

## Terapia Gênica: Futuro tratamento para a Esclerose Lateral Amiotrófica?

### *Gene Therapy: Treatment Future for Amyotrophic Lateral Sclerosis?*

**Miguel Mitne-Neto<sup>1</sup>, Mayana Zatz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Biólogo do Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP,

<sup>2</sup>Coordenadora do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP

A Terapia Gênica envolve uma série de procedimentos, que tem como objetivo a transferência de material genético para as células de um indivíduo, na tentativa de gerar algum benefício para este. Na década de 1960 começaram as primeiras especulações à cerca do potencial terapêutico ligado à manipulação genética, ou, terapia gênica. Porém, os primeiros ensaios com essa abordagem em seres humanos só vieram a ocorrer na década de 1990 nos Estados Unidos<sup>1</sup>.

A terapia gênica envolve os processos de injeção de material genético exógeno (transgene) no indivíduo; o direcionamento deste material para o(s) tecido(s) alvo(s), seguido da sua entrada nestas células (transfecção); em alguns casos, incorporação do transgene no genoma do indivíduo; geração do produto gênico proveniente da transfecção e posterior correção da anormalidade alvo<sup>1</sup>.

Potencialmente a transferência gênica pode se dar de várias formas, que diferem de acordo com sua eficácia e estratégia de terapêutica.

Injeção de DNA nu: o DNA purificado (vetor plasmidial) é injetado diretamente no músculo podendo manter uma expressão continuada do transgene *in vivo*. Sua eficiência é baixa, porém tem sido utilizada para o desenvolvimento de vacinas de DNA, capazes de desenvolver resposta imune celular e não apenas humoral.

Lipossomos: os lipossomos são constituídos de uma bicamada lipídica que tem como principal característica a formação de micelas. Essas estruturas mantêm uma fase aquosa na porção interior da bicamada, onde pode ser inserido o fragmento de DNA. Sua eficiência é

muito baixa, porém, o tamanho das seqüências que eles podem carregar, a ausência de resposta imune e seu baixo custo, justificam as tentativas de sua utilização.

Vetores virais: São vírus modificados, nos quais os genes responsáveis pela produção de proteínas prejudiciais ao hospedeiro foram substituídos pela seqüência do transgene. Vários tipos de vírus têm sido empregados:

*Vetores Adenovirais* – podem ser obtidos com altas titulações, são eficientes na infecção de vários tecidos e possuem genoma com DNA dupla fita, o que permite a inserção de grandes seqüências de DNA exógeno. Suas desvantagens são causadas pelo fato de não integrarem o transgene ao genoma do hospedeiro, gerando apenas uma expressão transiente e por induzirem resposta imune celular<sup>1</sup>.

*Vetores Adeno- Associados:* podem, também, ser obtidos com altas titulações, possuem DNA simples fita e integram seu DNA ao material do hospedeiro, permitindo expressão prolongada do transgene. No entanto, necessitam de co-transfecção com um vírus auxiliar devido à sua incapacidade de infectarem as células sozinhos<sup>1</sup>.

*Vetores retrovirais* - são os mais utilizados em protocolos de terapia gênica atualmente. Sua grande vantagem está na inserção de seu material ao genoma do hospedeiro, por serem vírus de RNA<sup>1</sup> e em teoria, ser necessária apenas uma injeção do vetor. Possuem capacidade de carregar seqüências de tamanho médio e induzem resposta inflamatória mínima<sup>2</sup>. Nesta classe estão inclusos os lentivírus. Esses são derivados principalmente do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1)<sup>1</sup>. Os lentivírus são os vetores de maior promessa para o tratamento de doenças neurodegenerativas<sup>2</sup>.

### **Terapia Gênica: Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)**

A ELA é uma doença neurodegenerativa, resultante da morte seletiva dos neurônios motores superiores e/ou inferiores<sup>3</sup>. Cerca de 90% dos casos são esporádicos enquanto aproximadamente 10% são hereditários. Desses últimos, 20% devem-se a mutações no gene *SOD1*. Ele é responsável pela produção da enzima Superóxido Dismutase, que está envolvida na metabolização do íon superóxido, um dos radicais livres mais reativos que ataca tanto o material genético quanto membranas e proteínas. A atividade incorreta, decorrente de mutações nessa enzima pode levar à morte dos neurônios motores devido à toxicidade. As mutações no *SOD1* levam a formação de enzimas que passam a exercer uma função que não

realizavam anteriormente, (ganho de função), ao invés de apenas perder sua atividade natural. Ela passaria a exercer uma função tóxica nas células, sendo os neurônios motores especialmente sensíveis a estas variações.

As tentativas de terapia gênica em ELA têm tido como principal alvo a correção da atividade defeituosa da superóxido dismutase. Esses experimentos só foram possíveis após o desenvolvimento de modelos animais. Eles são transgênicos que na maior parte dos trabalhos expressam o gene *SOD1* contendo a mutação G93A e apresentam fenótipo que é clínica e patologicamente semelhante ao humano. Como previamente descrito as mutações neste gene expressam proteínas com um ganho de função. Desta forma atualmente algumas terapias têm tentado inibir a ação da proteína mutante, ou seja, diminuir sua expressão ao invés de apenas tentar fazer a reposição da proteína normal.

A principal ferramenta de correção desta atividade tem sido a utilização de RNA de interferência (RNAi). Os RNAs estão envolvidos em um processo inato, conservado evolutivamente, de silenciamento pós-transcricional, ou seja, diminuição dos níveis de determinado RNAm, induzido pela presença de RNA dupla fita<sup>3</sup>. O RNA dupla fita é usado para direcionar os complexos Dicer e RISC na clivagem do RNAm que possui sequência complementar a este RNA dupla fita. Dessa forma, o RNAm não é traduzido em proteínas e, portanto, sua ação fica silenciada.

Para exemplificar os usos de RNAi podemos citar o trabalho de Ralph et al<sup>3</sup>. Neste os autores, utilizaram um vetor do tipo Lentivirus, mais especificamente vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), e mostraram que a injeção desses vetores via intramuscular é capaz de conduzi-los aos neurônios da coluna espinhal e do córtex motor por meio de transporte retrógrado, ou seja, passando dos músculos para os neurônios. Esses vetores continham sequências específicas do gene *SOD1*, que quando transcritas formavam uma estrutura em dupla fita ligada por um “grampo” (RNA dupla fita). Pela ação desse RNAi os animais transgênicos usados neste estudo, tinham dificuldades em expressar a Superóxido Dismutase mutante.

Estudos que utilizaram RNAi para o silenciamento do *SOD1* mutante, demonstraram um aumento da sobrevivência dos neurônios motores vulneráveis na espinha dorsal e córtex motor. Este silenciamento aumentou a performance dos animais tratados resultando em considerável retardo do início dos sintomas e aumento significativo da sua sobrevivência<sup>3</sup>.

Outra estratégia, proposta por Xia et al<sup>4</sup> é o silenciamento tanto do *SOD1* mutante quanto selvagem, com concomitante expressão de *SOD1* exógeno resistente a esse RNAi. O RNAm resistente foi gerado por uma mutação de troca de base, sem modificação do aminoácido e transfectado para as células em cultura. Os resultados demonstram a diminuição da expressão da Superóxido Dismutase mutante e selvagem, bem como a expressão da Superóxido Dismutase de origem exógena. Estes experimentos ainda necessitam de comprovação *in vivo*.

Recentemente foi demonstrado que níveis reduzidos do fator de crescimento endotelial (VEGF) predispõem humanos e camundongos ao desenvolvimento de ELA. O VEGF é um fator indispensável à angiogênese e parece estar envolvido com a neuroproteção<sup>5</sup>. A partir desses dados Azzouz et al<sup>5</sup> basearam-se no aumento da expressão de VEGF como forma de proteção aos neurônios em camundongos transgênicos, portadores da mutação G93A. Eles demonstraram que a aplicação de vetores de lentivírus, carregando a seqüência que codifica o VEGF, por transporte retrógrado, em determinadas musculaturas levou ao aumento na idade de início dos sintomas bem como à diminuição da progressão da doença nesses camundongos. Chama a atenção que o VEGF manteve suas características de neuroproteção, mesmo quando o tratamento foi iniciado após o início dos sintomas, especificamente neste caso quando metade dos neurônios motores já havia morrido.

Este tipo de terapia para as doenças neuromusculares promete grandes avanços nos próximos anos, entretanto vários obstáculos precisam ainda ser vencidos; como a grande quantidade de vetores necessários para eficácia do tratamento; o direcionamento dos vetores exclusivamente para os neurônios motores, a expressão contínua e não apenas transiente dos transgenes; a correção dos defeitos sem efeitos colaterais tóxicos e a aplicação dessas terapias às diferentes formas de Doença do Neurônio Motor e ELA, não se limitando apenas a alguns modelos.

### **Referências Bibliográficas**

- 1.Nance BN, Ventura AM. Terapia Gênica. Mir L (org.) Genômica. São Paulo: Atheneu, 2004, cap. 30.
- 2.Federici T, Boulis NM. Gene-based treatment of motor neuron diseases. Muscle Nerve. 2006;33(3):302-323.

3. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med.* 2005;11(4):429-433.
4. Xia XG, Zhou H, Zhou S, Yu Y, Wu R, Xu Z. An RNAi strategy for treatment of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant Cu, Zn superoxide dismutase. *J Neurochem.* 2005;92(2):362-367.
5. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature.* 2004;429(6990):413-417.