CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS
UNIPAC BARBACENA - CURSO DE BIOMEDICINA

JOYCE CAMILA DOS SANTOS
MARIA CLARA SILVA
RAYANE MOREIRA DE OLIVEIRA

BIOLOGIA MOLECULAR: A EVOLUÇÃO A CAMINHO DA TERAPIA GÊNICA UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BARBACENA
2023

CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS
UNIPAC BARBACENA - CURSO DE BIOMEDICINA

JOYCE CAMILA DOS SANTOS
MARIA CLARA SILVA
RAYANE MOREIRA DE OLIVEIRA

BIOLOGIA MOLECULAR: A EVOLUÇÃO A CAMINHO DA TERAPIA GÊNICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.
Orientador: Hugo Silva Pires

BARBACENA
2023

CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS
UNIPAC BARBACENA - CURSO DE BIOMEDICINA

JOYCE CAMILA DOS SANTOS
MARIA CLARA SILVA
RAYANE MOREIRA DE OLIVEIRA

BIOLOGIA MOLECULAR: A EVOLUÇÃO A CAMINHO DA TERAPIA GÊNICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.
Orientador: Hugo Silva Pires

Entregue em: 11/07/2023

Prof. Me. Hugo Silva Pires (orientador)

Joyce Camila dos Santos

Maria Clara Silva

Rayane Moreira de Oliveira

BARBACENA
2023

BIOLOGIA MOLECULAR: A EVOLUÇÃO A CAMINHO DA TERAPIA GÊNICA

Joyce Camila dos Santos[1]
Maria Clara Silva[1]
Rayane Moreira de Oliveira[1]
Hugo Silva Pires[2]

1. Acadêmica do curso bacharelado em Biomedicina, Centro Universitário Presidente Antônio Carlos-UNIPAC, Barbacena-MG.
2. Professor orientador do curso de Biomedicina, Biólogo, Centro Universitário Presidente Antônio Carlos-UNIPAC, Barbacena-MG.

RESUMO

Terapia gênica é uma técnica de transferência de material genético para dentro das células de uma pessoa, com a finalidade de corrigir genes responsáveis por causar doenças. A introdução do gene acontece por meio de vetores que possuem a capacidade de transportar dentro de si, de forma específica, o material genético para a célula e\ ou tecido determinado e incorporar neles o gene modificado, vetores esses que podem ser, químicos, físicos, virais e não virais. O tratamento de doenças através da transferência de genes tinha como foco inicial as doenças hereditárias causadas por defeitos em um único gene, tais como fibrose cística, hemofilia e distrofia muscular. Porém hoje em dia a terapia gênica também é usada tanto no tratamento de doenças hereditárias como no tratamento de doenças adquiridas. A reflexão acerca da efetividade da técnica de terapia gênica no tratamento, cura, e prevenção de doenças, hoje em dia, tidas como incuráveis, é indispensável. A medicina de precisão é uma abordagem emergente para proporcionar a saúde e aprimoramento do modelo assistencial, que leva em consideração a variabilidade dos genes de cada pessoa. Nesta pesquisa foi realizada uma revisão narrativa da literatura científica onde descreve os conceitos da terapia gênica, como pode ser utilizada, seus métodos e técnicas, nas principais doenças que foram e ou que estão sendo tratadas com o uso da terapia gênica. As informações utilizadas foram pesquisadas no período dos últimos 22 anos e encontradas em artigos científicos e revistas científicas.

Palavras-chave: Transferência de genes. Terapia gênica. Vetores virais. Doenças genéticas.

ABSTRATC

Gene therapy is a technique of transferring genetic material into a person's cells for the purpose of correcting genes responsible for causing disease. The introduction of the gene happens through vectors that have the capacity to carry within themselves, in a specific way, the genetic material for the cell and/or determined tissue and incorporate the modified gene into them, vectors that can be, chemical, physical, viral and non-viral. Treatment of disease through gene transfer initially focused on inherited diseases caused by defects in a single gene, such as cystic fibrosis, hemophilia, and muscular dystrophy. But nowadays gene therapy is also used both in the treatment of hereditary diseases and in the treatment of acquired diseases. Reflection on the evolution of the gene therapy technique in the treatment, cure, and prevention of diseases, nowadays considered incurable, is essential. Precision medicine is an

emerging approach to promoting health and improving the care model, which considers the variability of each person's genes. In this research, a narrative review of the scientific literature was carried out, describing the concepts of gene therapy, how it can be used, its methods and techniques, in the main diseases that were and or are being treated with the use of gene therapy. The information used was researched over the last 22 years and found in scientific articles and scientific journals.

Keywords: Gene transfer. Gene therapy. Viral vector. Genetic diseases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....6
2 METODOLOGIA....8
3 DESENVOLVIMENTO....13
3.1 DNA, gene e mutação....13
3.2 Terapia Gênica....14
3.3 Vetores de transferência gênica e técnicas de introdução do DNA....18
3.3.1 Métodos físicos....20
3.3.2 Métodos químico....21
3.3.3 Vetores virais....21
3.3.4 Vetores não virais....23
3.4 Aplicações da terapia gênica....24
3.4.1 Doenças hereditárias....25
3.4.1.1 Fibrose cística....25
3.4.1.2 Hemofilia....26
3.4.1.3 Distrofia muscular....27
3.4.1.4 Imunodeficiência....27
3.4.2 Doenças adquiridas....28
3.4.2.1 Doenças cancerígenas....28
3.4.2.2 Doenças infecciosas....29
3.4.2.3 Doenças cardiovasculares....29
3.4.2.4 Doenças neurológicas....30
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS....33
REFERÊNCIAS....35

1 INTRODUÇÃO

A terapia gênica utiliza técnicas de DNA recombinante para substituir ou manipular genes com problemas. A adição de um gene saudável irá corrigir uma informação que está errônea ou ausente do DNA de um indivíduo, o que pode levar à cura da doença ou alívio dos seus sintomas. Atualmente, a terapia gênica encontra-se em total desenvolvimento[1]. A cada dia aparecem novos estudos e descobertas, representando uma oportunidade de cura ou tratamento para diversas doenças, como o câncer, diabetes, hemofilia e AIDS. A terapia genica ainda é considerada experimental e está sendo estudada em regulamentos clínicos para diversos tipos de doenças. A ampliação de métodos seguros e eficientes para o uso de transferência genica em células humanas é um dos pontos considerados mais importantes no uso da terapia gênica[2].

O primeiro protocolo clínico foi desenvolvido por French Anderson e sua equipe na França em 1990 para o tratamento de imunodeficiência grave causada por deficiência da enzima adenosina desaminase, essa equipe tinha inserido um gene sadio no organismo de uma menina doente e a criança melhorou após esse tratamento[1].

Na terapia gênica são empregadas duas estratégias, a *ex vivo* e a *in vivo*. A estratégia *ex vivo* consiste na retirada de células do tecido desejado que são cultivadas in vitro e modificadas geneticamente e, em seguida, devolvidas para o organismo. Já a técnica in vivo conta com a ajuda de vetores eficientes, podendo ser virais ou não virais, que são inseridos diretamente no organismo e carregam para o tecido alvo os genes a serem incorporados[2, 3]. O desenvolvimento de vetores seguros e eficientes que possam transportar material genético para as células é um dos maiores obstáculos para o sucesso da implementação desses tratamentos[3].

A Terapia genética é focada em doenças hereditárias monogênicas que são as doenças que afetam um único gene, geralmente detectadas no começo. Uma das técnicas mais utilizada consiste na tecnologia do DNA recombinante, o gene de interesse é inserido em um vetor específico que pode ser plasmídial, nanoestruturado ou viral, sendo considerado o viral o mais utilizado, devido apresentar uma maior eficiência em invadir células e com isso introduzir seu material genético[1, 2].

Atualmente, a terapia gênica ainda é considerada experimental, embora seja uma área predominante e existente em laboratórios de pesquisa, a maioria dos testes

são aplicados e conduzidos nos Estados Unidos, Europa e Austrália[1]. Embora várias aplicações do uso de terapia gênica sejam bem-sucedidas, o processo ainda é considerado muito complexo, e exige muitas técnicas que necessitam de novos desenvolvimentos e estudos aprofundados. As células específicas do corpo que necessitam de tratamento devem ser identificadas e acessadas. Um meio de distribuição eficaz das cópias do gene para as células deve estar disponível, e as doenças e suas estritas ligações genéticas necessitam ser completamente compreendidas e entendidas[2, 3].

A reflexão acerca da efetividade da técnica de terapia gênica no tratamento, cura, e prevenção de doenças, hoje em dia, tidas como incuráveis é indispensável. A medicina de precisão é uma abordagem emergente para a promoção da saúde e aprimoramento do modelo assistencial, que leva em consideração a variabilidade dos genes de cada pessoa. A partir dessa ferramenta, o médico é capaz de atuar por meio da predição (avaliação de riscos genéticos), prevenção (diagnóstico precoce por meio de rastreamento genético) e personalização (adequação do tratamento para o indivíduo)[4].

Neste contexto, o objetivo desta obra foi de fomentar estudos que podem acelerar a execução de técnicas a fim de elucidar problemas do cotidiano. Esta obra apontará as vantagens e o perspectivas da terapia gênica, bem como o grande impacto que ainda resultará em todos os aspectos da medicina.

2 METODOLOGIA

Nesta pesquisa foi realizada uma revisão narrativa da literatura científica onde descreve os conceitos da terapia gênica, como pode ser utilizada, seus métodos e técnicas, nas principais doenças que foram e ou que estão sendo tratadas com o uso da terapia gênica. As informações utilizadas foram pesquisadas no período dos últimos 25 anos e encontradas em artigos científicos e revistas científicas. A pesquisa dos artigos foi realizada por meio de consultas às bases de dados SciELO (*Scientific Eletronic Library OnLine*), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), Google Acadêmico, Revistas Cientificas e para essa busca foram utilizadas de forma aleatória os descritores “terapia gênica ”, “gene” e “gene terapia” em associação. Como critério de inclusão, foram selecionados apenas conteúdos nos idiomas de português e inglês.

Os resultados desta pesquisa foram apresentados por meio de revisão bibliográfica e os artigos selecionados estão listados no quadro 1.

QUADRO 1: Dados gerais dos artigos utilizados na revisão de literatura.

TÍTULO	AUTOR (ES)	ANO DE PUBLICAÇÃO	REVISTA, UNIVERSIDADE OU EDITORA
Terapia gênica: o que é o que não é e o que será.	Rafael Linden	2010	Estud. av
Terapia gênica.	Nance Beyer Nardi, Leonardo Augusto Karam Teixeira Eduardo Felipe Ávila da Silva	2002	Ciência & Saúde Coletiva
Terapia gênica e suas aplicações no tratamento de doenças.	Julio Cesar Castro de Paiva	2017	UNICEUB-Centro Universitário de Brasília
Terapia gênica: avanços, desafio e perspectivas.	Giulliana Augusta Rangel Gonçalves, Raquel de Melo Alves Paiva	2017	Einsten (São Paulo)
A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA.	Neusa Maria John Scheid, Nadir Ferrari, Demêtrio Delizoicov	2005	Ciência & Educação

Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma.	Marcos Antonio Rodrigues Martinez, Guilherme Francisco, Luciana Sanches Cabral, Itamar Romano Garcia Ruiz, Cyro Festa Neto	2006	Educação Médica Continuada. An Bras Dermatol
A importância das técnicas e análises de DNA.	Diego Hepp, Juliana Schmitt Nonohay	2015	Scientia Tec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS- Campos Porto Alegre
Desenvolvimento de um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado como fonte de sílica.	Cesar David Guerra Naranjo	2021	UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
Bases Moleculares de mutação gênica mecanismos e classificação.	Daniel Siquieroli Vilas Boas	2007	Revista Ceciliana
Mutações Genéticas: Percepção Docente/Discente e Práxis Em Escola Pública Na Planície Litorânea Do Piauí	Flávio Ibiapina Rodrigues	2020	UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
Vetores virais para uso em terapia gênica.	Barbara de Alencar Oliveira	2018	Revista Pan-amazonica de Saúde
Terapia gênica: métodos e aplicações.	José Miguel Costa Leme de Abreu Pereira	2015	Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde
Genes contra doenças, Terapia gênica: uma nova era na genética.	Rafael Linden	2008	Vieira e Lentz

Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças.	Cláudia D. da Silva, Úrsula da Silveira Matte, Roberto Giugliani	2001	Revista HCPA
FDA aprova primeira terapia gênica para atrofia muscular espinhal.	Úrsula Neves	2019	PEBMED
A utilização da técnica de CRISPR-CAS9 na Terapia Gênica.	Vinicius Alves Bernardes, Gabriele Machado Rodrigues, Mara Régina Lucena Cabral, Liberta Lamarta Favoritto Garcia Neres	2021	Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento
Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas.	Anor Sganzerla, Leo Pessini	2020	Saúde e Debate
Terapia Gênica.	Isabela Campanelli, Rachel Santini, Renata Mello	2016	FCAV – Unesp Jaboticabal
Terapia Gênica: Sucessos e Insucessos.	Sara Cristina Borsatto	2015	Universidade Federal do Paraná
Terapia Gênica	Nance Beyer Nardi	2004	Departamento de Genética Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Vetores virais para uso em terapia gênica.	Bárbara de Alencar Oliveira, Eliane dos Santos França, Viviane Guimarães Souza, Antônio Carlos Rosário Vallinoto, Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva	2018	Rev Pan-Amaz Saude
Tecnologia dos lipossomas e suas áreas de aplicação.	Daiane Moreira Mazzoneto	2011	Repinis Unifaema

Síntese, Propriedades e Aplicações de Dendrímeros.	Erich Christiansen Reinold	2011	Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Perspectivas da terapia gênica	Eugenia Costanzi Strauss, Bryan E. Strauss	2015	Rev Med
O acesso global e nacional ao tratamento da hemofilia: reflexões da bioética crítica sobre exclusão em saúde.	Mariana Sayago, Cláudio Lorenzo	2020	Interface
Terapia Gênica para Hemofilia A.	Margareth C.	2022	The New England Journal of Medicine
Distrofia muscular	Ministério da Saúde	2007	Biblioteca Virtual em Saúde (BVS)
Atrofia muscular espinhal: diagnóstico tratamento e perspectivas futuras.	Mariana T. C. Baioni, Celia R. Ambiel	2010	Jornal de Pediatria
É possível falar em cura?: cresce número de pacientes com câncer sob controle, mas riscos de retorno da doença não pode ser descartado.	Lilian Barros, Rodrigo Munhoz	2018	Rede câncer
Modelos Fracionários de Terapia Gênica Para o Tratamento do Câncer.	Robinson Tavoni	2019	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Uso de Sistemas Nanoestruturados no Tratamento do Câncer	Jony Marques Geraldo, Carlos Julio Monranõ Valencia	2023	Mário Penna Journal
Terapia Gênica aplicada ás Doenças Cardiovasculares	Renato A. K. Kalil, Roberto Tofani Sant’Anna	2004	Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul
Terapia Gênica *In Situ em* Condições Neurodegenerativas: Uma	Luiza da Silva Rodrigues	2021	Universidade Federal do rio Grande do Sul Instituto de

Revisão da Pesquisa Clínica			Ciências da Saúde

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 DNA, gene e mutação

O termo biologia molecular foi proposto por Warren Weaver, da Fundação Rockefeller, em um relatório publicado na revista *Science*, de 1938, para descrever como os fenômenos biológicos podem ser compreendidos fundamentalmente pelo conhecimento das estruturas das moléculas e das interações e das alterações destas. Pouco a pouco foi sendo utilizado para designar pesquisas relacionadas aos genes[5].

A biologia molecular é a área da ciência que envolve o estudo e a manipulação das moléculas que formam o material genético dos indivíduos. Desde o século XX, inúmeros avanços foram alcançados, como a identificação da estrutura da função do ácido desoxirribonucleico (DNA) e o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram o isolamento, a manipulação, a multiplicação e o sequenciamento do DNA[6].

O DNA e o RNA são moléculas biológicas relacionado com o armazenamento e transmissão das informações genéticas. Pertencem aos grupos de ácidos nucleicos formados por fosfato, um açúcar e uma base nitrogenada. No DNA o açúcar é uma desoxirribose e no RNA é uma ribose, ambos são classificados como pentoses[6]. Existem diferentes bases nitrogenadas no DNA e no RNA, sendo classificadas em purinas (formadas por dois anéis de átomos de carbono e nitrogênio), e as pirimidinas (formadas por um anel). No DNA podem ser as purinas, adenina, guanina ou as pirimidinas, timina ou citosina[5, 6]. No RNA os nucleotídeos podem conter adenina, guanina, citosina e, no lugar da timina, apresentam a uracila. Esses nucleotídeos se unem por ligação fosfodiester formando fitas longas. O DNA é formado por duas fitas dessas, ou seja, duas cadeias de polinucleotídeos e essas fitas se ligam quando os nucleotídeos formam pares com a outra fita por meio de ligações de hidrogênio entre adenina e guanina e entre as bases citosina e timina[6].

As moléculas de DNA se associam a proteínas para formar os cromossomos, que são longas estruturas celulares que contêm regiões que determinam a síntese de moléculas de RNA e das proteínas, denominados genes. Os genes são os responsáveis por determinarem as características hereditárias dos indivíduos e regularem, através da interação dos produtos dos genes com o ambiente; a morfologia e fisiologia[5-6].

O DNA constitui o genoma de todas as espécies biológicas, de bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais, como também, o homem. Com exceção dos vírus pois estes podem apresentar DNA ou RNA como material genético[6-7]. O DNA contém as informações genéticas necessárias para o seu o funcionamento e regulação do organismo. Desta forma, várias técnicas foram e estão desenvolvidas ao longo dos anos, em cima de modificações nos genes, sendo possível isolar o DNA dos demais constituintes celulares, realizar cortes para a manipulação da molécula, multiplicar a quantidade de cópias, separar as moléculas e determinar a sequência de nucleotídeos do DNA de qualquer organismo. Essas modificações genéticas são chamadas de mutações[7, 8].

As mutações podem ser definidas como qualquer alteração no material genético de um organismo. Essa alteração pode ocasionar uma mudança correspondente no fenótipo do indivíduo. As mutações podem ocorrer de forma espontânea ou de forma induzida. De forma espontânea, ocorre devido a erros na replicação do DNA. E de forma induzida, quando o organismo é exposto a um agente mutagênico como radicais livres, radiação ou vírus[9, 10]. É caracterizada por alterações no código de bases nitrogenadas do DNA, que originam novas versões dos genes produzindo novas características nos portadores da mutação. Na mutação gênica pode ocorrer substituição, eliminação ou inserção de uma ou várias bases na cadeia de DNA. Pode, ainda, ser do tipo silencioso, quando a substituição de um determinado nucleotídeo do DNA não provoca alterações nos aminoácidos sintetizados[9,10].

3.2 Terapia Gênica

Terapia gênica é uma técnica de transferência de material genético para dentro das células de uma pessoa, com a finalidade de corrigir genes responsáveis por causar doenças[3.]

Os genes influenciam praticamente todas as doenças humanas, codificam proteínas, que possuem diversas funções como enzimas e outras moléculas complexas, responsáveis por toda a complexidade que constitui um ser vivo. A ausência ou alteração de um dos genes pode ser fatal ou comprometer o normal funcionamento do organismo de um indivíduo, gerando graves consequências para a sua integridade fisiológica. Essas anormalidades podem ser adquiridas ou, herdadas[2]. O conhecimento dos genes responsáveis por características normais ou patológicas

admite a aplicação da medicina genômica, que irá modificar os procedimentos médicos no diagnóstico e tratamento de várias doenças e onde se inclui a terapia gênica que se tornou uma opção muito viável para “corrigir”, de cera forma esses problemas. Primeiramente a terapia gênica visava essa substituição de um gene defeituoso por um gene normal, porém a remoção de um gene é difícil e desnecessária na maioria das vezes, logo o melhor a se fazer é introduzir o gene de interesse que deve ser, então assim, totalmente conhecido[1, 2].

O gene de interesse (transgene) é transportado por um vetor e está contido em uma molécula de DNA ou RNA que carrega ainda outros elementos genéticos importantes para sua manutenção e expressão. Para isso, os genes funcionais têm que ser identificados numa biblioteca de DNA genômica ou de DNA, isolados e clonados[2]. Em seguida, o gene desejado é introduzido num vetor específico para que ocorra o transporte até à célula de interesse. O local onde irá ocorrer a transferência genética, o tecido alvo, e a forma dessa transferência *in vivo* ou *ex vivo* vão ser determinantes na escolha do vetor e do método mais adequado[2]. Existem diversos mecanismos utilizados na terapia genética, como uso de vetores virais, não virais, métodos físicos, como por exemplo, microinjeção e eletoporação e métodos químicos, que utilizam características polarizadas do DNA e das membranas celulares[11.]

No final dos anos 60, houve os primeiros estudos que mencionavam o uso de ácido desoxirribonucleico (DNA) externo para corrigir sequências genéticas danificadas ou ausentes, que são cruciais para o funcionamento adequado do organismo. Esses pesquisadores estavam estabelecendo as bases para o desenvolvimento da terapia genética. Em um artigo publicado em 1972 na revista Science, Friedman e Roblin propuseram a possibilidade de usar DNA externo como um medicamento para tratar várias doenças hereditárias no futuro. Desde então, houve uma série de estudos e em 1990, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o primeiro ensaio clínico para tratar uma imunodeficiência recessiva rara chamada deficiência de adenosina desaminase (ADA). Essa doença é caracterizada pela falta ou alteração de um único gene responsável pela síntese da enzima (ADA). A equipe do Dr. Anderson usou um vetor retroviral com uma cópia funcional do gene para infectar células em cultura[10, 11].

Esse retrovírus forneceu uma cópia funcional do gene às células. Esse ensaio clínico permitiu que o paciente tivesse uma vida relativamente normal e gerou um grande entusiasmo que estabeleceu a terapia genética como uma promissora terapia

para o tratamento de várias patologias. Vários ensaios clínicos foram realizados com resultados promissores, incluindo o tratamento de leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia linfocítica aguda (ALL), mieloma múltiplo, hemofilia e Lebers Congenital Aumorosis (LCA), entre outras doenças[12].

A terapia gênica é uma técnica médica relativamente nova, o primeiro caso de terapia genética em um paciente com deficiência imunológica combinada grave (SCID) foi realizado em 1990 por um grupo de pesquisadores liderado pelo Dr. R. Michael Blaese no National Institutes of Health (NIH), nos Estados Unidos[1]. O artigo descreveu o tratamento de dois pacientes com SCID causada por uma deficiência de adenosina desaminase (ADA), uma enzima crucial para o funcionamento do sistema imunológico. Os pesquisadores usaram um vírus para transferir o gene normal da ADA para as células do sistema imunológico dos pacientes. Os médicos removeram células de medula óssea da menina, chamada Ashanti de quatro anos, adicionaram um gene normal de ADA e reintroduziram as células modificadas em seu corpo[1,2]. Embora a menina tenha sido curada da doença, a terapia genética ainda não estava pronta para uso generalizado.

Sendo assim, desde então houve muitos avanços nessa técnica. Uma das abordagens mais promissoras é a edição de genes, que permite que os cientistas modifiquem o DNA de maneira muito precisa, removendo genes defeituosos e adicionando genes saudáveis. Vários ensaios clínicos de terapia genética com resultados promissores foram realizados mundialmente por diversas equipes, como os tratamentos de doenças, como fibrose cística, hemofilia, imunodeficiências, doenças cancerígenas, doenças infecciosas, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas[13, 14]. No Quadro 2 podemos ver os protocolos usados em diversos países até 2013. Em 2020, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o primeiro tratamento de terapia genética para a atrofia muscular espinhal, uma doença neuromuscular rara e debilitante que afeta bebês e crianças pequenas. O tratamento envolve a inserção de uma cópia normal do gene SMN1 em células nervosas, impedindo a degeneração dos músculos[15].

A edição de genes, atualmente, acontece, principalmente, a partir da utilização do sistema CRISPR-Cas9 devido a sua eficácia, facilidade e rapidez. O uso desse sistema de se deu após estudos em bactérias e suas defesas contra bacteriófagos onde a enzima Cas9, que é responsável por clivar o DNA, recebe ordens de uma coleção de sequências de DNA chamadas CRISPR para, juntamente com um RNA

guia, formar um complexo e ir até ao sítio exato realizar a edição[16]. Mesmo tendo sido descoberto nos anos 80 somente a partir de 2012, quando as pesquisadoras Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier esclareceram o uso do mecanismo e sugeriram que poderia ser usado para edição de genomas humanos, sendo assim, CRISPR-Cas9 se tornou a ferramenta mais utilizada para edição de genes em praticamente quase todos os laboratórios de biologia molecular do mundo. No tratamento do HIV, por exemplo, já é possível afirmar que a utilização da técnica diminui a carga viral até à eliminação do vírus latente. No tratamento contra o câncer, a CRISPR-Cas9 promove uma tecnologia eficaz para dissecar mecanismos de tumor gênese e identificar alvos para o desenvolvimento de medicamentos. Até em tratamentos de Diabetes Mellitus tipo I já se preve futuros avanços no tratamento usando a CRISPR-Cas9. Os estudos sobre a utilização da CRISPR-Cas9, cresce a cada ano, aumentando a esperança para o futuro da medicina. A terapia genica juntamente com sistema da CRISPR-Cas9 e a evolução da tecnologia, podem transformar o futuro do tratamento de diversas patologias[16].

No Brasil, a terapia gênica ainda é uma área em desenvolvimento e há poucos tratamentos disponíveis. Atualmente, é utilizada, principalmente em estudos clínicos e experimentais para avaliar sua eficácia e segurança em diferentes condições médicas. Alguns dos ensaios clínicos em andamento no país incluem o uso da terapia genética para tratar doenças raras, como a atrofia muscular espinhal, a mucopolissacaridose e a hemofilia[18]. Além disso, é utilizada, também em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de novos tratamentos. Instituições de pesquisa e empresas farmacêuticas no Brasil estão trabalhando em colaboração com instituições estrangeiras para desenvolver novas terapias genéticas para tratar doenças como o câncer, a doença de *Parkinson* e a doença de *Alzheimer*[6].

Apesar do progresso significativo na pesquisa e desenvolvimento da terapia genética no Brasil, ainda há muitos desafios a serem superados antes que esses tratamentos se tornem disponíveis para o público em geral. Esses desafios incluem a necessidade de financiamento adicional, regulação mais clara e acesso a tecnologias avançadas de produção de vetores virais e terapias celulares. A realização desses ensaios clínicos de terapia gênica depende de aprovação prévia por comitês de ética locais e nacionais, como a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) no Brasil ou a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos[1].

QUADRO 2: Protocolos de terapia gênica

Doença	Objetivo	Células-alvo	Modo de liberação	Países com o protocolo
Deficiência de adenosina deaminase	Substituição da deficiência de adenosina deaminase	Sangue	Retrovírus	Itália, Holanda e Estados Unidos
Deficiência de α 1-antitripsina	Substituição de α 1-antitripsina	Epitélio respiratório	Lipossoma	Estados Unidos
AIDS	Inativação do antígeno de apresentação do HIV	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Câncer	Aprimoramento da função imune	Sangue, medula e tumor	Retrovírus, lipossoma, eletroporação e transferência mediada por células	Áustria, China, França, Alemanha, Itália, Holanda e Estados Unidos
Câncer	Remoção tumoral	Tumor	Retrovírus, DNA não complexado, transferência mediada por células	Estados Unidos
Câncer	Quimioproteção	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Câncer	Marcação de células-tronco	Sangue, medula e tumor	Retrovírus	Canadá, França, Suécia e Estados Unidos
Fibrose cística	Substituição enzimática	Epitélio respiratório	Adenovírus e lipossoma	Inglaterra e Estados Unidos
Hipercolesterolemia familiar	Substituição de receptores lipoprotéticos de baixa densidade	Fígado	Retrovírus	Estados Unidos
Anemia de Fanconi	Liberação do gene de complemento C	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Doença de Gaucher	Substituição da glucocerebrosidase	Sangue e medula	Retrovírus	Estados Unidos
Hemofilia B	Substituição do fator IX	Fibroblastos da pele	Retrovírus	China
Artrite reumatoide	Liberação de citocina	Membrana sinovial	Retrovírus	Estados Unidos

Fonte: Adaptado de Misr. S Human, 2013.

3.3 Vetores de transferência gênica e técnicas de introdução do DNA

Vetores são os agentes usados para a transferências do gene modificado, ou seja, o meio de introdução do gene terapêutico para dentro da célula. A transferência gênica se trata de procedimentos que visam à entrada de algum material genético (na forma de DNA, RNA e oligonucleotídeos) em células desejadas[11]. Os vetores possuem a capacidade de transportar dentro de si, de forma específica, o material genético para a célula e\ ou tecido determinado e incorporar neles o gene modificado. Esses vetores podem ser virais e não virais[3].

São diversos os tipos de vetores utilizados em terapias gênicas, visto que dentre eles ainda não existe um que seja “o ideal”. Para um vetor ser ideal ele deve possuir algumas características, como a capacidade de acomodar um tamanho ilimitado do transgene, baixa imunogenicidade e citotoxicidade, direcionamento específico de células e tecidos, gerar uma expressão estável do transgene, baixo custo, como também fácil manipulação e produção. No entanto, dentre as alternativas disponíveis podemos escolher aquele que melhor se adequa às características terapêuticas que desejamos[19].

A transferência de genes pode ser realizada através de duas vias:

I. ***Ex vivo:*** extração das células alvo do paciente para introduzir do gene ou sequência de interesse, logo após transplantando as células geneticamente alteradas para o indivíduo. A vantagem deste método é possibilidade de fazer uma triagem antes do transplante das células, permitindo então, que apenas as células com as alterações desejadas se repliquem e sejam transplantadas[12].

II. ***In vivo:*** administração direta do transgene, ou sequência modificada do DNA, de forma terapêutica dentro do organismo do paciente com a ajuda por exemplo, vetores. Recomenda quando se pretende inserir o gene ou sequência terapêutica numa zona extensa ou quando o tecido não é facilmente acessível[11-12].

Primeiramente, é importante estabelecer se é mais adequado introduzir o gene diretamente no organismo (*in vivo*) ou, retirar células do indivíduo, modificar e depois reintroduzidir *(ex vivo*). Os métodos de introdução consistem, normalmente, em três: podem ser físicas (o transgene é introduzido de forma mecânica nas células.), químicas (o vetor é alguma substância de origem química) e biológicas (usando organismos que possuem a capacidade de transferir seu material genético, como vírus ou algumas bactérias). A escolha do método a ser aplicada vai de acordo com a patologia, a célula ou tecido-alvo, o tamanho e tipo de transgene a ser expresso e o tempo. Os métodos físicos e químicos não são muito eficientes em processos de transferência, principalmente se comparados aos métodos virais, mas em compensação possuem baixa toxicidade e imunogenicidade1[2]. Como podemos ver no Quadro 3, os métodos mais usados, atualmente, possuem seus pós e contras.

QUADRO 3: Comparação entre os principais sistemas de transferência empregados em terapia genica.

Métodos de transferência gênica	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Integra-se ao genoma da célula hospedeira, resultado em expressão gênica estável	Infecta apenas células em divisão, integração ao acaso pode ocasionar mutações prejudiciais
Adenovírus	Contém >30 kb de DNA não viral, infecta também células quiescentes	Não integra ao genoma da célula alvo, expressão da célula alvo, expressão gênica menos estável
Vírus adenoassociados	Não contém genes virais, não são patogênicos, não induzem reações imunes	Transportam apenas genes de pequeno tamanho, difíceis de serem obtidos em grandes quantidades
Lipossomas	Não patogênicos, não induzem reações imunes, capazes de transportar genes de grande tamanho	Baixa eficiência de transfecção, baixas taxas de integração estável
Biobalística	Semelhante aos lipossomos, boas perspectivas para vacinas	Ação irritada a tecidos periféricos, baixas taxas de integração estável

Fonte: Sociedade Ibero-americana de Informação Cientifica 2004.

3.3.1 Métodos físicos

Os métodos físicos introduzem os genes de forma mecânica dentro das células, como por exemplo:

I. **Microinjeção -** introdução do DNA desejado, diretamente, dentro do núcleo da célula-alvo, de forma mecânica, sem ajuda de moléculas ou vetores transportadores, é executado com um micromanipulador e com a ajuda de um microscópio, injeta-se o material genético exógeno que se encontra dentro de uma micropipeta. É importante salientar que a célula-alvo seja relativamente estática e tenha um núcleo volumoso e bem delimitado[12]. Essa é a forma mais segura de garantir que o DNA seja transferido para dentro donúcleo celular.

II. **Eletroporação (DNA nu) -** aplicação de impulsos elétricos nas células-alvo para aumentar a permeabilidade da membrana celular e permitir a entrada do DNA plasmídeo no núcleo. Os impulsos elétricos são aplicados alterando a voltagem

transmembrana do valor fisiológico de 0.1 V para 0.5 a 1 V durante milissegundos, o que permite a formação de poros. Cerca de 50% a 70% das células expostas a um campo elétrico elevado acabam por morrer, devido à disfunção das membranas celulares[12]. Essa técnica foi adaptada, recentemente, para utilização *in vivo,* o que aumentou a eficácia da injeção de DNA nu.

III. **Biobalistica (gene gun) -** microesferas, normalmente de ouro e tungstênio, cobertas com o DNA são atiradas contra as células-alvo forçando assim sua passagem pela membrana e introdução ao núcleo[12]. Método bastante eficaz, porém pode acarretar a morte de muitas células. E está sendo usado para aplicação *in vivo* nas vacinas de DNA.

3.3.2 Métodos químico

Os métodos químicos utilizam as características polarizadas do DNA e das membranas celulares para garantir a entrada do material genético nas células, utilizando-se de compostos químicos. Estes compostos possuem carga total positiva, ou seja, são catiônicos e os grupamentos fosfatos do DNA possuem carga negativa, logo essa junção formam complexos[12].

É adicionado, desta forma, o DNA plasmídeo a uma solução de cloreto de cálcio e em seguida à uma solução de tampão de fosfato. Os precipitados criados penetram para o interior da célula por endocitose. Alguns plasmídeos já desenvolvidos mostram uma expressão estável, porém na maioria dos casos essa expressão é transiente. As vantagens acerca desse método estão na simplicidade e baixa imunogenicidade[19, 21].

3.3.3 Vetores virais

Esses vetores são os mais utilizados nos protocolos de terapia gênica, devido, principalmente, à alta capacidade de transferir seu material genético para as células-alvo e a incapacidade de se replicar e continuar seu ciclo infeccioso. Essa incapacidade se dá devido à substituição do gene patogênico do vírus pelo gene terapêutico[11].

Atualmente, existem quatro famílias de vírus que vêm sendo mais utilizados, são eles: os adenovírus, os retrovírus (incluindo os lentivírus), os vírus adeno-associados e o herpesvírus (HPV) [20, 21].

As desvantagens da utilização de vetores virais é que possuem maior potencial imunogênico, sendo considerados mais prejudiciais ao organismo[21].

Os métodos vírais são utilizando os seguintes virus:

I. **Adenovírus:** São vírus que possuem DNA como material genético e são capazes de infectar uma ampla variedade de células. Eles podem ser modificados para carregar um gene terapêutico específico, que pode ser entregue a células doentes. Apresentam as seguintes características: não causam doenças sérias, possuem a capacidade de carregar genes terapêuticos de maior dimensão, infectam células que não estão em divisão e apresentam um elevado tropismo, sendo capazes de infectar um largo espectro de células[21]. No entanto, devido ao elevado número de proteínas expressas na sua superfície, são imunogênicos, podendo causar uma forte resposta do sistema imunitário. Outro ponto desvantajoso é a transiência do transgene, caraterística deste vetor, que o torna pouco eficiente no tratamento de deficiências monogênicas sendo mais adequado no tratamento de doenças onde é requerida uma expressão de curto prazo, como em alguns tratamentos de cancro[20, 21].

II. **Retrovírus:** São vírus que possuem RNA como material genético e utilizam a enzima transcriptase reversa para converter seu RNA em DNA. O DNA viral é integrado ao genoma da célulahospedeira, permitindo que o material genético viral seja transmitido para as células filhas[12]. Apresentam as seguintes características: capacidade de integrarem seus genes no cromossoma da célula hospedeira, possibilitando a manutenção da expressão gênica por longo tempo. Porém, essa integração é ao acaso, o que pode interromper um gene essencial ou ativar um oncogene. São capazes de infectar células em divisão e não estimulam a resposta imunitária, ou seja, não são imunogênicos[12]. Os retrovírus demonstram nos protocolos e terapia gênica, melhores resultados. O gênero lentivírus desta família tem sido muito estudado por obterem a capacidade de infectar células quiescentes. Os retrovírus recombinantes onde ocorre a substituição dasproteínas de envelope do vírus original conseguiram a ampliação do tropismo celular desses vetores[21].

III. **Adenoassociados:** São vírus que possuem um genoma de DNA de fita simples e podem ser utilizados como vetores de transferência genética. Eles são capazes de infectar uma ampla variedade de células, mas geralmente não integra seu material genético no genoma dacélula hospedeira, o que pode ser uma vantagem em termos de segurança[21]. Apresentam as seguintes características: Não causam

doenças conhecidas, combinam as principais vantagens dos retrovírus e do adenovírus, infectam células em divisão células que não estão em divisão e células quiescentes, possuem tropismo pelo cromossomo 19 humano e a capacidade de carregar apenas genes de menor dimensão[12, 21]. São mais vantajosos que os demais devido à ausência de patogenicidade, tropismo ampliado e integração sítio-específica. No entanto, os vetores possuem algumas desvantagens, como a capacidade de clonagem limitada e imprópria para a maioria dos genes terapêuticos. Dentre as doenças não monogênicas, nas quais vetores adeno associados têm sido reportados, estão à artrite reumatoide e a doença de Parkinson[21].

IV. Herpesvírus: São vírus que possuem DNA como material genético e são capazes de infectar células nervosas e permanecer latentes por longos períodos de tempo. Eles podem ser utilizados como vetores de transferência genética para tratamento de doenças neurodegenerativas, por exemplo[21]. Apresentam as seguintes características: tropismo pelo sistema nervoso central (SNC), habilidade de infectar células em divisão e\ou quiescentes, capacidade de incorporar múltiplos genes terapêuticos, não integram seu gene na célula hospedeira e possuem alta imunogenicidade e toxicidade tecidual[12]. Um número grande de estudos mostra uma expressão transgênica estável em longo prazo no sistema nervoso quando recorridos a vetores baseados em HHV-1. Os estudos pré-clínicos com modelos de doenças neurais, como dor crônica, neurodegeneração e glioma, citaram resultados promissores[21].

3.3.4 Vetores não virais

Os vetores não virais são mais seguros e flexíveis para transferência gênica devido a várias características como: possuem baixa imunogenicidade, podem ser produzidos em larga escala e a baixo custo, podem ser modificados para atender às necessidades específicas de diferentes terapias gênicas, o que os torna mais versáteis e adaptáveis[12].

Recentemente, foram desenvolvidos vetores não virais de alta eficiência transdução que conseguem atingir níveis comparáveis com vetores virais. No entanto, os vetores não virais também têm algumas desvantagens, como baixa capacidade de entrega e menor estabilidade em comparação com os vetores virais. Ainda assim, eles

apresentam uma opção interessante para a terapia gênica ou transferência gênica são objeto de pesquisa contínua[21].

Os métodos não vírais são utilizando os seguintes:

I. **Lipossomos:** Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Os lipossomas catiônicos interagem com o DNA através de interações eletrostáticas visto que a molécula de DNA tem carga negativa. No entanto, a carga total, permanece com a carga positiva. Sendo assim, isto permitirá a interação eficaz do carreador com a carga negativa da membrana celular, apossando-se na célula, principalmente através de endocitose. Determinadas proteínas, podem ser colocadas na superfície dos lipossomas que só interagem com as proteínas da superfície de tecidos específicos, permitindo que esta carga genética chegue apenas às células onde eles realmente são necessários, conferindo especificidade a este processo. Este método é considerado seguro e pouco imunogênico[19, 22].

II. **Dendrímeros:** Os dendrímeros são polímeros ramificados, geralmente com várias camadas concêntricas. Estes vetores apresentam, sobretudo carga positiva que, através de interação eletrostática com a carga negativa do DNA, permite que este complexo fiquealojado nas pequenas cavidades formadas pela ramificação do polímero[12]. Diversos relatórios têm sido publicados descrevendo a utilização de dendrímeros de PAMAM terminados em aminas ou dendrímeros de PPI, ou poli propileno (imina), comoagentes de transferência não viral de genes, aumentando a transfecção de DNA por endocitose e, finalmente, no núcleo celular. A vantagem dos dendrímeros ativados é que estes podem transportar uma quantidade maior de material genético que vírus, e os “Complexos de SuperFectDNA” são caracterizados por elevada estabilidade e por assegurar o transporte mais eficiente doDNA no núcleo que lipossomos[23].

3.4 Aplicações da terapia gênica

O tratamento de doenças através da transferência de genes tinha como foco inicial as doenças hereditárias causadas por defeitos em um único gene, tais como fibrose cística, hemofilia e distrofia muscular[12].

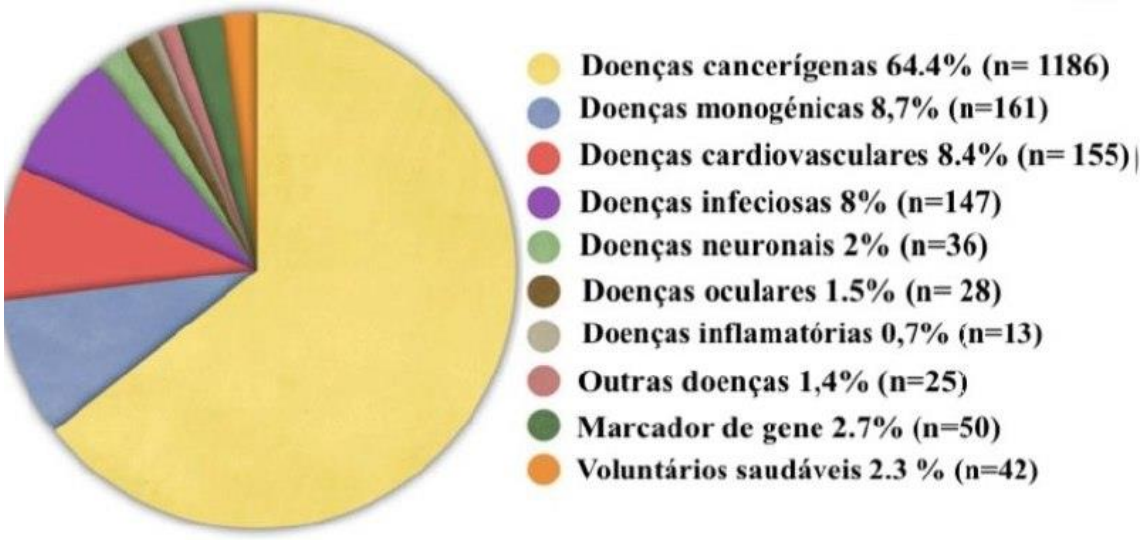
Porém hoje em dia a terapia gênica também é usada tanto no tratamento de doenças hereditárias como no tratamento de doenças adquiridas. Os experimentos

clínicos em andamento têm como objetivo tratar doenças adquiridas, como Aids, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Isso ocorre principalmente porque as doenças adquiridas têm uma alta incidência na população mundial em comparação com as doenças monogênicas. Dessa forma se forem bem sucedidos podem trazer grandes benefícios para a maior parte da população submetida ao procedimento[12, 24].

Entre as doenças estudadas, 8% foram relacionadas a doenças infecciosas, 8,4% a doenças cardiovasculares e 64,4%, a doenças oncológicas tais como câncer de pele, cânceres neurológicos, cânceres gastrointestinais, câncer de ovário, câncer de pulmão, leucemia e outros (Figura 1)[12].

.

Figura1: Distribuição em percentagem dos ensaios clínicos realizados mundialmente até 2012 (adaptado de Ginn et al., 2012).



Fonte: The Journal of Gene Medicine, 2010, John Wiley anda Sons Ltda.

3.4.1 Doenças hereditárias

3.4.1.1 Fibrose cística

A fibrose cística é uma patologia hereditária e letal, autossômica recessiva definida por uma mutação no gene do regulador de condutância transmembrana da

fibrose cística (CFTR), que tem como principal função o transporte iônico de Na+ (sódio), K+ (potássio) e Cl- (cloro) por meio de membranas epiteliais. A maioria dos sintomas da doença ocorre por conta de secreções espessas e viscosas causadas pela ausência de pelo menos um alelo funcional que origina tais alterações, as hipersecreções nos pulmões são a causa primordial de mortalidade da doença. Sendo uma das principais doenças hereditárias recessivas, monogênicas, com mais ensaios clínicos com recurso a terapia gênica[12].

A principal estratégia utilizada para normalizar o transporte iônico transmembrana é a reconstituição de uma cópia útil do gene CFTR, poucas quantidades desse gene já são suficientes para a prevenção dos principais sintomas dessa doença, pois uma pequena porção de células do epitélio será necessária para desenvolver o gene CFTR que fará a correção total do transporte iônico[12-13].

Vetores virais e não virais são empregados para transferir o gene CFTR funcional para as células, no entanto, há dificuldades a serem vencidas, como a grande quantidade de tecidos alvo distintos e a presença de secreções em alguns desses tecidos, pois há uma camada mucosa que impossibilita a entrada dos vetores nas células afetadas[12].

3.4.1.2 Hemofilia

A hemofilia, em seus subtipos A e B, é uma doença genética recessiva rara que afeta principalmente o sexo masculino por estar ligada ao cromossomo X, que resulta em uma deficiência no gene codificante causando uma deficiência nos fatores VIII e IX de coagulação, o que pode predispor seus portadores a sangramentos espontâneos ou a consequências de maior gravidade ao sofrerem lesões. E seu tratamento convencional recorre a transfusões dos fatores de coagulação que estão em defasagem[25, 26].

A terapia genética propõe adicionar o gene codificante do fator de coagulação funcional, neste caso, por meio de uma infusão direta na veia do paciente utilizando um vírus adenoassociado e modificado[26].

3.4.1.3 Distrofia muscular

A distrofia muscular é caracterizada como um grupo de desordens musculares, de origem genética causada pela mutação de um ou mais de um gene, é um conjunto de doenças musculares que causa fraqueza e atrofia que se dá por falta ou má formação de proteínas complexas essenciais para a fisiologia do funcionamento muscular, proteínas essas responsáveis pela ligação de proteínas musculares à membrana plasmática do músculo (sarcolema). A degeneração da membrana que envolve os músculos é a principal consequência quando há falhas em uma das proteínas do complexo de distrofia, resultando nos sintomas característicos da doença: enfraquecimento dos músculos e morte do tecido muscular[27].

Os genes comprometidos são candidatos ideais para a estratégia utilizada, no entanto a transferência do gene funcional para o tecido muscular não é uma tarefa fácil, uma vez que este corresponde a mais de 40% da massa corporal. Passaram pela transferência de um vetor do gene funcional da distrofia ou de uma das proteínas associadas, ou ainda de um análogo da distrofia, a atrofia, ou pela regulação positiva da expressão da atropina. Com isso será possível ultrapassar os desafios da distribuição sistêmica, sem reações adversas, para células alvo, com bons resultados no tratamento da doença[27, 28].

3.4.1.4 Imunodeficiência

A terapia genética foi aplicada com êxito no tratamento de uma imunodeficiência congénita autossômica recessiva grave, a deficiência na adenosina desaminasse, o papel dessa enzima é fundamental para o metabolismo das purinas e para diversos processos metabólicos em várias células do organismo, os linfócitos T, que eliminam os subprodutos metabólicos tóxicos para as células, que acumulam com sua ausência e acabam provocando a lise celular. A deterioração das células do sistema imune implica o seu papel de defesa, surgindo infeções oportunistas de forma regular e podendo causar até morte do indivíduo[12].

3.4.2 Doenças adquiridas

3.4.2.1 Doenças cancerígenas

O câncer é a segunda maior causa de morte do mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, a doença mata mais de 10 milhões de pessoas todos os anos. Durante todo tempo, as células do nosso corpo são divididas e produzidas para manter a homeostase, a doença do câncer surge decorrente do crescimento rápido e incontrolado dessas células, levando a falha multiplicação, até a metástase das células normais, tecidos e órgãos. A doença cancerígena se classifica em diversos subtipos, podendo ocorrer em tecidos como pele, pulmão, ossos, entre outros. Fatores como: hereditariedade, bebidas alcoólicas, tabaco, radiação solar, alterações genéticas podem levar ao seu aparecimento[29].

A cura do câncer depende principalmente do grau de agressividade em que a doença se cura, o estágio em que ela é descoberta e na maneira com que será tratada, entretanto, alguns possuem alta taxa de cura, mesmo com diagnóstico em fase avançada. Os tratamentos mais utilizados são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, essas terapêuticas são invasivas, e muitas vezes danosas, tanto para as células tumorais, tanto para as saudáveis[29, 30].

O uso de tecnologias de DNA recombinante, permitem a introdução de genes sadios e modificações genéticas de vírus para provocar a morte seletiva de células tumorais, é uma das possíveis formas de tratamento do câncer, entretanto, esse sistema ainda se encontra em fase de teste. A terapia gênica para com o câncer, é um tratamento com alto custo, e que não está isento de efeitos colaterais, apresentados nesse caso como uma gripe, febre e inflamações locais[31].

O objetivo da terapia gênica nas doenças cancerígenas é corrigir as mutações genéticas que o câncer desenvolveu, e a principal via é causar a morte celular das células malignas. Uma possível aplicação do uso de fontes radioativas se concentra no desenvolvimento de radiobiomarcadores que permitam o rastreamento em tempo real da atividade isotópica. Isso ajudaria a entender a evolução do câncer em pacientes com baixo prognóstico de vida. Nanopartículas inorgânicas com alto número atômico tornam-se potenciais fontes secundárias para aumentar o bombardeio de DNA[30, 31].

3.4.2.2 Doenças infecciosas

As doenças infecciosas são aquelas manifestações causadas por microrganismos de alta capacidade patogênicas, como fungos, bactérias, vírus e protozoários e pela resposta que o hospedeiro tem em relação a infecção. As principais doenças infecciosas e que persistem no Brasil são a gripe, infecções de pele, hospitalares, AIDS/HIV, hepatites B e C, tuberculose e doenças respiratórias e diarréicas. São características de uma doença infecciosa os sinais, sintomas e alterações fisiológicas, bioquímicas e histopatológicas, esses mostram que a pessoa foi infectada, ou seja, houve a necessidade de um agente infectar o hospedeiro e esse contato houve uma manifestação. Transmitida através de água, alimentos, ferimentos de animais, insetos e carrapatos, via respiratória, via sexual[12].

Dependendo do agente causador, as doenças infecciosas podem ser consideradas como doenças genéticas realizadas, sendo esse conceito mais fácil de entender quando se trata de infecções virais. Esses microrganismos desenvolveram a capacitância de inserir seu genoma nas células do organismo hospedeiro e se multiplicar. As patologias emergem nesse processo devido à destruição dos tecidos e à reação do organismo. Por exemplo, o desenvolvimento de genes "anti-HIV" levou ao esboço de terapias gênicas promissoras para tratar a SIDA, com o maior número de protocolos clínicos para doenças infecciosos em curso contra esse vírus[12].

Espera-se que a possibilidade de introduzir um gene anti-HIV em células-tronco da medula óssea in vivo esteja disponível em breve. Essas células dão origem às células do sangue e já há evidências de que linfócitos de células-tronco com genes anti-HIV tornam-se resistentes à replicação do HIV, abrindo uma perspectiva promissora para pacientes com AIDS[12].

3.4.2.3 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são aquelas que acometem o coração e todo sistema cardiovascular, responsável por conduzir o sangue. As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior causa de morte do mundo – cerca de 7 milhões de mortes/ano. Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença são principalmente genéticos e também associados ao estilo de vida – sedentarismo,

cigarros, uso excessivo de álcool. As doenças cardiovasculares são a hipertensão, insuficiência cardíaca, AVC, entre outros[32].

A terapia gênica para doenças cardiovasculares não visa apenas substituir um gene anormal, mas sim regular positivamente a gesto de uma proteína lucrativo aumentando o conteúdo de DNA. O melhor método é tomar um plasmídeo nu contendo DNA (sem vetor), requer altas doses de DNA, tem levemente gesto transitória e deve ser entregue localmente, pois é apeado por nucleases circulantes em que tempo entra na circulação. Sua potência depende do gene, vetores e aparência de direção utilizada. A opção dos vetores está relacionada à segurança, tempo de gesto e aparência de direção considerada[32].

Os vírus infectam naturalmente as células e introduzem seu DNA nelas. Os vírus usados para terapia gênica são modificados de aparência, que não possam se responder nas células hospedeiras ou transverberar proteínas necessárias para o encapsulamento, e essas sequências do genoma viral são substituídas pelo gene cobiçado a ser explícito pela célula-alvo. No entanto, eles desencadeiam a reação livre do hospedeiro, o que reduz a potência de futuras aplicações com o próprio vetor. Os vetores adenovirais são os mais usados em doenças cardiovasculares, pela via intravenosa. Os testes clínicos usam preferencialmente a sistema intracoronária (adenovírus) ou intramiocárdico (DNA nu ou adenovírus)[32].

3.4.2.4 Doenças neurológicas

As doenças neurológicas são patologias que acometem principalmente o sistema nervoso central e periférico, nas regiões do cérebro, nervos e medula espinhal, que afetam nossos movimentos voluntários, capacidade motora e cognitiva. As patologias neurológicas são alvo de muitas pesquisas científicas, por se tratar de doenças que não possuem cura, e sim tratamento para aliviar ou retardarem as mesmas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde as doenças neurológicas deixam mais de 6 milhões de pessoas por ano[33].

As principais causas advêm de fatores genéticos, infecções, má alimentação e sedentarismo. Os principais distúrbios são: doença de *Alzheimer*, epilepsia, tumores cerebrais. O cérebro e todo sistema nervoso são os responsáveis por todo funcionamento harmônico e regular do corpo e uma cura geral para cada ainda é algo a ser descoberto. A doença de *Alzheimer* (DA) e a doença de *Parkinson* (DP) tem se

tornado muito prevalente. Apesar das diferentes apresentações clínicas, ambas as condições são caracterizadas por agregados de proteínas mal dobradas que levam à perda gradual de neurônios e suas conexões sinápticas em áreas específicas do cérebro (SOTO; PRITZKOW, 2018)[33].

Enquanto ainda não há a cura, busca por estratégias terapêuticas tornam-se necessárias, e ultimamente, muito se falam da terapia gênica *in situ* para essas condições neurodegenerativas, se trata de uma nova alternativa para o tartamento dessas doenças, e consiste na transferência de material genético com potencial terapêutico para as células de um paciente. Uma das estratégias utilizadas é administrar um vetor carregando esse material genético diretamente no tecido alvo, nesse caso, no sistema nervoso central. Dessa forma, é possível atravessar a barreira que limita o acesso ao nosso cérebro: a barreira hematoencefálica[33].

Para as condições neurodegenerativas, são utilizados como vetores, os vírus adenossociados ou os mentivivos, uma vez que esses são capazes de levar o material genético para as células que não estão se dividindo, nesse caso, os neurônios. Na construção desses vetores, parte do genoma original dos vírus é substituído por um gene terapêutico, tornando o vírus incapaz de se replicar[33].

A injeção do vetor diretamente no parênquima cerebral, é a estratégia *in situ* mais utilizada, embora o procedimento seja invasivo, é possível atingir uma alta expressão local utilizando doses virais baixas. Já administração intratecal, é realizada na lombar, e dessas técnicas é a menos invasiva, com a vantagem de ser um procedimento bastante utilizado na prática clínica. Uma boa transdução é obtida na área da medula espinal, mas a distribuição para o cérebro é limitada, outras vias também são estudadas[33].

As doenças lisossômicas são ótimas candidatas a terapia gênica por ser causada pelas mutações em um único gene, caso estudos indicaram redução da progressão da doença. Já no caso da doença de *Alzheimer* e da doença de *Parkinson*, são doenças multifatoriais que não apresentam laudo terapêutico específico, as principais estratégias utilizadas até o momento, é a administração de genes que codificam proteínas com efeito neuroprotetores, ou enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores, por exemplo, em um estudo clínico para a doença de *Parkinson*, foi utilizado no parênquima cerebral, um vetor adenoassociado, carregando um gene envolvido na síntese de um neurotransmissor, que teria o potencial de aliviar as

condições motores. Os resultados indicaram melhora nos fatores motores dentre de 12 meses em comparação com o grupo controle[33].

Os ensaios clínicos até o momento tiveram sucesso em demonstrar a viabilidade dos procedimentos e sua segurança. A maioria dos resultados publicados são abertos, e, portanto, os dados da eficácia são preliminares. Os ensaios clínicos foram buscados na plataforma ClinicalTrials.gov em novembro de 2020[33].

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante décadas, a ciência vem tentando lutar contra doenças que assolam a humanidade câncer e as autoimunes que são patologias com sistema complexo e até os dias de hoje, são um grande problema e consideradas doenças incuráveis. Com técnicas de transferência genética, como é o caso da terapia gênica, essas e outras doenças poderão daqui a alguns anos, ser tratadas a até mesmo curadas. A terapia gênica é uma nova esperança para a ciência, mas existem, ainda, alguns empecilhos que impedem sua utilização. Há muitas questões técnicas e éticas para serem resolvidas e discutidas. Como, por exemplo, de os vetores usados na transferência que ainda não são “ideais” e podem causar reações adversas como alta imunogenicidade que pode levar o paciente ao falecimento, como já ocorreu em 1981 com o paciente Jesse Gelsinger, de 18 anos. E até mesmo com a falta de eficiência de atingir alvos específicos levar ao surgimento de tumores indesejados, como já ocorreu em 2000 em 4 pacientes tratados com terapia gênica. Mas não existem apenas questões técnicas a seres resolvidas. Por se tratar de uma terapia irreversível e que envolve o genoma celular, existem algumas questões éticas a se discutir como, por exemplo, a terapia feita em células germinativas que causaria a mudança genética não apenas ao paciente, mas sim em toda geração seguinte o que poderia vir, um dia a acabar com a diversidade humana, a até mesmo sendo usado com uma forma de hegemonia, alterando caraterísticas fenotípicas humanas.

Agora, olhando pelo lado dos acertos e considerando que os contras dessa técnica sejam resolvidos, as perspectivas para o futuro são inegáveis. Existem, no mundo, agora vários ensaios clínicos sendo feitos utilizando principalmente a edição gênica com a CRISPR-Cas9. No Brasil, está ocorrendo agora através do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) a UFMG sediará o primeiro Centro de produção de vetores virais, do Brasil. O sistema CRISPR-Cas9 ainda é pouco desenvolvido no país. Essa é uma mais rápida e fácil de ser ultimada para edição de genomas, até agora. Constitui-se um avanço promissor para o desenvolvimento da terapia genica, principalmente em células humanas, podendo vir a ser um grande avanço no conhecimento na área de neurociências, resultando em novos tratamentos para doenças neurais.

Portanto, como ocorreu a séculos no desenvolvimento de medicamentos, tratamentos ou qualquer nova tecnologia ainda necessita de mais estudos e testes

clínicos elucidativos. Futuramente, há esperanças de que a aplicação dessa técnica traga um enorme avanço médico para a humanidade.

REFERÊNCIAS

1. Linden R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. Estud av [Internet]. 2010 [acesso em 2022 out 23]; 24(70): 31-69. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300004

2. Nardi NB, Teixeira LAK, Silva EFA. Terapia gênica. Ciência & Saúde Coletiva [Internet]. 2002 [acesso em 2022 out 27]; 7 (1): 109-16. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1413-81232002000100010

3. Paiva JCC. Terapia gênica e suas aplicações no tratamento de doenças. Brasília: Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, 2017. [Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina]. UNICEUB-Centro universitário de Brasília. Disponível em: https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/235/11662/1/21413350.pdf

4. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Terapia Gênica: avanços, desafios e perspectivas. Einsten (São Paulo) [Internet]. 2017 [acesso em 2022 out 23] Jul;15(3): 369-75. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024

5. Scheid, Neusa Maria John; Ferrari, Nadir; Delizoicov, Demétrio. a construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do dna. Ciência & Educação. [Internet] 2005 [acesso em 2023 abr 10] v. 11, n. 2, p. 223-233, 2005. Disponivel em: https://www.scielo.br/j/ciedu/a/5CZ5MDGqznkmnqzRFQbdyhq/?lang=pt&format=pdf

6. MARTINEZ Marcos Antonio Rodrigues, FRANCISCO Guilherme, CABRAL Luciana Sanches, RUIZ Itamar Romano Garcia M, NETO Cyro Festa. Genética molecular aplicada ao câncer cutâneo não melanoma. Educação Médica Continuada. An Bras Dermatol. 2006;81(5):405-19. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abd/a/ZVKkNwGfZbfYdFD4gqkFgtF/?format=pdf&lang=pt

7. Hepp D, Nonohay JS de. A importância das técnicas e análises de DNA. Scientia Tec: Revista de Educação [Internet] Ciência e Tecnologia do IFRS–Campus Porto Alegre, v.3, n.2,p: 114-124, jun/dez2016. Disponível em: https://periodicos.ifrs.edu.br/index.php/ScientiaTec/article/view/1592/1351

8. NARANJO Cesar David Guerra. Desenvolvimento de um método para extrair DNA total de amostras biológicas empregando uma substância caotrópica e vidro reciclado como fonte de sílica. [monografia].UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA. 2021. Disponível em: https://repositorio.ufcspa.edu.br/jspui/bitstream/123456789/1818/1/%5BDISSERTA%C3%87%C3%83O%5D%20Naranjo%2C%20Cesar%20David%20Guerra%20%28P%29.pdf

9. Boas, Daniel Siquieroli Vilas. Bases moleculares de mutação gênica mecanismos e classificação. Revista Ceciliana, ISSN 1517-6363, Nº. 27, 2007, páginas 79-92. Disponível em: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2333557

10. RODRIGUES Flávio Ibiapina. MUTAÇÕES GENÉTICAS: PERCEPÇÃO DOCENTE/DISCENTE E PRÁXIS EM ESCOLA PÚBLICA NA PLANÍCIE LITORÂNEA DO PIAUÍ. [monografia]. Universidade Estadual do PiauÍ.2020. Disponível em: https://www.profbio.ufmg.br/wp-content/uploads/2021/09/TCM_homologado.pdf

11. Oliveira BA, França ES, Souza VG, Vallinoto ACR, Silva ANMR. Vetores virais para uso em terapia gênica. [Internet] Rev Pan-Amaz Saude 2018 [acesso em 2023 abr 18]; 9(2):55-64 – e-ISSN: 2176-6223. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?pid=S2176-62232018000200008&script=sci_abstract

12. PEREIRA JMCLA de. Terapia Gênica: Métodos e Aplicações. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde Porto, 2015. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5149/1/PPG_14325.pdf

13. Linden R. Genes contra doenças. Terapia gênica: uma nova era na genética. Rio de Janeiro: Vieira e Lent [Internet]. 2008 [acesso em 2023 abr 10]. 128p. Disponível em: https://www.scielo.br/j/ea/a/nmhVC8mrYSr9v68gRYRsPBS/?format=pdf&lang=pt

14. Silva CD, Matte US, Giugliani R. Terapia gênica: uma nova estratégia para o tratamento de doenças. Revista HCPA 2001(3)379-386. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Revista HCPA 2001(3). Disponível em: https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/163868/000337220.pdf?sequence=1&isAllowed=y

15. NEVES Ursúla. FDA aprova primeira teraria gênica para atrofia muscular espinhal. PEBMED. 2019 jun 01. Disponível em: https://pebmed.com.br/fda-aprova-primeira-terapia-genica-para-atrofia-muscular-espinhal/

16. BERNASDES Vinicius Alves, RODRIGUES Gabriele Machado, CABRAL Mara Régina Lucene, NERES Liberta Lamarta Favoritto Garcia. A utilização da técnica de CRISPR-CAS9 na Terapia Gênica. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento, v. 10, n. 14, e75101421778, 2021. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21778

17. SGANZERLA Anor, PESSINI Leo. Edição de humanos por meio da técnica do Crispr-cas9: entusiasmo científico e inquietações éticas. Saúde e Debate. RIO DE JANEIRO, V. 44, N. 125, P. 527-540, ABR-JUN 2020. Disponivel em: https://www.scielo.br/j/sdeb/a/8z84LrTTPq6Xzr77D3jtWDG/?format=pdf&lang=pt

18. Rachel IC, Mello SR. Terapia Gênica. FCAV – Unesp Jaboticabal. 2016. Disponível em: https://slideplayer.com.br/slide/7310437/

19. BORSATTO Sara Cristina. TERAPIA GÊNICA: SUCESSOS E INSUCESSOS. [Trabalho de Conclusão de Curso]. Universidade Federal do Paraná. Paranavaì. 2015. Disponível em: https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/42501/R%20-%20E%20-%20SARA%20CRISTINA%20BORSATTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y

20. NARDIR Nance Beyer. Terapia Gênica. Departamento de genética. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) RS, Brasil. Disponível em: https://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/68048

21. OLIVEIRA Bárbara de Alencar, FRANÇA Eliane dos Santos, SOUZA Viviane Guimarães, VALLINOTO Antônio Carlos Rosário, SILVA Andréa Nazaré Monteiro Rangel. Vetores virais para uso em terapia. Rev Pan-Amaz Saude 2018; 9(2):55-64 – e-ISSN: 2176-6223. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v9n2/2176-6223-rpas-9-02-57.pdf

22. MAZONETO Daiane Moreira. Tecnologia dos limpíssimas e suas áreas de aplicação. Repinis Unifaema.[monografia]. 2011. Disponível em:https://repositorio.unifaema.edu.br/handle/123456789/1267#:~:text=Lipossomas%20t%C3%AAm%20sido%20um%20dos,ves%C3%ADcula%20refor%C3%A7ada%20por%20c%C3%A9lulas%2Dalvo

23. Reinold EC. Síntese, Propriedades e Aplicações de Dendrímeros. [monografia] Rio de Janeiro: Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2011[acesso em 2023 abr 10]. Disponível em: https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/18853/1/ECReinold.pdf

24. STRAUSS Eugenia Costanzi. STRAUSS Bryan E. Perspectivas da terapia gênica. Rev Med (São Paulo). 2015 out.-dez.;94(4):211-22. Disponível em: doi: http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v.94i4p211-222

25. Sayago M, Lorenzo C. O acesso global e nacional ao tratamento da hemofilia: reflexões da bioética crítica sobre exclusão em saúde. Interface (Botucatu) [Internet]. 2020;24:e180722. Disponível em: https://doi.org/10.1590/Interface.180722

26. Margareth C et al. Terapia gênica para hemofilia A. The New England Journal of Medicine. [Internet] 2022 [acesso em 2023 abr 25] N Engl J Med 2022; 386:1013-1025. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2113708#article_references

27. BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE (BVS). Ministério da Saúde. Distrofia Muscular. 2007. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/distrofia-muscular/

28. BAIONI MTC, AMBIEL CR. Atrofia muscular espinhal: diagnóstico, tratamento e perspectivas futuras. J Pediatr. (Rio de J) [Internet]. 2010 [acesso em 2023 abr 16] Jul;86 (4):261-70. Disponível em: https://www.scielo.br/j/jped/a/wfPCsMcS4z6xcRVNxct8btf/?lang=pt#

29. BARROS, Lilian (Coord.); MUNHOZ, Rodrigo. É possível falar em cura?: Cresce número de pacientes com câncer sob controle, mas risco de retorno da doença não pode ser descartado. Rede câncer, São Paulo, v. 40, março 2018. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/rrc-40-capa-e-possivel-falar-em-cura.pdf

30. TAVONI, Robinson. Modelos fracionários de terapia gênica para o tratamento do câncer. São Paulo, 2019. 142 p. [Trabalho de Conclusão de Curso] (Biometria) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2019. Disponível em:

https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181769/tavoni_r_dr_bot.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

31. GERALDO, J. M.; MONTAÑO VALENCIA C. J. Uso de sistemas nanoestruturados no tratamento do câncer: da radioterapia à terapia genética. Mário Penna Journal, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 18–33, 2023. Disponível em: https://revista.mariopenna.org.br/mpj/article/view/4

32. KALIL, Renato; ANNA, Roberto. Terapia gênica aplicada a doenças cardiovasculares. Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2004. Disponível em: http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2004/03/artigo14.pdf

33. RODRIGUES, Luiza. Terapia Gênica in situ em condições neurodegenerativas: uma revisão da pesquisa clínica. 40 p. [Trabalho de Conclusão de Curso] (Biomedicina) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021. Disponível em: https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/232265/001134142.pdf?sequence=1&isAllowed