

Uso de vírus adeno-associado: um avanço na terapia gênica

Adeno-associated virus use: an advance in gene therapy

Gabriela Anjos Colombo¹, Gabrielly Lunkes de Melo¹, Leticia Beatriz Matter^{2*}

¹ Acadêmicas do curso de Farmácia da URI – Santo Ângelo, RS; ² Docente do Departamento de Ciências da Saúde da URI- Santo Ângelo; * autor correspondente: Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus Santo Ângelo, Rua Universidade das Missões, 464, CEP: 98.802-470, Santo Ângelo, RS, Brazil; fone +55(55)3313.7900; email: lmatter@yahoo.com.br

Resumo

A terapia gênica utiliza técnicas de engenharia genética para interferir na origem de uma doença. Nesta técnica introduz-se uma sequência de DNA codificante nas células do paciente como tratamento para a correção de um problema recorrente devido a um gene mutado. O uso de vetores virais recombinantes para introduzir o gene correto no indivíduo tem se mostrado bastante desafiador e promissor. Este artigo tem como objetivo apresentar de forma atualizada os conceitos básicos e as perspectivas da terapia gênica para doenças as doenças: fibrose cística, artrite reumatoide, hemofilia e dislipidemia (deficiência da lipoproteína lipase) utilizando o vírus adeno-associado (VAA) como vetor doador do novo gene. Os avanços obtidos no emprego desta técnica, como método de tratamento, podem contribuir largamente para a otimização da terapêutica e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida de pacientes portadores de diferentes doenças incuráveis. Neste sentido, os VAA têm se mostrado tecnologicamente versáteis, seguros e efetivos veículos no procedimento.

Palavras-chave: terapia gênica, vírus adeno-associado, fibrose cística, artrite reumatóide, hemofilia, LPLD.

Abstract

Gene therapy uses genetic engineering techniques to interfere with the origin of a disease. In this technique a DNA coding sequence is introduced into the patient's cells as treatment for the correction of a recurring problem due to a mutated gene. The use of recombinant viral vectors to introduce the correct gene into the patient has shown to be quite challenging and promising approach. This article aims to update the basic concepts and the perspectives of gene therapy for diseases such as cystic fibrosis, rheumatoid arthritis, hemophilia and dyslipidemia (lipoprotein lipase deficiency) using adeno-associated virus (AAV) as the donor vector of the new gene. The advances obtained with the use of this technique as a treatment can contribute greatly to the optimization of the therapy and, consequently, improve the life quality of patients with different incurable diseases. In this way, AAV has proven to be technologically versatile, safe and effective vehicles in the procedure.

Keywords: gene therapy, adeno-associated virus, cystic fibrosis, rheumatoid arthritis, hemophili, LPLD.

1- Introdução

A terapia gênica consiste no tratamento ou tentativa de tratamento terapêutico para doenças, através da inserção de cópias de genes em células específicas do paciente. A terapia gênica faz uso de genes ao invés de drogas para o tratamento de doenças¹.

A facilidade na manipulação de vetores e a grande evolução na área da genética tornaram a terapia gênica uma alternativa ao tratamento convencional para resolver problemas complexos relacionados à saúde humana, como a cura de doenças genéticas herdadas, ou de doenças contraídas ao longo da vida². Desta forma, a terapia gênica utiliza técnicas de DNA recombinante para construir a sequência gênica dentro de um vírus que será o doador deste material nas células do paciente³.

Este artigo tem como objetivo apresentar de forma sucinta e atualizada os conceitos básicos e as perspectivas da terapia gênica no tratamento de doenças como a fibrose cística, a artrite reumatoide, a hemofilia e a dislipidemia (deficiência da lipoproteína lipase) aplicando o vírus adeno-associado como vetor doador do novo material genético. Como tratam-se de doenças incuráveis, a utilização de novas técnicas genéticas torna-se necessária e importante na busca da qualidade de vida dos pacientes.

2- Metodologia

A revisão de literatura foi realizada através de uma busca de dados na base eletrônica de artigos sobre terapia gênica e vetores virais, publicados entre 2000 e 2017, na base de dados do PubMed e Scielo e *sites* relacionados ao assunto, com a utilização dos termos: “terapia gênica”, “vetores virais”, “vírus adeno-associado” e “uso de vetores virais no tratamento de doenças”. Em todos os casos, as buscas foram limitadas a estudos publicados em inglês e português. Os artigos

foram selecionados de acordo com o título e o resumo, onde se destacava o tema do estudo.

3- Avanços na terapia gênica

3.1- Vetores virais na terapia gênica

Os vírus são parasitas intracelulares conhecidos por infectarem e causarem doença em humanos, no entanto, devido a esta capacidade de se replicar dentro de um organismo, os vírus vêm sendo utilizados como vetores no tratamento de patologias⁴.

O gene terapêutico ou de correção pode ser carregado por um vetor, pois está inserido em uma molécula de DNA, juntamente com outros elementos genéticos que auxiliam na manutenção e/ou expressão gênica. As maneiras de transferir esse vetor contendo o gene são várias, mas primeiro deve ser definido, se o mais adequado é inserir o gene diretamente no organismo (*in vivo*) ou se células serão retiradas do indivíduo, modificadas e depois reintroduzidas (*ex vivo*)⁵.

Esse vetor responsável pela transferência do gene, geralmente, é um vírus. Os principais vírus utilizados atualmente na terapia gênica são os retrovírus, os adenovírus e os vírus adeno-associados. O vetor ideal deve ser de fácil produção, não deve gerar resposta imunológica contra o vírus pelo paciente, deve promover a expressão do gene de modo eficiente e por longo tempo, e ter especificidade ao tecido alvo⁶.

As etapas da terapia gênica com o uso de vetores virais envolvem: a construção do DNA recombinante, inserção do material no vírus que servirá de vetor, a infecção das células do paciente com o vírus (transfecção), expressão do material inserido pela célula do paciente e síntese da proteína de interesse na célula².

Vetores retrovirais geram a expressão do gene por um longo período de tempo, pois são capazes de integrá-lo permanentemente à

células-tronco, desta forma são muito úteis no tratamento de doenças sanguíneas⁷.

Os adenovírus e os vírus adeno-associados apresentam a capacidade de infectar qualquer tipo de célula (diferenciadas ou não diferenciadas), e possuem aspectos que os permitem ser purificados em grandes quantidades. Entretanto, os adenovírus exibem genes que provocam alto estímulo à resposta imunológica no paciente, causando efeitos adversos. Desta forma, é importante conhecer suas características em detalhes, para assim, utilizá-los na terapia¹.

Atualmente os vírus adeno-associados estão entre os vetores virais mais empregados na terapia gênica, presentes em quase metade das apresentações feitas nas reuniões da Sociedade Americana de Terapia Genética. Eles são pequenos vírus de DNA de fita simples, com genomas lineares com aproximadamente 5 kpb de tamanho. Estes vírus pertencem a família *Parvoviridae* e são dependentes de outros vírus como denovírus ou herpesvírus para mediar a infecção. Os vírus adeno-associados são relativamente fáceis de serem obtidos, e estimulam pouco o sistema imunológico do paciente, aumentando o tempo de expressão do transgene^{8,9}.

Historicamente os vírus adeno-associados não têm sido identificados como agentes patogênicos, e portanto, tornam-se muito promissores como vetores no tratamento de doenças, sendo assim, amplamente utilizados atualmente⁵. Desta forma, estes vetores serão abordados com maior enfoque nesta revisão.

3.2-Resposta imune e os vírus adeno-associados

Um dos maiores desafios para estabelecer uma terapia gênica adequada, está relacionado a resposta imune do hospedeiro aos genes e estrutura viral. A resposta celular elimina as células mutadas por transfecção utilizando células T citotóxicas, já a resposta humoral produz anticorpos neutralizantes que

impedem a readministração do mesmo vetor. Os vírus adeno-associados produzem uma resposta imune específica, suave, não prejudiciais ao paciente, e nenhuma resposta imune inata (inespecífica)⁵.

Como tentativa de inibir a resposta imune, tem-se modificado a superfície do capsídeo, afim de, torná-lo menos imunogênico⁴.

3.3-Vírus adeno-associado no tratamento de doenças

O número de protocolos envolvendo o uso da técnica de DNA recombinante com vírus adeno-associados vem aumentando, junto com a popularidade deste vetor⁹. A seguir estão descritos os principais avanços relacionados ao emprego dos vírus adeno-associados nos protocolos de pesquisas clínicas da fibrose cística, artrite reumatóide, hemofilias e dislipidemias.

3.3.1-Fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética crônica e fatal, causada por uma mutação que leva à inativação da proteína reguladora da condutância transmembrana na fibrose cística (CFTR). A falta desta proteína afeta o potencial elétrico da transmembrana, causando o acúmulo de secreções nos pulmões que leva ao bloqueio das vias respiratórias³.

Protocolos clínicos de fase I e fase II utilizam o vírus adeno-associado recombinante contendo o gene regulador de condutância transmembrana da fibrose cística para substituir o gene mutante que produz a proteína defeituosa, desta forma a célula é capaz de produzir proteínas CFTR funcionais. A administração dos vetores nos pulmões é realizada através do uso de broncoscópico ou aerossol. Não foram observados sinais de toxicidade nos pacientes e a resposta imune contra o vetor tem sido baixa. Até o momento tem sido observado uma melhora no quadro dos pacientes, mas esta melhora ainda é pouco significativa. Um

dos problemas encontrados é a dificuldade de acesso dos vetores às células afetadas, por causa da camada mucosa sobre o tecido pulmonar e a baixa eficiência dos promotores do DNA recombinante para a expressão do gene. Pesquisadores buscam rotas alternativas para o acesso adequado dos vetores no sítio de ação a a utilização de promotores mais eficientes^{3,8}.

3.3.2-Artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença autoimune em que o sistema imune do paciente age contra as articulações do próprio corpo, gerando o acúmulo de anticorpos no local e inflamação das articulações. Atualmente o tratamento inclui terapia medicamentosa com anti-TNF (anti-fator de necrose tumoral) para a diminuição da resposta imune¹⁰.

As pesquisas sobre terapia gênica no tratamento da artrite reumatoide investem na criação de vetores capazes de expressar um inibidor de TNF pelas células das articulações. O vírus adeno-associado pode ser manejado utilizando estratégias *ex vivo* ou *in vivo*. Em estudos no qual os vetores foram diretamente aplicados nas articulações dos pacientes, o DNA viral não foi identificado em outros órgãos, resultado considerado positivo pois a expressão dos genes em outros locais pode promover uma deficiência no sistema imune do paciente. Uma concentração satisfatória do vetor no sítio de ação foi alcançada nas primeiras semanas, mas após o período de 12-18 semanas não foi mais possível detectar o DNA viral. Garantir que a expressão do transgene intra-articular possa durar por um longo período de tempo tem sido um dos desafios encontrados pelos cientistas atualmente¹⁰.

3.3.3-Hemofilias A e B

Hemofilia é um distúrbio genético hereditário que afeta a coagulação do sangue. As duas formas mais comuns da doença são

hemofilia A, caracterizada pela deficiência do fator VIII de coagulação do sangue, e hemofilia B, deficiência do fator IX. Pesquisas envolvendo vírus adeno-associados estão sendo conduzidas para o tratamento das hemofilias A e B através de vetores capazes de induzir a expressão dos fatores de coagulação (VIII ou IX). A administração dos vetores recombinantes ocorre por meio de aplicação no fígado. Na maioria dos testes foram observados o aumento do nível dos fatores de coagulação. Entretanto, constatou-se uma alta resposta imune do organismo contra resíduos do vetor depositados na superfície dos hepatócitos após a transfecção. Pesquisas têm sido conduzidas na tentativa de solucionar este problema modificando as características do vetor, como alterando o capsídeo do vírus ou mesmo usando um diferente sorotipo do vírus adeno-associado^{11,12}. Entretanto, a empresa UniQure tem noticiado que já encontram-se em andamento os ensaios clínicos e pré-clínicos para as hemofilias B e A respectivamente¹³.

3.3.4-Deficiência da lipoproteína Lipase

A deficiência da lipoproteína lipase (DLPL) caracteriza uma doença genética, resultado de um defeito no gene *G188E* do cromossomo 8 e que causa hipertrigliceridemia grave. O indivíduo com a doença apresenta hipertrigliceridemia com episódios de dor abdominal, pancreatite aguda, erupções cutâneas e hepatoesplenomegalia. O tratamento consiste na restrição dietética de gordura e carboidratos¹⁴. A terapia gênica para esta deficiência avançou muito graças a utilização de VAA nos protocolos. Experimento em 27 pacientes, no qual injeções musculares foram aplicadas acompanhadas de imunossuppressores levaram a inclusão do gene normal nas células dos pacientes e produção da enzima LPL. A terapia gênica já é uma realidade para DLPL. Atualmente, o produto encontra-se aprovado com a denominação

alipogene tiparvovec e comercializado com o nome Glybera®^{15,16}.

4-Conclusão

É evidente o que o sucesso na terapia gênica pode trazer para a terapêutica. Doenças incuráveis são totalmente resolvidas sem contínua utilização do produto, sem interações medicamentosas e sem reações adversas medicamentosas. Por este motivo os protocolos têm sido exaustivamente estudados e aprimorados, e novos protocolos são criados constantemente, a fim de ter na manipulação genética a resolução de problemas de saúde complexos e sem terapêutica adequada. A cada avanço de técnicas moleculares e de diagnóstico tem-se avançado também nos tipos de tratamento. Entretanto, apesar do sucesso, em outro obstáculo pode-se esbarrar, este tipo de tecnologia é bastante cara ainda, deixando o tratamento bastante oneroso.

5-Referências bibliográficas

- 1- Azevêdo ES. Terapia Gênica. Revista Bioética. 2009;5:1-11
- 2- Afkhami S, Yao Y, Xing Z. Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2016; 3, 16030; doi:10.1038/mtm.2016.30
- 3- Pereira JMCLA. Terapia Genética: Métodos e Aplicações [Dissertação]. Porto, Portugal: Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde, 2015
- 4- Weinmann J, Grimm D. Next-generation AAV vectors for clinical use: an ever-accelerating race. *Virus Genes*. 2017;7:1-7; DOI 10.1007/s11262-017-1502-7
- 5- Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21:583–593
- 6- Menck CFM, Ventura AM. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Revista USP*. 2007;1:50-61
- 7- Ryu BY, Evans GMV, Gray JT, Bodine DM, Persons DA, Nienhuis AW. An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation. *Blood Journal*. 2008;111:1866-1875
- 8- Guggino WB, Cebotaru L. Adeno-Associated Virus (AAV) gene therapy for cystic fibrosis: current barriers and recent developments. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2017 DOI: 10.1080/14712598.2017.1347630
- 9- Naso, MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*. 2017;31:317–334 DOI 10.1007/s40259-017-0234-5
- 10- Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic. *Translational Research*. 2013;161:205-216
- 11- Arruda VR, Samelson-Jones BJ. Obstacles and future of gene therapy for hemophilia. *Expert opinion on orphan drugs*. 2015; 3:997-1010
- 12- Nienhuis AW, Nathwani AC, Davidoff AM. Gene therapy for hemophilia. *Molecular Therapy*. 2017;25:1163-1167
- 13- UniQure: terapia gênica para hemofilias A e B. [Internet] 2017. [Acesso 2017 Ago 25] Disponível em:

Colombo GA, Melo GL, Matter LB.

<http://www.uniquire.com/gene-therapy/hemophilia.php>

14- Takata RT, Schreiber R, Prado E, Mori M, Faria EC. Primeiro relato de uma criança brasileira portadora da mutação G188E do gene da lipoproteína lipase. *Rev Paul Pediatr.* 2010;28(4):405-8.

15- Glybera. European Medicines Agency, Science Medicines Health. [Internet] 2017.

[Acesso 2017 Ago 25] Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002145/human_med_001480.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

16- Touchot N, Flume M. Early insights from commercialization of gene therapies in Europe. *Genes.* 2017;8,78: 1-4 doi:10.3390/genes8020078.