *tampa* sejam fornecidos em trans juntamente com os produtos do gene *helper virus*.

- O método actual é a cotransfecção de dois plasmídeos, um para o vector e outro para a ré e a tampa em células infectadas com adenovírus.

- Este método é pesado, de baixo rendimento e propenso à contaminação com adenovírus e AAV de tipo selvagem.

- O interesse em vectores AAV deve-se à sua integração no genoma hospedeiro permitindo a expressão prolongada do gene

### **Vectores de vírus adeno-associados:**

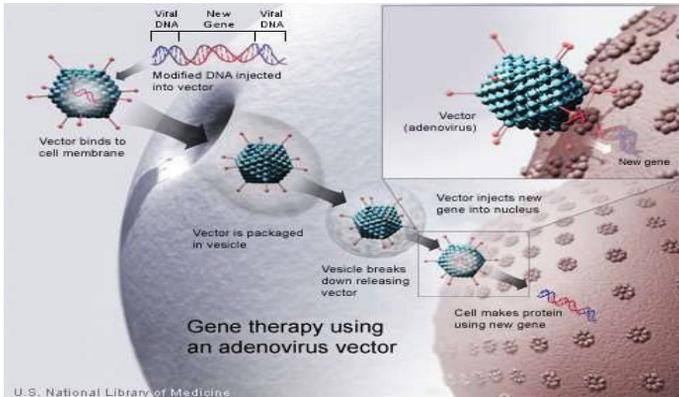
#### **Vantagens:**

- Todos os genes virais removidos
- Cofre
- Transdução de células não-dividentes
- Expressão estável

#### **Desvantagens:**

- Pequeno genoma limita o tamanho do ADN estrangeiro
- Produção intensiva de mão-de-obra

- Estado do genoma não totalmente elucidado



**Figura (34): Vantagens dos vetores do vírus Adeno-associado.**

Um novo gene é inserido num vector adenovírus, que é utilizado para introduzir o ADN modificado numa célula humana.

Se o tratamento for bem sucedido, o novo gene fará uma proteína funcional.

## Fibrose Cística

- A fibrose cística foi descrita pela primeira vez como uma doença no final da década de 1930 .
- Em 1988, a primeira mutação para a FC, foi no 7º cromossoma do genoma humano.
- A investigação encontrou subsequentemente mais de 1000 mutações diferentes que podem causar FC.

A FC é uma doença autossómica recessiva e é a mais grave. A fibrose cística deve ser um candidato ideal para a terapia genética, por quatro razões principais:

- 1- É um único defeito genético;
- 2- É uma condição recessiva, sendo os hetero zigotos fenotípicos. Usualmente normal (sugerindo que os efeitos da dosagem de genes não são críticos).
- 3- A patologia principal é no pulmão, que é acessível para tratamento.
- 4- É uma doença progressiva com um fenótipo praticamente normal à nascença, oferecendo uma janela terapêutica.

### **1993 vector utilizado: Adenovírus**

- Os primeiros ensaios clínicos de terapia genética da fibrose cística utilizaram um vector de adenovírus para fornecer às células o gene CFTR (cystic fibrosis trans

membrane regulator) a todo o comprimento. Doses adequadas de lipossoma do vector do adenovírus 1995.

- Os ensaios com a transferência do gene CFTR mediado por lipossoma começaram em 1995.
- Os vectores não virais têm o potencial de evitar alguns dos problemas críticos observados com os vectores virais, tais como a resposta imunitária, capacidade limitada de embalagem, e integração aleatória.
- Os lipossomas podem ser suavemente eficazes, mas a sua actividade não dura. Para esta abordagem de trabalho, os investigadores precisam de descobrir como melhorar a prestação, tornar os efeitos mais permanentes e reduzir os efeitos secundários adversos.

Até à data, apenas os sistemas baseados em lipossomas catiónicos foram testados em ensaios clínicos de fibrose cística

### **1998 vírus adeno-associado**

- Os ensaios que utilizaram o vírus adeno-associado para fornecer o gene CFTR começaram em 1998.
- Por ser seguro, o vírus adeno-associado - tal como previmos anteriormente - tem a promessa de ser uma boa

forma de fornecer o gene CFTR às células das vias aéreas dos doentes.

- Mas os investigadores precisam de aprender mais sobre como o vírus infecta as células, de modo a torná-lo um método de entrega eficaz.

a maior parte da experiência em termos de entrega vectorial

- A maior parte da experiência em termos de entrega vectorial aos pulmões tem envolvido a instilação de grandes volumes de fluido contendo vectores no pulmão através do nariz.
- No entanto:
  - I. este modo de entrega coloca problemas de segurança devido ao potencial de aspiração.

Além disso, a instilação de grandes volumes de fluido leva a uma maior exposição alveolar, como resultado do fluxo a granel para o parênquima pulmonar. Esta exposição é indesejável porque pode

### **Inalação oral de vectores aerossolizados**

No entanto, a aerossolização de um fluido é normalmente conseguida por meio de um nebulizador, e a maioria dos nebulizadores foram concebidos para gerar pequenas partículas. Isto porque a maioria dos nebulizadores foi desenvolvida para fornecer medicamentos para tratar pacientes com asma, e na asma a região alvo dos pulmões são frequentemente as vias respiratórias periféricas. As pequenas partículas melhoram o fornecimento às vias respiratórias periféricas e à região alveolar do pulmão, mas isto é novamente indesejável para o fornecimento do vector genético devido à possibilidade de induzir.

- Uma forma de evitar a deposição alveolar é gerar um aerossol que é composto principalmente de grandes gotas.
- A entrega do vector por meio de um dispositivo de pulverização que é inserido num broncoscópio pode ter outra vantagem sobre a nebulização.
- A investigação sugere que a pulverização do vector poderia fornecer um meio de visar as vias aéreas maiores e centrais, evitando a deposição nas vias aéreas menores e na região alveolar, o que é mais provável com nebulizadores que geram pequenas partículas de aerossol.

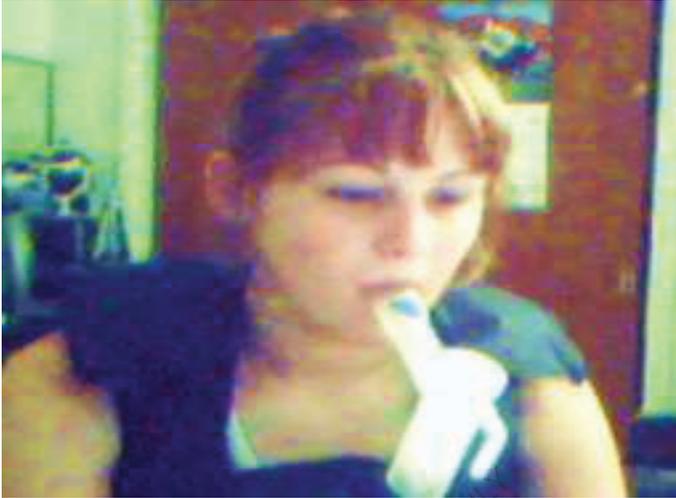
- Os resultados de estudos que utilizam a tecnologia de pulverização indicam que a entrega eficiente e direccionada de vectores genéticos aerossolizados aos pulmões poderá ser possível no futuro.

## **Tratamento actual**

### **O tratamento moderno inclui agora**

- A ingestão de enzimas de digestão, suplementos nutricionais,
- Percussão e drenagem postural dos pulmões, antibióticos melhorados
- Inalação de aerossóis contendo medicamentos.

O fármaco de terapia genética mais visível em desenvolvimento é inalado



**Figura (34): Tratamento para Fibrose Cística, utilizando um nebulizador e o colete de ThAIRapy.**

Um tratamento respiratório típico para a Fibrose Cística, utilizando um nebulizador e o colete de ThAIRapy.

### **Desafios**

- O objectivo do desenvolvimento de uma terapia genética eficaz para a doença pulmonar obstrutiva do pulmão levou à realização de vários marcos importantes no campo mais vasto da terapia genética. Estes incluem:

- As primeiras transferências *in vivo* de genes publicadas com adenovírus (Ad), e com vírus adeno-associado recombinante (rAAV).
- Os ensaios clínicos da primeira fase I que utilizam cada um destes sistemas vectoriais.
- A escolha do vector, modo de entrega às vias aéreas, translocação da informação genética, e expressão de CFTR normalizada em quantidades suficientes para corrigir o fenótipo CF nos pulmões dos pacientes com FC continuam a ser obstáculos no desenvolvimento da terapia genética para a FC.
- Algumas tentativas de terapia genética foram inicialmente bem sucedidas, mas falharam em produzir resultados aceitáveis a longo prazo.

## **Cancro do pulmão**

O cancro do pulmão é o cancro mais comum a nível mundial, tanto em termos de prevalência como de mortalidade. O fumo é um factor de risco altamente associado a este tipo de cancro (85-90 %) e a exposição ao fumo do tabaco no ambiente pode causar cancro em não fumadores.

Certos agentes como o arsénico, amianto, crómio, níquel e cloreto de vinilo encontrados no ambiente de trabalho aumentam o risco e também podem causar cancro.

## **Classificação**

### **Os 2 principais tipos de cancro do pulmão são:**

1- O cancro pulmonar de pequenas células constitui : 20% de todos estes cancros, as células multiplicam-se rapidamente e são capazes de se metatar em órgãos principais como gânglios linfáticos, ossos, cérebro, glândulas supra-renais e fígado. O tumor primário gera geralmente perto dos brônquios e expande-se para o centro dos pulmões. A principal causa deste tipo de cancro é o tabagismo.

2- Cancro pulmonar de células não pequenas : representa quase 80% de todo o cancro do pulmão. Difunde-se mais lentamente do que o tipo de células pequenas.

### **Os 3 subtipos são:**

- 1- Carcinoma de células escamosas ou epidermoides (30 %).
- 2- Adenocarcinoma (40 %).
- 3- Carcinoma indiferenciado com células grandes (10 %).

Alguns cancros começam nos bronquíolos e evoluem a partir daí ao longo de vários anos.

O tratamento genético do cancro do pulmão é difícil, pois é uma doença multifactorial. Assim, foram propostas várias alternativas para estimular o sistema imunitário, incluindo a transferência de células suicidas, inactivação de oncogenes, substituição de genes, repressores tumorais e a transferência de genes pró-apoptóticos.

Um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias anticancerosas é a *telomerase*, uma transcriptase inversa da ribonucleoproteína que prolonga os telómeros humanos através de uma actividade de transferência terminal. A telomerase é altamente activa na grande maioria dos tumores humanos, conhecidos desde 1994. Os seus genes essenciais são hTR e hTER.

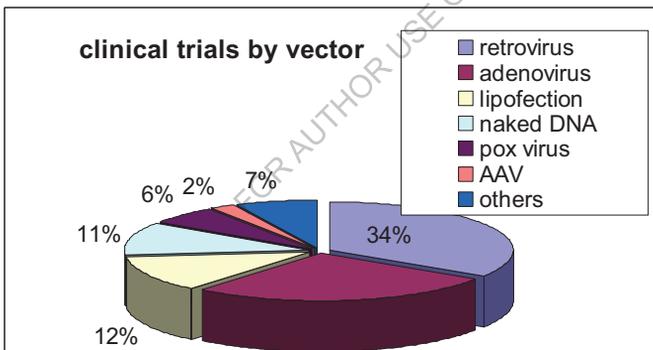
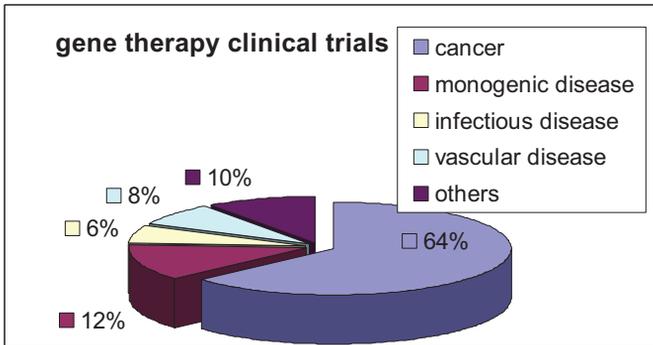
### **Transferência de genes no cancro do pulmão**

## **Técnica de Aerossóis**

A maioria das drogas e complexos de ADN foram administrados por via convencional: oral ou intravenosa. A biodistribuição de fármacos por meio destas estratégias é deseminada e a quantidade que é depositada no pulmão é pequena. Outro aspecto importante a considerar nestes tipos de sistemas é a toxicidade que é observada após a injeção. A capacidade de expressar transgenes no pulmão de uma forma selectiva pode facilitar o desenvolvimento da terapia génica para uma variedade de doenças humanas.

Além disso, os lipossomas formulados com 9-nitrocamptotecina (9NC-DLPC), que é um inibidor da topoisomerase 1 e inibe o crescimento de tumores induzidos subcutaneamente como a metástase do cancro do pulmão no modelo murino, observando um efeito sinérgico através da combinação da administração do gene p53 e PEI. Num outro estudo, foi encontrada sobreexpressão WT1 em 12/15 linhas celulares de cancro do pulmão. A proteína do WT1 é um alvo atractivo para a imunoterapia.

## Terapia génica no cancro



**Figura (35): Pistas clínicas por vector.**

**Novas terapias do cancro por terapia génica:**

## **1- Estimulação do sistema imunitário**

A regressão tumoral foi demonstrada em modelos animais que foi mediada pela administração de citocinas como as interleucinas (IL) -2, 4, 6, 7, 12, factor estimulante de colónias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF), factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) & IFN- $\gamma$ , no entanto a utilização em humanos foi limitada devido à toxicidade.

As estratégias baseadas em citocinas podem levar ao desenvolvimento de vacinas tumorais que incorporam geneticamente fibroblastos modificados ou células tumorais que segregam citocinas.

## **2- Transferência de genes assassinos**

Este tipo de terapia génica baseia-se na transdução de um gene capaz de converter um composto não tóxico num metabolito tóxico capaz de matar selectivamente células tumorais após a administração do pró-fármaco apropriado.

Os 2 genes mais utilizados para este tipo de terapia são: \*thymidine kinase of herpes simplex virus HSV-tk e o gene da citosina deaminase. A deaminase de citosina converte a 5-fluorocitosina num antimetabolito: 5-fluoroacyl citotóxico. HSV-tk converte o gancyclovir num metabolito trifosfato tóxico.

Uma transdução adenoviral em células cancerosas não pequenas com HSV-tk seguida pela administração de gancyclovir mata selectivamente as células tumorais.

### **3- Inibição de Oncogenes**

Este tipo de terapia é baseado na identificação e inibição dos genes críticos para a carcinogénese. Os oncogenes da família *ras* são alguns dos oncogenes mais comuns que são activados no cancro do pulmão e, portanto, são alvos deste tipo de terapia.

Em estudos pré-clínicos mediados por um plasmídeo com uma sequência antisense com *k-ras*, o mRNA é selectivamente bloqueado por mutação, e o crescimento tumoral é reduzido tanto in vivo como in vitro em modelos murinos.

### **4- Genes Supressores de tumores**

Outra estratégia de terapia genética baseada no trabalho com supressores tumorais genéticos, em contraste com os oncogenes, é com os 2 alelos de um gene supressor do tumor que devem ser eliminados ou inactivados através da indução do crescimento tumoral. Teoricamente, a substituição de apenas uma cópia do gene supressor do tumor em células com uma perda da função homozigótica

pode restaurar as formas de crescimento normal e de proliferação celular.

Um dos genes mais frequentemente mutado (50-70 % dos casos)

é o p53 que pode ser inativado por superexpressão do MdM-2.

5- Transferência de genes Pro -Apoptóticos  
As células com múltiplas alterações genéticas são geralmente eliminadas por apoptose. Para sobreviverem, dependem da sobreexpressão de moléculas anti-apoptóticas como bcl-2, bcl-xL ou sobrevivem. A regulação para baixo de tais proteínas pode reduzir o limiar apoptótico das células.

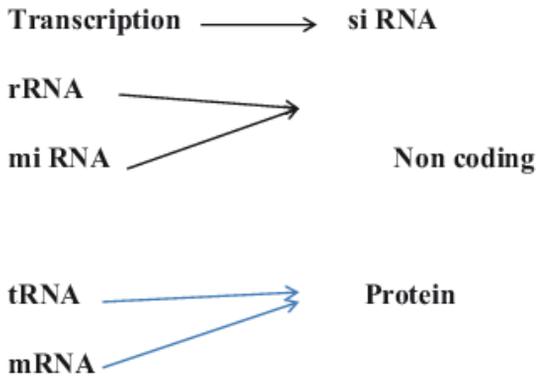
As 2 principais vias de sinalização apoptótica são:

1-A via mitocondrial

2-A via receptora da morte.

Células com cromatina condensada e fragmentada demonstram apoptose.

## **Produto de Gene**



### **Inibição específica da expressão genética**

Envolve o silenciamento de genes específicos como oncogenes activados, utilizando moléculas que degradam as transcrições de RNA.

As estratégias incluem

- 1- Terapia antissenso por siRNA (pequeno RNA interferente)  
Ribozymes.

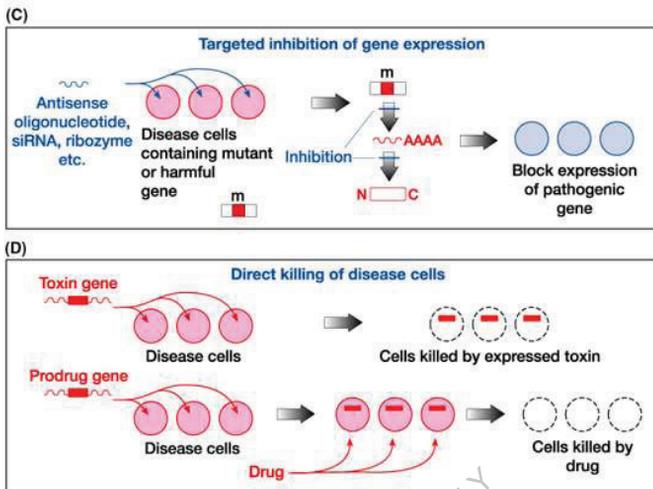
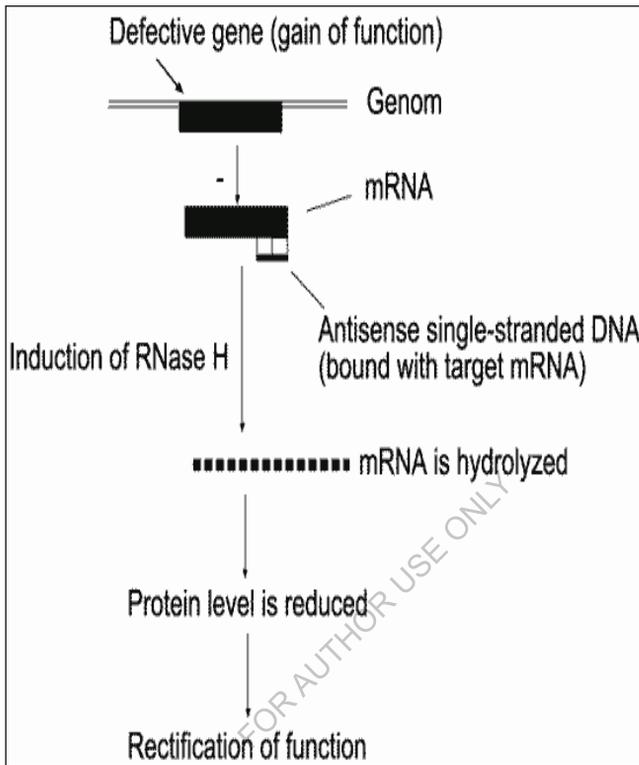


Figure 21-4 part 2 of 3 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)

### Figura (36): Morte directa de células da doença.

Terapia anti-senso de pequenos trechos de ssDNA sintético que visam as transcrições do mRNA de proteínas anormais, impedindo a sua tradução.



**Figura (37): Terapia génica no cancro**

## 2- terapia siRNA

Pequenos RNAs interferentes, pequenos trechos (21-23nt) de dsRNA sintético. Tem 3' overhangs de 2 nt. Incorpora no

RISC (complexo de silenciamento induzido pelo RNA). O mRNA alvo é clivado no meio.

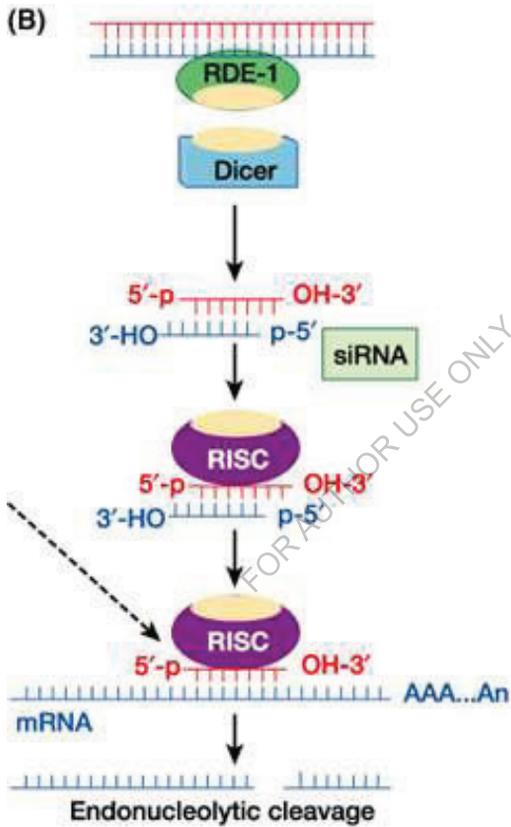


Figura (38): Terapia do siRNA.

## Morte celular direccionada

Toxicidade específica dos tecidos como resultado da terapia genética. Útil na terapia do cancro.

### Abordagem directa

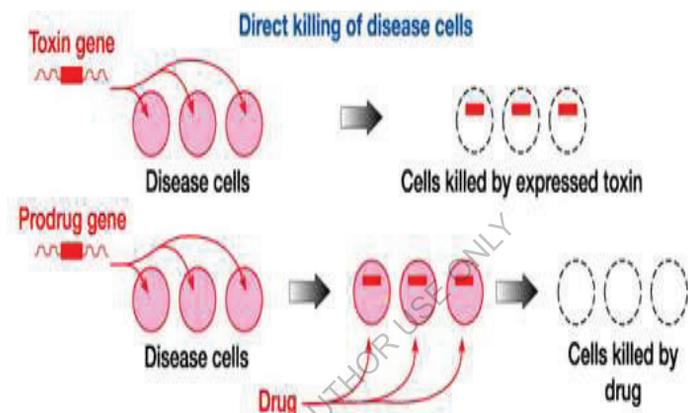
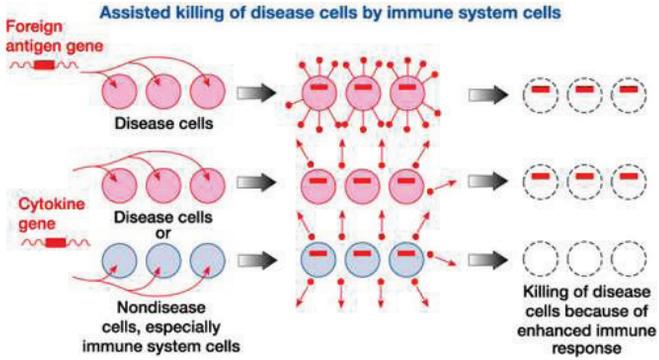


Figura (39): Abordagem directa da morte da célula alvo.

## Morte celular direccionada

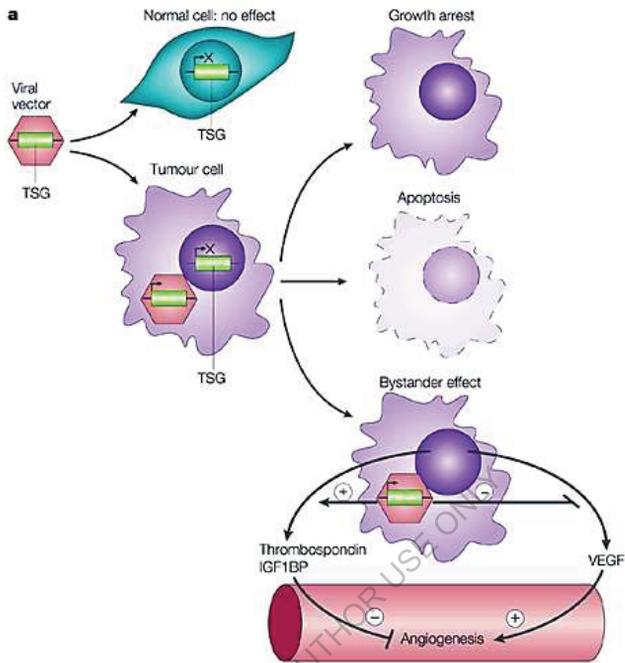
### Abordagem indirecta

Estimular uma resposta imunitária contra células seleccionadas ou eliminar o fornecimento de sangue.



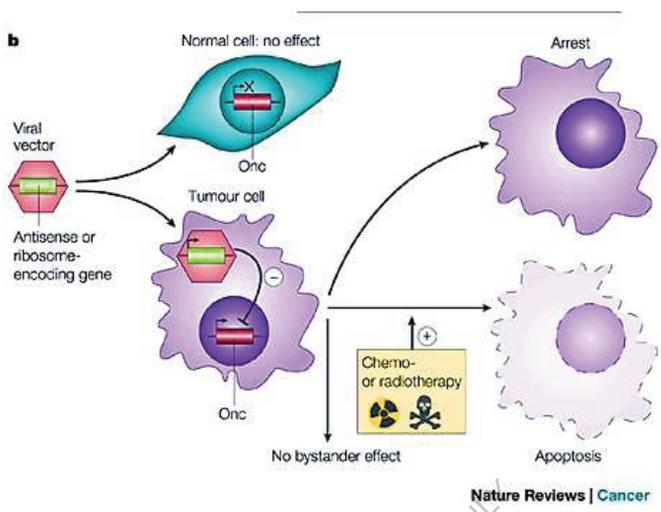
**Figura (40): Assisted killing of disease cells by immune system cells.**

**Fornecimento de genes supressores de tumores**



**Figura (41): Fornecimento de genes supressores de tumores**

**Entrega de agentes que bloqueiam a expressão oncogénica**



**Figura (42): Entrega de agentes que bloqueiam a expressão oncogénica.**

## Capítulo 7

### Aplicações da Terapia Genética ao Tratamento do Cancro

1- Diferentes estratégias de terapia genética têm sido empregadas para o cancro, tais como:

- Terapia genética pró-fármaco-activadora do suicídio.
- Terapia genética anti-angiogénica.
- Viroterapia oncológica .
- Modulação imunitária baseada na terapia genética.
- Correção/compensação de defeitos genéticos.
- Manipulação genética das vias apoptóticas e de invasão tumoral.
- Antisense.
- Estratégias de RNAi.

Os tipos de cancro que foram alvo de terapia genética incluem o cérebro, pulmão, mama, pâncreas, fígado, colorrectal, próstata, bexiga, cabeça, pescoço, pele, cancro ovariano e renal.

- ❑ Actualmente, dois produtos de terapia genética do cancro receberam a aprovação do mercado, ambos na China.
- ❑ Além disso, a estimulação do sistema imunitário do hospedeiro, utilizando abordagens terapêuticas genéticas, ganhou um vasto interesse pelos vectores e métodos mais comumente utilizados na terapia genética do cancro, obtidos em ensaios clínicos.

O cancro do pulmão é uma das neoplasias mais agressivas e fatais. Hoje em dia é possível diagnosticar cedo. Com estas novas ferramentas talvez a vida do paciente possa ser prolongada reduzindo o custo do tratamento.

Mais de 900 pacientes foram tratados por produtos de transferência genética através da substituição de genes defeituosos (p53, BRCA1, RB, p16) por um importante gene supressor de tumores, especialmente no cancro do pulmão de células não pequenas.

### **Grandes problemas que os cientistas devem ultrapassar:**

- Muitas razões para explicar a escassez de respostas clínicas às estratégias de vacinação com um único agente, incluindo:

a fraca antigenicidade das células tumorais . \*

- O desenvolvimento da tolerância através da desregulamentação do MHC.
- Costimulador.
- Tradução de sinal.  
e outras moléculas essenciais para a geração de respostas imunitárias fortes.

### **Grandes problemas que os cientistas devem ultrapassar:**

- Identificar formas mais eficientes de entregar os genes ao material genético dos pacientes.
- Desenvolver vectores que possam focar especificamente as células visadas.
- Assegurar que os vectores irão inserir com sucesso o desejado genes em cada uma destas células-alvo.
- Fornecer genes para uma localização precisa no ADN do paciente.
- Assegurar que os genes transplantados são precisamente controlados pelos sinais fisiológicos normais do corpo.

## **Grandes problemas que os cientistas devem ultrapassar:**

### **Transferência de genes**

- Muitos sistemas têm sido utilizados para a administração de genes no tratamento do cancro, tais como o uso de adenovírus e vírus associados, poxvírus, herpes simplex, mas todos eles podem provocar uma resposta imunológica contra o vector, da forma necessária para utilizar diferentes estirpes ou diferentes vias de administração.

### **Terapia genética do cancro usando genes supressores de tumores**

#### **Utilização da Terapia Genética no Tratamento do Cancro do Pulmão**

Neste ensaio clínico, o cientista utilizou a terapia genética em combinação com a radioterapia para que pudessem tratar o cancro do pulmão em 19 pacientes diferentes

Injecções de agulha Intratumoral de Ad-p53 nos dias 1, 18 e 32 do tratamento.

- tumores  $\geq 4$  cm onde injectado com 10 ml
- tumores  $< 4$  cm foram injectados com 3 ml

### **Terapia por radiação**

O sucesso da radioterapia é

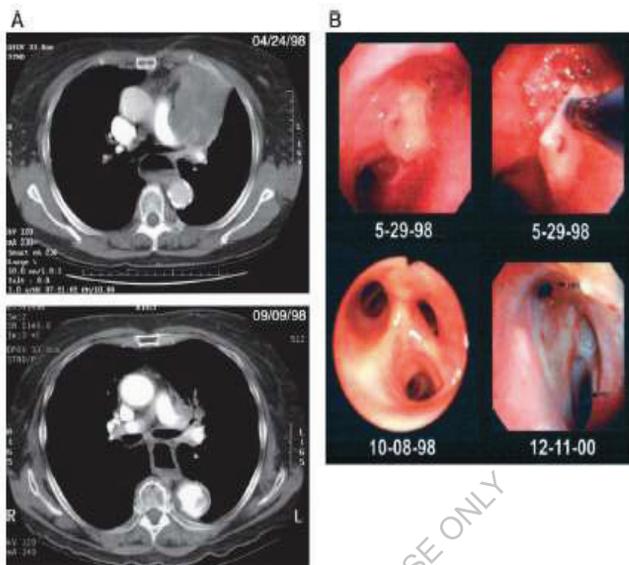
17/19 pacientes conseguiram passar por toda a terapia

resposta completa em 2 pacientes (11%)

resposta parcial em 4 pacientes (21%)

doença estável em 1 paciente (5%)

doença progressiva em 11 doentes (57%)



**Figura (43): Terapia por radiação**

**Os doentes mostraram que o cancro progrediu para fases piores. Porquê?**

**Grandes problemas que os cientistas têm de ultrapassar**

Identificar formas mais eficientes de entregar os genes ao material genético dos pacientes. Desenvolver vectores que possam focar especificamente as células visadas. Assegurar que os vectores irão inserir com sucesso os genes desejados em cada uma destas células alvo.

Entregar genes a uma localização precisa no ADN do paciente. Assegurar que os genes transplantados são controlados com precisão pelos sinais fisiológicos normais do corpo.

FOR AUTHOR USE ONLY

## Referências

- 1- Long Term Follow-Up After Administration of Human Gene Therapy Products; Guidance for Industry, Janeiro de 2020.
- 2- Kaji, Eugene H. (7 de Fevereiro de 2001). "Gene and Stem Cell Therapies". JAMA. **285** (5): 545–550. doi:10.1001/jama.285.5.545. ISSN 0098-7484. PMID 11176856.
- 3- Ermak G (2015). *Tecnologias Médicas Emergentes*. World Scientific. ISBN 978-981-4675-81-9.
- 4- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. (Agosto de 1990). "Gene transfer into humans immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction". *The New England Journal of Medicine*. **323** (9): 570–578. doi:10.1056/NEJM199008303230904. PMID 2381442.
- 5- Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Database Archived 31 July 2020 at the WaybackMáquina de . O *Journal of Gene Medicine*. Wiley (Junho 2016)
- 6- Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. (Maio de 2008). "Segurança e eficácia da transferência de genes para a amaurose congênita de Leber". *The New England Journal*

- of Medicine. **358** (21): 2240-2248. doi:10.1056/NEJMoa0802315. PMC 2829748. PMID 18441370.
- 7- MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, Cottrill CL, Tolmachova T, Seymour L, Clark KR, During MJ, Cremers FP, Black GC, Lotery AJ, Downes SM, Webster AR, Seabra MC (Março de 2014). "Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial". *Lanceta*. **383** (9923): 1129–1137. doi:10.1016/S0140-6736(13)62117-0. PMC 4171740. PMID 24439297.
- 8- Bak RO, Gomez-Ospina N, Porteus MH (Agosto de 2018). "Gene Editing on Center Stage". *Tendências em Genética*. **34** (8): 600611. doi:10.1016/j.tig.2018.05.004. PMID 29908711. S2CID 49269023.
- 9- Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. (Novembro de 2016). "CRISPR/Cas9  $\beta$ -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells". *Natureza*. **539** (7629): 384–389. Código Bibcode:2016Natur.539..384D. doi:10.1038/nature20134. PMC 5898607. PMID 27820943.
- 10- Gupta RM, Musunuru K (Outubro de 2014). "Expandindo o kit de ferramentas de edição genética":

- ZFNs, TALENs, e CRISPR-Cas9". *The Journal of Clinical Investigation*. **124** (10): 4154-61. doi:10.1172/JCI72992. PMC 4191047. PMID 25271723.
- 11-** Sanches-da-Silva GN, Medeiros LF, Lima FM (21 de Agosto de 2019). "O Uso Potencial do CasSistema . *International Journal of Genomics*. **2019**: 8458263. doi:10.1155/2019/8458263. PMC 6721108. PMID 31531340.
- 12-** Patente: US7824869B2
- 13-** Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH (Abril de 2006). "A expressão ectópica de um rodopsin do tipo microbiano restaura as respostas visuais em ratos com degeneração fotoreceptor". *Neurónio*. **50** (1): 23–33. doi:10.1016/j.neuron.2006.02.026. PMC 1459045. PMID 16600853.
- 14-** Zimmer C (16 de Setembro de 2013). "DNA Double Take". *The New York Times*. Arquivado a partir do original em 2 de Janeiro de 2022.
- 15-** Congresso dos EUA, Gabinete de Avaliação Tecnológica (Dezembro de 1984). *Terapia genética humana - Um artigo de fundo*. DIANE Publishing. ISBN 978-1-4289-2371-3.

- 16-** Sun M (Outubro de 1982). "Martin Cline perde o recurso sobre a subvenção do NIH". *Ciência*. **218** (4567):37. Bibcode:1982Sci...218...37S. doi:10.1126/science.7123214. PMID 7123214.
- 17-** Ibrahim M (14 de Julho de 2021). "A terapia genética restabelece a falta de dopamina em crianças com doenças cerebrais raras". *Ciência*. Recuperada a 18 de Julho de 2021.
- 18-** "O ensaio da terapia genética aponta para uma janela mais ampla para alterar o curso das doenças raras". *Stat*. 12 de Julho de 2021. Recuperado a 18 de Julho de 2021.
- 19-** Flotte, Terence R.; Cataltepe, Oguz; Puri, Ajit; Batista, Ana Rita; Moser, Richard; McKenna-Yasek, Diane; Douthwright, Catherine; Gernoux, Gwladys; Blackwood, Meghan; Mueller, Christian; Tai, Phillip W. L. (10 de Fevereiro de 2022). "Terapia genética AAV para a doença de Tay-Sachs". *Medicina da Natureza*. **28** (2): 251–259. doi:10.1038/s41591-021-01664-4. ISSN 1078-8956. PMID 35145305. S2CID 246748772.
- 20-** Sena-Esteves, Miguel (14 de Fevereiro de 2022). "Primeira terapia genética para a doença de Tay-Sachs administrada com sucesso a duas crianças". *A Conversa*. Recuperada a 7 de Março de 2022.

- 21-** "Os pais fazem uma terapia genética revolucionária para crianças com doença de Tay-Sachs". O Independente. 18 de Fevereiro de 2022. Recuperado a 7 de Março de 2022.
- 22-** "Upstaza": Pendente de decisão da CE". Agência Europeia de Medicamentos. 19 de Maio de 2022. Recuperado a 22 de Maio de 2022.
- 23-** "PTC Therapeutics Receives Positive CHMP Opinion for Upstaza for the Treatment of AADC Deficiency". PTC Therapeutics (Comunicado de imprensa). 20 de Maio de 2022. Recuperado a 22 de Maio de 2022.
- 24-** Chowdary, Pratima; Shapiro, Susan; Makris, Mike; Evans, Gillian; Boyce, Sara; Talks, Kate; Dolan, Gerard; Reiss, Ulrike; Phillips, Mark; Riddell, Anne; Peralta, Maria R. (21 de Julho de 2022). "Phase 1-2 Trial of AAVS3 Gene Therapy in Patients with Hemophilia B". *New England Journal of Medicine*. **387** (3): 237–247. doi:10.1056/NEJMoa2119913. ISSN 0028-4793. PMID 35857660. S2CID 250697905.
- 25-** "A nova terapia genética poderia reduzir o risco de hemorragia dos doentes hemofílicos". ScienceDaily. Recuperado a 3 de Agosto de 2022.

- 26-** "A terapia transformacional cura a hemofilia B". BBC News. 21 de Julho de 2022. Recuperado a 3 de Agosto de 2022.
- 27-** Mukherjee S. Mukherjee S. O gene: uma história íntima. Nova Iorque: Scribner; 2016. Genetic therapies: posthuman gene therapy.415 Chap. 34.
- 28-** 2. Friedmann T. Uma breve história da terapia genética. Nat Genet. 1992;2(2):93–98. Revisão.
- 29-** 3. Misra S. Terapia genética humana: uma breve visão geral da revolução genética. J Assoc Médicos Índia. 2013;61(2):127–133. Revisão.
- 30-** 4. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, et al. Edição Gene de CCR5 em células T CD4 autólogas de pessoas infectadas com VIH. N Engl J Med. 2014;370(10):901–910.
- 31-** 5. Terapia Linden R. Gene: o que é, o que não é e o que vai ser. Estud Av. 2010;24(70):31-69.
- 32-** 6. Ginter EK. Terapia genética de doenças hereditárias. Vopr Med Khim. 2000;46(3):265–278. Revisão. Russo.
- 33-** 7. Mathews QL, Curiel DT. Gene terapia: modificação genética da linha germinal humana - avaliando as questões científicas, sócio-éticas e religiosas. South Med J. 2007;100(1):98-100.

**34-** 8. Banco A. Terapia genética de células somáticas humanas. *Bioensaios*. 1996;18(12):999–1007. Revisão.

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

FOR AUTHOR USE ONLY

**More  
Books!**



yes  
**I want morebooks!**

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at  
**[www.morebooks.shop](http://www.morebooks.shop)**

Compre os seus livros mais rápido e diretamente na internet, em uma das livrarias on-line com o maior crescimento no mundo! Produção que protege o meio ambiente através das tecnologias de impressão sob demanda.

Compre os seus livros on-line em  
**[www.morebooks.shop](http://www.morebooks.shop)**

KS OmniScriptum Publishing  
Brivibas gatve 197  
LV-1039 Riga, Latvia  
Telefax: +371 686 20455

[info@omniscryptum.com](mailto:info@omniscryptum.com)  
[www.omniscryptum.com](http://www.omniscryptum.com)

OMNIScriptum



FOR AUTHOR USE ONLY