



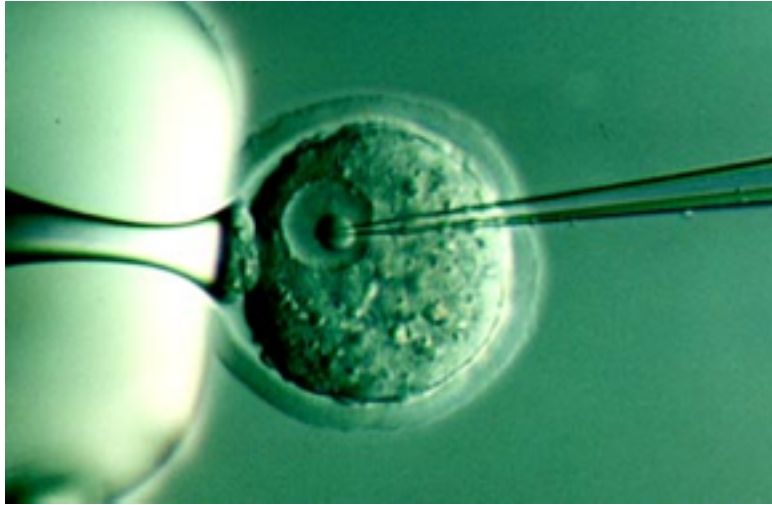
INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA

Aula - Terapia Gênica

Unidade Curricular: Cultura de Células Animais

Prof. Me. Leandro Parussolo

TERAPIA GENICA



O que não é?

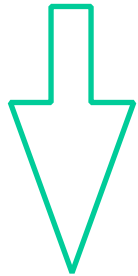
O que é?



O que será?

TERAPIA GENICA

- **1990 (EUA)** - Primeiro protocolo clínico de Terapia Gênica em humanos — **2 crianças portadoras de imunodeficiência combinada severa**



Ausência de linfócitos T e B (Causador por vários tipos de defeitos genéticos)

- **Sucesso** — explosão de estudos com perspectivas de uso terapêutico dos genes
- **Vários problemas encontrados em protocolos clínicos — longa jornada para aplicação no dia-a-dia de hospitais.**

TERAPIA GENICA



Histórico

- 1944 (Oswald T. Avery e cols) — mostrou a possibilidade de transferir genes de uma cepa bacteriana patogênica para outra não patogênica (identificando o DNA como portador da informação genética);
- 1953 (Watson & Crick) — Propõem estrutura de dupla hélice do DNA;
- 1969 (Jon Beckwith) — Isolamento do primeiro gene
- 1977 (Wigler & Axel) — Primeira correção genética em células cultivadas *in vitro*
- 1983 e 1984 — Propostos os primeiros sistemas de vetores derivados de 3 espécies virais
- Início do séc XXI - Sequenciamento do genoma humano

TERAPIA GENICA



Histórico

- Sequenciamento do genoma humano — *“Revelação do Livro da Vida”*
- *Identificação de aproa. 70.000 defeitos genéticos em seres humanos;*
- *Surge a capacidade de interferir na constituição genética de um indivíduo, por meio da **terapia gênica***

Resolução de problemas:

- **doenças genéticas herdadas dos pais;**
- **doenças adquiridas durante a vida (ex: câncer);**
- **doenças do coração;**
- **infecções virais.**

TERAPIA GENICA



Começa a nova era ... da Terapia Gênica.

Procedimento destinado a introduzir em um organismo, com o uso de técnicas de DNA recombinante, genes sadios (denominados “genes terapêuticos”) para substituir, manipular ou suplementar genes inativos ou disfuncionais.

TERAPIA GENICA

Modalidades de Terapia Gênica

- A ideia de usar DNA recombinante para corrigir o genoma foi inspirada em doenças causadas por mutação em 1 único gene (doenças monogênicas)

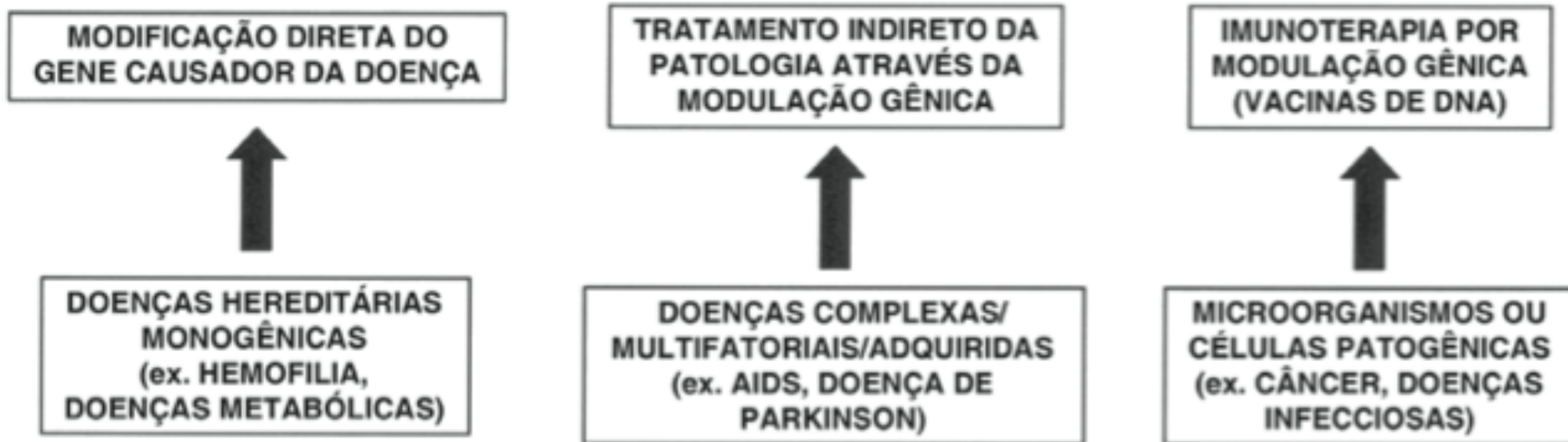


Figura 1 – Modalidades principais de terapia gênica.

TERAPIA GENICA



Modalidades de Terapia Gênica

Atualmente — Principais estratégias, são:

- aumentar a resistência celular,
- estimular sistemas de reparo ou regeneração,
- recompor características funcionais específicas de determinados sistemas orgânicos

... isso mediante modulação de genes não necessariamente associados a causa da doença.

Em tumores — o objetivo é a indução de morte celular seletiva em populações celulares proliferativas

TERAPIA GENICA



Modalidades de Terapia Gênica

Forma peculiar de terapia gênica — VACINA DE DNA

- Ao invés da utilização de uma proteína ou um vírus completo inativado, como se faz nas vacinas convencionais, o paciente recebe o gene que codifica uma proteína típica do agente agressor
- O organismo do paciente passará a fabricar permanentemente a proteína exógena, estimulando seu próprio sistema imune a atacar agentes agressores já instalados no organismo.

TERAPIA GENICA



Terapias Celulares e Terapias Gênicas

Dois conceitos distintos...

Terapias celulares — não envolvem necessariamente modificação genética;

Terapias gênicas — são baseadas na introdução ou modificação de genes. *E pode ser feito in vivo, sem o auxílio de células do paciente ou doadores.*

E ambas podem ser combinadas, ou seja, em certas circunstâncias podem-se utilizar células para introduzir o gene terapêutico.

TERAPIA GENICA



Vetores para Terapias Gênicas

Base da terapia gênica — introdução de genes em células;

A entrada de DNA puro através da membrana plasmática das cells eucarióticas é rara (o que é benéfico para o organismo, pois *dificulta alterações e transformações constantes*)

Assim, há a necessidade de um carreador que facilite a entrada do DNA nas cells vivas — “vetor”

3 classes de vetores — *plasmídeos, vetores virais e vetores nanoestruturados*

TERAPIA GENICA



Plasmídeos

- Sequências de DNA relativamente simples, mas eficazes para expressão de genes, nas quais é possível inserir um gene terapêutico por técnicas de DNA recombinante;
- Para vencer a resistências das cells à introdução de plasmídeos:
 - fragilizar a membrana celular (choque elétrico, substâncias químicas)
 - aplicar grande qtde de plasmídeos nas vizinhanças das cells - mesmo com baixa eficiência, cruzam a membrana das cells
- **TÉCNICAS LIMITADAS** (improvável introdução em órgãos de difícil acesso - ex: cérebro)

TERAPIA GENICA



Vetores Virais

- Vírus: micro-organismos especializados exatamente em invadir cells e nelas introduzir material genético;
- Parte do seu ciclo de vida consiste na liberação do ácido nucléico vital na cell hospedeira — Propriedade explorada para introduzir genes terapêuticos nas cells;
- Alguns vetores são derivados de Adenovírus (aprox 50 tipos distintos - ex: vírus que causam faringites ou conjuntivites).
- Outros são da família dos Retrovírus (ex: HTLV - causador de um tipo de leucemia e HIV)

TERAPIA GENICA

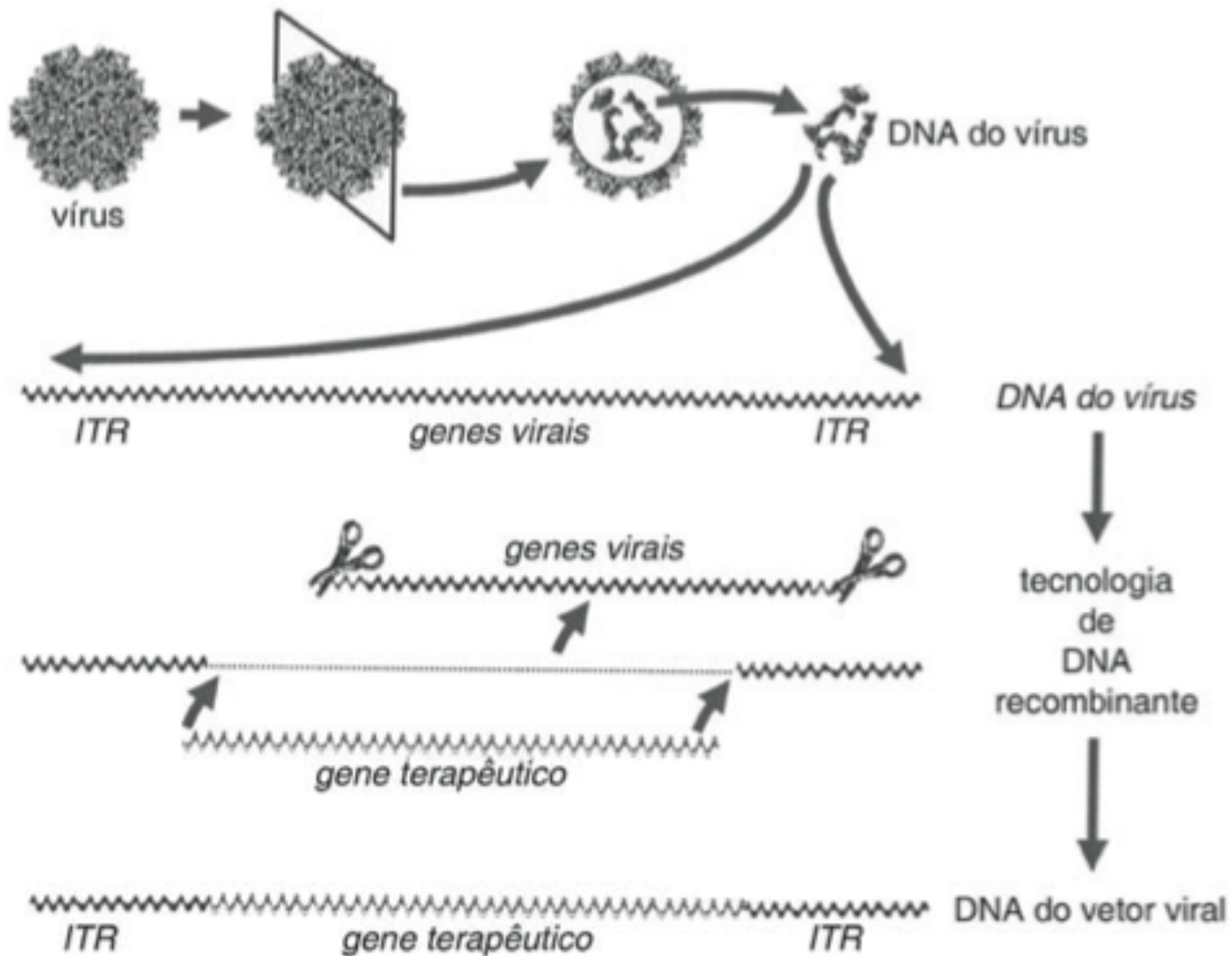


Vetores Virais

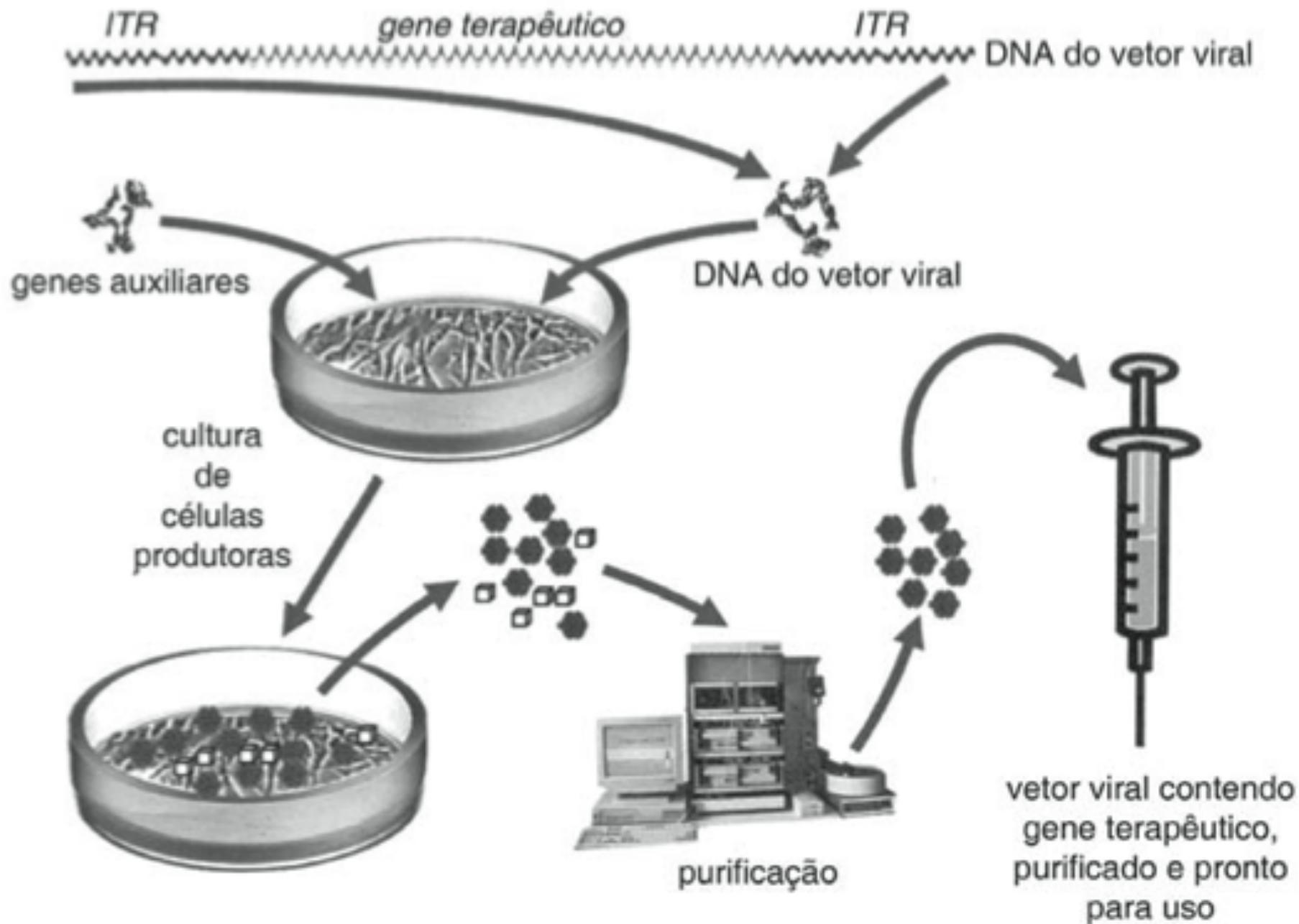
- Outros são derivados de vírus da família dos adenovírus-associados (**não patogênicos para seres humanos**);

Princípio da construção de vetores:

- **remover os genes envolvidos na patogenicidade e proliferação viral, mantendo apenas o necessário para a invasão das cells em multiplicação, seguida da inserção de um gene terapêutico no que resta de DNA vital**



Construção de um vetor viral para terapia gênica.



Produção em massa de vetores virais para terapia gênica.

TERAPIA GENICA



TERAPIA GÊNICA HOJE

- Procedimentos novos, em fase de experimentação;
- O conhecimento básico é oriundo de laboratórios de pesquisa por meio de testes em modelos experimentais e ensaios pré-clínicos;
- Nos últimos anos tem saído em torno de 30 artigos ou mais relacionados a terapia gênica POR DIA

TERAPIA GENICA



Vetores Nanoestruturados

Técnica que consiste em:

- Polímeros que formam redes que prendem um gene e soltam sua carga quando penetram nas cells;
- Vesículas de lipídeos contendo DNA, capazes de fundir com a membrana das cells, liberando seu conteúdo no interior destas.

TERAPIA GENICA



Aplicações da Terapia Gênica

Doenças Monogênicas:

Hemofilia

— procedimento: introduzir o gene sadio em cells do paciente, para que passem a produzir a proteína necessária.

— Estudos pré-clínicos em camundongos e cães demonstraram recuperação da atividade pró-coagulante;

— Estudo atual em 2 pacientes foi realizado utilizando vetores virais (vírus adenoassociado) - pacientes não apresentaram efeitos adversos sérios.*

TERAPIA GENICA



Aplicações da Terapia Gênica

Doenças Monogênicas:

Hemofilia

— procedimento: introduzir o gene sadio em cells do paciente, para que passem a produzir a proteína necessária.

— Estudos pré-clínicos em camundongos e cães demonstraram recuperação da atividade pró-coagulante;

— Estudo atual em 2 pacientes foi realizado utilizando vetores virais (vírus adenoassociado) - pacientes não apresentaram efeitos adversos sérios.

* *alta eficácia, porém na 6a semana desapareceram os efeitos terapêuticos - sistema imune contra proteínas do vetor fez com que as células fossem degeneradas*

TERAPIA GENICA



Aplicações da Terapia Gênica

Câncer:

- Foco da maioria dos ensaios clínicos de terapia gênica;
- Efeito desejável de qualquer tratamento contra câncer: *provocar morte seletiva das cells tumorais*
- Muitos fármacos atacam seletivamente cells que se multiplicam com rapidez e matam cells tumorais;
- Quimioterapia - efeitos adversos graves (devido a renovação contínua das células do sangue a partir de precursores da medula óssea)

TERAPIA GENICA

Aplicações da Terapia Gênica

Câncer:

— Para tratamento do câncer é desejável atingir apenas as cells tumorais;

— Técnicas de terapia gênica (tumores no SNC)



— Procedimento apelidado de “**Técnica de genes suicidas**” — consiste em introduzir nas cells tumorais um gene que não existe no genoma humano e codifica a enzima timidina cinase, proveniente do genoma do herpesvírus.

— A presença desse enzima em uma cell humana mata a cell na presença de uma droga chamada glanciclovir — timidina cinase se transforma em uma toxina que só afeta cells que se multiplicam

TERAPIA GENICA

Aplicações da Terapia Gênica

Câncer:

—“Técnica de genes suicidas” — ainda apresenta muitas controvérsias, porém apresentou resultados animadores;

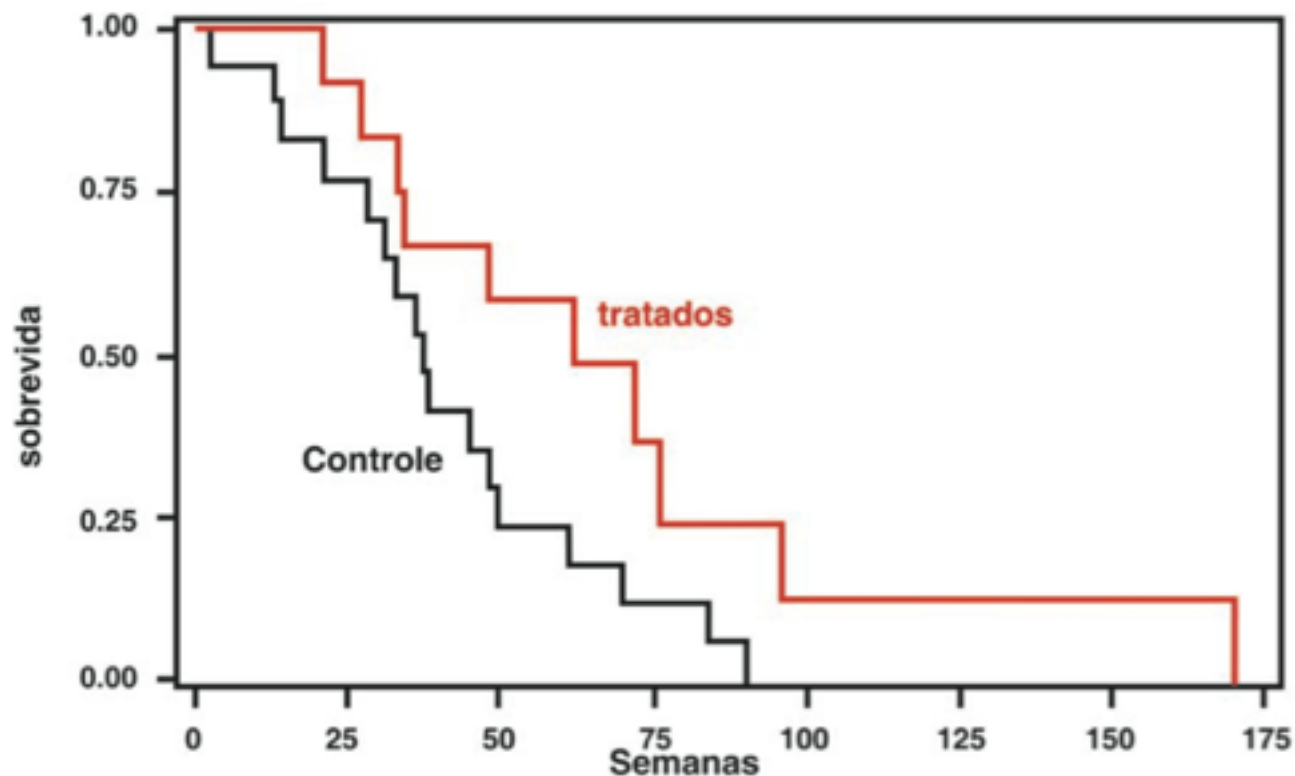


Figura 15 – Extensão da sobrevivência de pacientes de glioblastoma tratados por terapia gênica

Tabela 2 – Genes e estratégias para terapia gênica de tumores do sistema nervoso central

Estratégia	Exemplos	Funcionamento
Genes suicidas – indução de morte celular programada seletiva das células tumorais	HSV-TK (timidina cinase de herpesvírus)	Bloqueio da síntese do DNA quando na presença de uma pró-droga
Vírus oncolítico com replicação condicional	HSV-1 Onyx-015	Replicação somente em células em divisão ou tumorais
Indução de apoptose	FasL, TRAIL	Ativação da apoptose
Ligantes de alta afinidade	Receptor de transferrina	Endereçamento específico de drogas ao tumor
Estratégia corretiva	p53, Rb, p16, PTEN	Correção dos genes eliminados nos tumores
Terapia gênica imunitária	Interleucinas, interferons, TNF- α	Ativação da resposta imune antitumoral
Supressão da angiogênese	Angiostatina, endostatina	Bloqueio do crescimento de novos vasos sanguíneos
RNA de interferência	VEGF, EGFR, IGFR	Redução da expressão de oncogenes
Combinação com terapia celular	Células-tronco neurais ou mesenquimais como produtoras de vetores virais	Produção continuada e localizada dos vetores virais.

Fonte: Adaptada de Linden & Lenz (2007).

TERAPIA GENICA



Aplicações da Terapia Gênica

Doença de Parkinson:

- A classe das doenças neurodegenerativas = mais problemáticas para a medicina;
- A doença de Parkinson é um exemplo de doenças multifatoriais que podem ser tratadas com terapia gênica;
- Características da doença = perda excessiva de neurônios da substância negra do mesencéfalo com alterações funcionais em outros núcleos do tronco cerebral — **resulta em repleção de dopamina.**

TERAPIA GENICA



Aplicações da Terapia Gênica

Doença de Parkinson:

- Tratamento com medicamento L-Dopa (precursor da síntese de dopamina) é eficaz por um curto ou médio prazo;
- Terapias celulares de reposição de neurônios dopaminérgicos na substância negra poderão surtir efeito — **porém atualmente ainda são muito discretos**
- **Estratégias de terapia gênica incluem:**
 - produção local de dopamina;
 - oferta de fatores neurotróficos para reduzir a perda progressiva dos neurônios

TERAPIA GENICA



Aplicações da Terapia Gênica

Doença de Parkinson:

— Tratamento com medicamento L-Dopa (precursor da síntese de dopamina) é eficaz por um curto ou médio prazo;

— Terapias celulares de reposição de neurônios dopaminérgicos na substância negra poderão surtir efeito — **porém atualmente ainda são muito discretos**

— **Estratégias de terapia gênica incluem:**

- produção local de dopamina;

- oferta de fatores neurotróficos para reduzir a perda progressiva dos neurônios

TERAPIA GENICA



Balanço Risco-Benefício da Terapia Gênica

- Vários ensaios clínicos já foram finalizados, porém, a maioria destinou-se a testar a segurança na aplicação;
- Em certos casos - tratamento interrompido devido efeitos adversos;
- Em outros - tratamento seguro com efeitos adversos ocasionais, discretos e toleráveis;
- Em 1999 - Um paciente morreu logo após a injeção de um vetor vital durante um ensaio clínico.

TERAPIA GENICA



Balanco Risco-Benefício da Terapia Gênica

— Estudos atuais:

- (França e Inglaterra) Estudo de terapia gênica para síndrome da imunodeficiência combinada severa, com 20 crianças — 5 desenvolveram leucemia e 1 foi a óbito.

- Exames demonstraram que os vetores retrovirais utilizados produziram mutagênese insercional (mutações produzidas pela intromissão do vetor no DNA).

Balanco geral — desenvolvimento de terapias gênicas, bem como com células-tronco depende de muitos estudos para liberação de sua aplicabilidade.

TERAPIA GENICA



Balanco Risco-Benefício da Terapia Gênica

— Estudos atuais:

- (França e Inglaterra) Estudo de terapia gênica para síndrome da imunodeficiência combinada severa, com 20 crianças — 5 desenvolveram leucemia e 1 foi a óbito.

- Exames demonstraram que os vetores retrovirais utilizados produziram mutagênese insercional (mutações produzidas pela intromissão do vetor no DNA).

Balanco geral — desenvolvimento de terapias gênicas, bem como com células-tronco depende de muitos estudos para liberação de sua aplicabilidade.