

O Tratamento das Doenças Genéticas

Nas décadas vindouras, a biologia molecular, a engenharia de proteínas e o Projeto do Genoma Humano terão um impacto enorme no tratamento das doenças genéticas e outras. Neste capítulo, portanto, faremos uma revisão geral não só das terapias padrão usadas no tratamento das doenças genéticas, mas também delinearemos estratégias novas que poderão ser usadas no futuro. Em particular, destacaremos terapias que refletem o enfoque genético da medicina. Como em todas as terapias, o objetivo do tratamento das doenças genéticas é eliminar ou melhorar os efeitos do distúrbio não só no paciente, mas também na família. Além disso, a família deve ser informada sobre o risco de que a doença possa vir a ocorrer em outros membros. Esta última responsabilidade, a consulta genética, um componente importante no tratamento dos distúrbios hereditários, será tratada em separado no Cap. 19. O tratamento preferido de algumas, e talvez de muitas, doenças monogênicas eventualmente será a terapia de transferência gênica, se o procedimento puder ser seguro e efetivo. Já foram obtidos sucessos iniciais promissores com a terapia gênica. Entretanto, mesmo quando cópias de um gene normal podem ser transferidas para o paciente para efetuar uma cura permanente, em muitos casos a família precisará de uma consulta genética continuada, de teste de portador e de diagnóstico pré-natal durante várias gerações. Para distúrbios monogênicos, o tratamento geralmente se baseia na reposição da proteína deficiente, melhorando seu funcionamento ou minimizando as consequências de sua deficiência.

SITUAÇÃO ATUAL DO TRATAMENTO DAS DOENÇAS GENÉTICAS

Doenças Multifatoriais

Para a maioria das doenças multifatoriais (ver Cap. 15), tanto os componentes ambientais quanto os genéticos da etiologia são pouco compreendidos. Quando uma contribuição ambiental é reconhecida, há uma oportunidade efetiva de intervenção, pois a exposição ao fator ambiental em geral pode ser modificada. Assim, o fumo de cigarros é um fator ambiental que todos os pacientes com enfisema devem evitar. Pelo menos um mecanismo pelo qual o fumo de cigarros leva ao enfisema foi revelado pelo estudo do distúrbio monogênico da deficiência de α_1 -antitripsina (α_1 -AT). Como foi descrito no capítulo anterior, o fumo de cigarros oxida a metionina crítica no sítio ativo de α_1 -

AT, o que reduz em 2.000 vezes sua capacidade de inibir a elastase. Assim, o fumo produz uma perda adquirida substancial da função de α_1 -AT.

A maioria das doenças com herança complexa é passível de alguma forma de tratamento cirúrgico ou médico, embora este tratamento possa não ser particularmente "genético" em seu enfoque. Um exemplo marcante de um distúrbio geneticamente complexo para o qual a terapia médica padrão é cada vez mais bem-sucedida é a diabetes melito tipo 1, na qual uma intensa terapia de reposição de insulina melhora acentuadamente o resultado (Quadro 13.1). O tratamento cirúrgico de distúrbios multifatoriais também pode ser bem-sucedido. Por exemplo, três anomalias estruturais (defeitos cardíacos congênitos, fenda labial e palatina e estenose pilórica) afetam cerca de 1,5% de todas as crianças nativas e constituem aproximadamente 30% de todos os neonatos com doenças genéticas. Muitos pacientes com estas condições podem ser curados por cirurgia, uma forma de modificação fenotípica. Em cerca de metade destes pacientes as doenças são curáveis por uma única operação. Portanto, a cura é possível em pelo menos 10% a 15% das crianças com um distúrbio geneticamente determinado. O tratamento das doenças hereditárias em geral não é tão benéfico, embora com frequência melhore a qualidade de vida. Para os distúrbios multifatoriais que se manifestam tipicamente na adolescência ou na vida adulta, tais como a hipertensão essencial, a diabetes, a doença arterial coronariana e as principais psicoses, as imperfeições do tratamento refletem nossa ignorância quanto à etiologia ou à complexidade da patogenia.

Doenças Monogênicas

O tratamento das doenças monogênicas infelizmente ainda é muito deficiente. Um levantamento de 372 distúrbios mendelianos mostrou que a terapia atual é totalmente efetiva em 12%, parcialmente efetiva em 54% e sem benefícios em 34% (Fig. 13.1). Uma tendência identificada em vários levantamentos é que o tratamento tem mais probabilidade de ser bem-sucedido se o defeito bioquímico básico for conhecido. Por exemplo, em um estudo realizado por Hayes e colaboradores em 1985, verificou-se que era possível aumentar o tempo de vida por meio de tratamento em apenas 15% das doenças monogênicas estudadas, mas em um subgrupo de 65 erros hereditários nos quais a causa era conhecida, esta porcentagem subiu para 32%. Aumentos simila-

QUADRO 13-1

O Efeito de Intensa Terapia de Reposição de Insulina nas Taxas de Três Complicações Comuns da Diabetes Melito Tipo 1

	Taxa/100 pacientes		
	Tratamento Convencional	Tratamento Intensivo	% de Redução de Risco
Retinopatia	4,7	1,2	76
Albuminúria	3,4	2,2	34
Neuropatia	9,8	3,1	69

De Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *N Engl J Med* 329:977-986. Adaptado de Scriver C. R., Treacy E. P. (1999) Is there treatment for "genetic" disease? *Mol Gen Metab* 68:93-102

res foram observados para outros fenótipos, incluindo crescimento, inteligência e adaptação social. Assim, as pesquisas para elucidar a base genética e bioquímica das doenças hereditárias têm um impacto drástico no paciente. Entretanto, em geral a terapia atual não restaura a saúde normal à grande maioria dos pacientes com um distúrbio monogênico.

O atual estado insatisfatório do tratamento das doenças genéticas deve-se a vários fatores, incluindo os que se seguem:

1. **Gene não-identificado ou patogenia incompreendida.** O locus mutante em mais de 75% das doenças genéticas é desconhecido, e o conhecimento da fisiopatologia destas doenças nas quais o gene afetado ou a anomalia bioquímica foi definida é inadequado. Na fenilcetonúria (PKU), por exemplo, a despeito de anos de estudo, os mecanismos pelos quais a elevação da fenilalanina prejudica o desenvolvimento e o

funcionamento cerebral ainda são pouco compreendidos (ver Cap. 12). Para as doenças nas quais o funcionamento da proteína afetada só foi determinado recentemente, tais como a fibrose cística e a distrofia muscular Duchenne (DMD) (ver Cap. 12), muito trabalho ainda é necessário antes que este conhecimento básico possa ser traduzido em terapia efetiva.

2. **Dano fetal pré-diagnóstico.** Algumas mutações atuam cedo no desenvolvimento ou causam uma patologia irreversível antes que sejam diagnosticadas. Estes problemas podem ser antecipados em alguns casos, se houver uma história familiar de uma doença genética ou se a triagem do portador identificar casais em risco. No último caso, o tratamento pré-natal às vezes é possível para condições médicas e cirúrgicas. As oportunidades de tratamento pré-natal, cujos exemplos são mostrados no Quadro 13.2, aumentarão à medida que o diagnóstico pré-natal (ver Cap. 18) tornar-se viável para uma gama cada vez maior de distúrbios.
3. **Os fenótipos graves são os primeiros a ser reconhecidos.** Os casos iniciais de uma doença a ser reconhecida em geral são aqueles afetados de modo mais grave, que normalmente são menos passíveis de tratamento do que aqueles afetados de maneira mais branda. Nos casos brandos, a proteína mutante pode reter alguma função residual que pode ser aumentada por várias estratégias, como será descrito mais adiante.

CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS NO TRATAMENTO DAS DOENÇAS GENÉTICAS

A Necessidade de Uma Avaliação a Longo Prazo do Tratamento

Nas doenças genéticas, talvez mais que em outras áreas da medicina, o tratamento que de início se julga bem-sucedido pode,

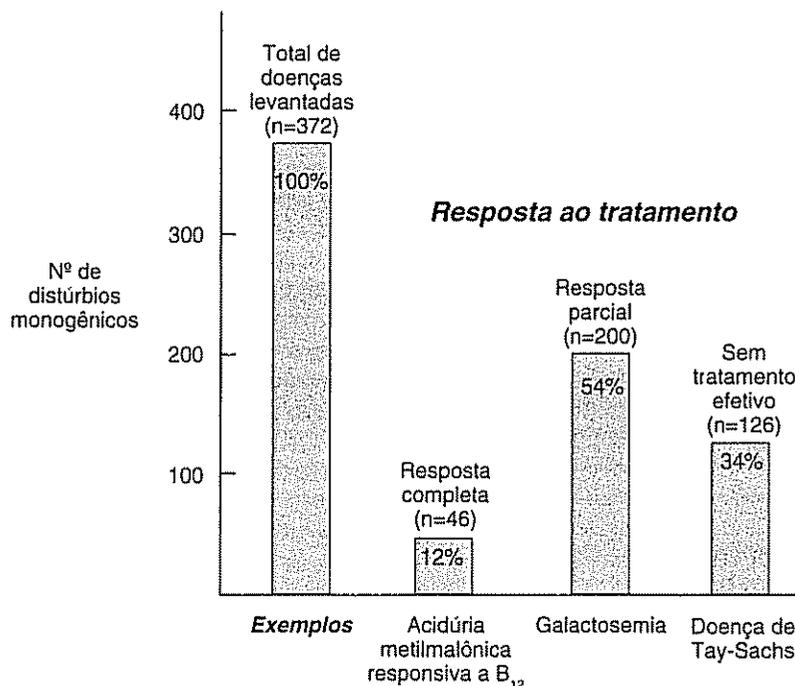


Fig. 13.1 O efeito do tratamento em 372 doenças genéticas nas quais o gene afetado ou a função bioquímica é conhecido e para as quais estão disponíveis informações suficientes para análise. A acidúria metilmalônica responsiva a B₁₂ e a doença de Tay-Sachs são discutidas no Cap. 12, e a galactosemia é descrita neste capítulo (Adaptado de Scriver C. R., Treacy E. P. [1999] Is there treatment for "genetic" disease? *Mol Gen Metab* 68:93-102)

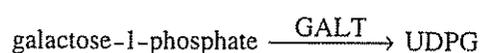
QUADRO 13-2

Exemplos de Tratamento Pré-natal de Distúrbios Herdados e Congênitos

Tratamento Médico Pré-natal		Tratamento Cirúrgico Pré-natal	
Doença	Tratamento	Doença	Tratamento
Deficiência de biotinidase	Administração materna de biotina	Obstrução urinária devida a valvas uretrais → hidronefrose	Cateter percutâneo ou vesicostomia
Acidúria metilmalônica cobalamina-responsiva	Administração materna de cobalamina	Hérnia diafragmática → hipoplasia do pulmão	Reduzir víscera e reparar diafragma
Hiperplasia adrenal congênita	Dexametasona	Síndrome de transfusão gêmeo-gêmeo → seqüestro vascular → hidropisia fetal	Separar vasos comunicantes placentários

eventualmente, demonstrar-se imperfeito. Existem pelo menos três facetas neste problema. Primeiro, o tratamento pode inicialmente parecer bem-sucedido e após uma longa observação apresentar pequenas inadequações. Assim, embora crianças com PKU bem-tratadas tenham escapado de um retardo grave e tenham um QI normal ou quase normal (ver adiante), elas em geral manifestam sutis distúrbios de aprendizagem e de comportamento que prejudicam seu desempenho acadêmico.

Segundo, ao tratamento bem-sucedido de mudanças patológicas em um órgão podem se seguir problemas inesperados em tecidos que antes não se havia observado que estavam clinicamente envolvidos porque os pacientes não haviam sobrevivido tempo suficiente para isto. A detecção das últimas manifestações pode exigir muitos anos de observação após a terapia inicial. Um distúrbio que ilustra este ponto é um erro hereditário do metabolismo de carboidratos bem conhecido, a **galactosemia**. Este distúrbio resulta da incapacidade de metabolizar a galactose, um monossacarídeo que é componente da lactose (açúcar do leite). As pessoas com esta doença autossômica recessiva não têm a enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT), que normalmente catalisa a conversão de galactose-1-fosfato em uridina difosfogalactose (UDPG):



As crianças com galactosemia em geral são normais ao nascimento, mas começam a desenvolver problemas gastrintestinais, cirrose hepática e cataratas semanas após o início do aleitamento. Se não for reconhecida, a galactosemia causa grave retardo mental e em geral é fatal. A remoção total de leite da dieta, entretanto, pode proteger contra a maioria das conseqüências prejudiciais da deficiência de GALT, embora, como acontece com a PKU, hoje se saiba que os problemas de aprendizagem são comuns mesmo nos pacientes galactosêmicos bem-tratados. Além disso, a despeito de um tratamento bem-feito, a maioria das mulheres com galactosemia tem insuficiência ovariana que parece resultar da toxidez continuada de galactose.

Outra doença que demonstra este fenômeno é a **cistinose**, que é causada pelo acúmulo de cistina no lisossomo em decorrência de um defeito no efluxo de cistina (ver Quadro 12.1). O armazenamento de cistina inicialmente leva à insuficiência renal. À medida que os pacientes que recebem transplantes renais envelhecem, entretanto, a morbidade resulta de hipotireoidismo, da doença das ilhotas que causa diabetes e de várias anomalias neu-

rológicas. Um exemplo final é dado por mutações no gene de retinoblastoma (ver Cap. 16). Os pacientes submetidos à tratamento bem-sucedido para o tumor ocular nos primeiros anos de vida correm um risco aumentado de desenvolver uma malignidade independente, o osteossarcoma, após a primeira década. Ironicamente, portanto, o tratamento que de modo bem-sucedido prolonga a vida também cria uma nova oportunidade para a expressão clínica do defeito básico, em particular em condições nas quais o gene mutante é normalmente expresso em muitos tecidos, fornecendo, assim, mais alvos potenciais para o desenvolvimento de patologia.

Terceiro, a terapia que é tida como livre de efeitos colaterais a curto prazo pode estar associada a graves problemas a longo prazo. Por exemplo, a infusão do fator de coagulação na hemofilia às vezes resulta na formação de anticorpos contra a proteína infundida, e a transfusão de sangue na talassemia invariavelmente produz sobrecarga de ferro, que pode ser tratada, mas com dificuldade.

Heterogeneidade Genética e Tratamento

O tratamento ideal para os defeitos monogênicos requer um grau incomum de precisão diagnóstica, em geral no nível da molécula afetada. Como foi descrito nos capítulos iniciais, a heterogeneidade genética (heterogeneidade alélica ou heterogeneidade de locus) é uma característica comum das doenças genéticas. Para um tratamento apropriado, em geral é crucial não só tratar uma anomalia bioquímica, mas também identificar precisamente o defeito bioquímico básico, em oposição a um defeito secundário (ver o Quadro 11.1). Por exemplo, as anomalias na fenilalanina hidroxilase e nas enzimas do metabolismo de biopterina produzem hiperfenilalaninemia, mas o tratamento dos dois tipos de defeitos é bem diferente. Mesmo as mutações alélicas podem exigir tratamentos diferentes: os distúrbios clinicamente distintos de β -globina, talassemia e anemia falciforme ilustram este conceito.

O estudo das variantes alélicas dos defeitos enzimáticos mostrou que os alelos que conservam pequenas quantidades de atividade enzimática residual em geral causam doenças bem menos graves que os alelos nulos. O contraste entre a necessidade de uma estrita restrição dietética de fenilalanina em pacientes com PKU clássica (com pouca ou nenhuma atividade enzimática residual) e a dieta normal tolerada por aqueles com hiperfenilalaninemia benigna (com cerca de 5% de atividade enzimática residual) ilustra este princípio. O corolário desta observação é que o tratamento efetivo da PKU clássica por transferência de enzi-

ma ou gene exigiria a produção ou a liberação de apenas pequenas quantidades de fenilalanina hidroxilase.

A heterogeneidade alélica tem implicações adicionais para a terapia. Alguns alelos produzem uma proteína que é diminuída em abundância, mas que tem função residual. As estratégias criadas para aumentar a expressão ou a estabilidade da proteína parcialmente funcional podem ser efetivas na correção do defeito bioquímico. Em contraste, não se ganha nada aumentando a quantidade de uma proteína mutante sem função residual. Na verdade, o aumento de expressão de uma proteína mutante sem função pode ser prejudicial, pois ela pode exercer um efeito dominante negativo (ver Cap. 12) se interagir com o produto do alelo normal, ou com outras proteínas, para impedir seu funcionamento. Esta consideração também é relevante para os esforços em transferir um gene normal para um paciente com uma doença genética. Por exemplo, no que diz respeito aos pacientes com osteogênese imperfeita, pode ser mais fácil tratar daqueles com alelos nulos por transferência gênica do que daqueles com ca-

deias de colágeno qualitativamente anormais que reduzem a contribuição efetiva do gene transferido (ver Fig. 12.21).

ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

As doenças genéticas podem ser tratadas em muitos níveis, em várias etapas distantes do gene mutante (Fig. 13.2). No restante deste capítulo, descreveremos a lógica usada ou proposta para o tratamento em cada um destes níveis. Em geral, as doenças já descritas neste livro são usadas como exemplos, embora outros distúrbios sejam apresentados pela primeira vez, quando necessário, para ilustrar um enfoque específico. Nenhum dos atuais tratamentos é necessariamente mutuamente exclusivo, embora uma terapia gênica bem-sucedida torne outras terapias supérfluas. Para as doenças nas quais se conhece o defeito bioquímico ou genético, a frequência com a qual as diferentes estratégias são usadas atualmente é mostrada na Fig. 13.3.

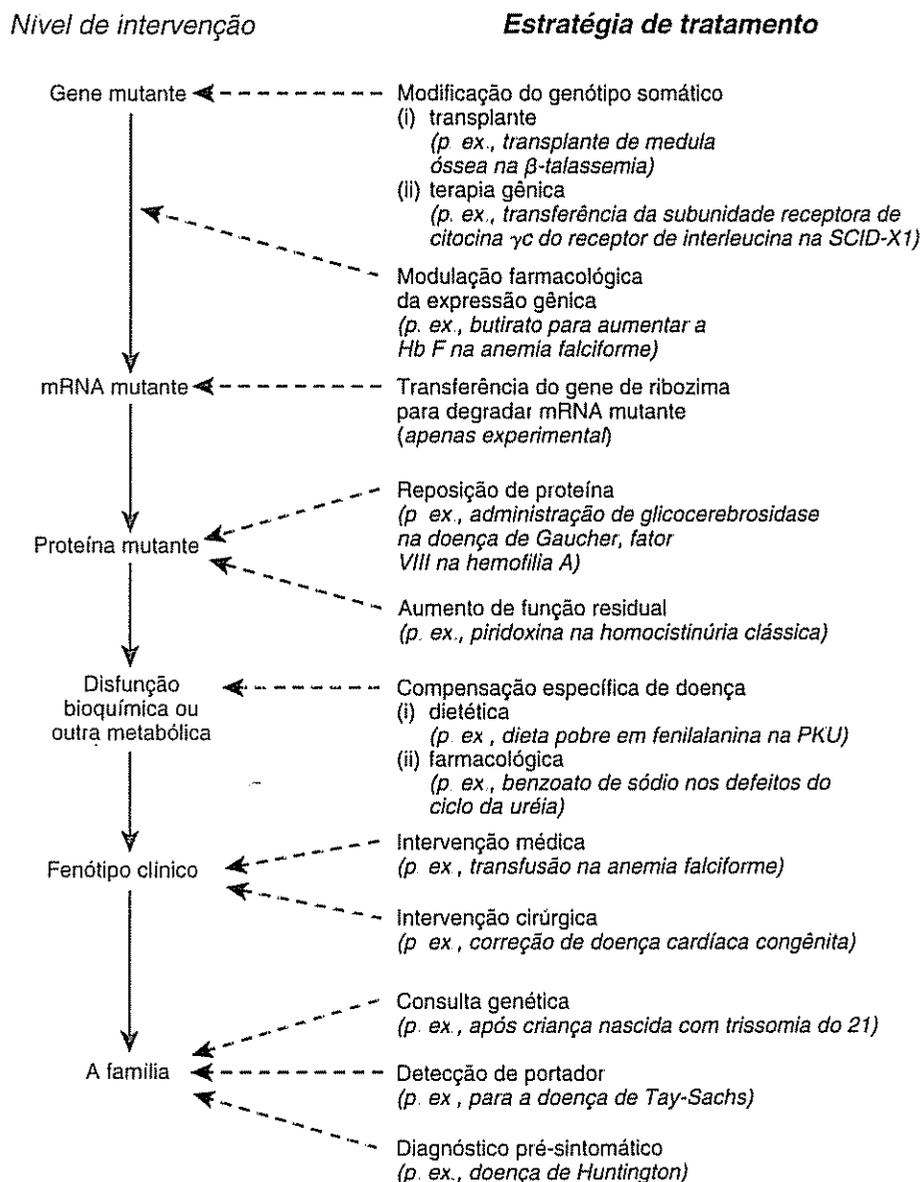


Fig. 13.2 Os vários níveis de tratamento que são relevantes para as doenças genéticas, com as correspondentes estratégias usadas em cada nível. Para cada nível, uma doença discutida no texto é dada como um exemplo (Adaptada de Valle D [1987] Genetic disease: An overview of current therapy Hosp Pract 22:167-182)

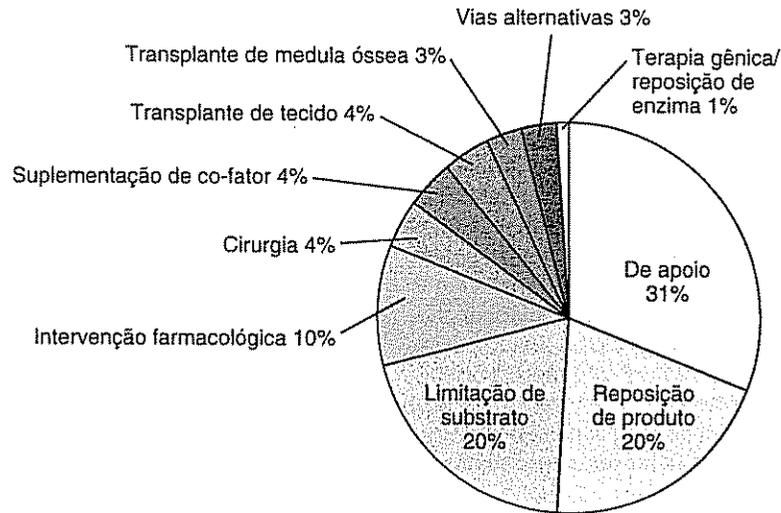


Fig. 13.3 A frequência com a qual várias estratégias terapêuticas e de tratamento são atualmente usadas para 372 distúrbios metabólicos (o mesmo grupo de distúrbios mencionados na Fig. 13.1). Se um distúrbio é tratado usando-se, por exemplo, duas estratégias, o impacto de cada estratégia no tratamento total foi estimado e alocado entre cada enfoque. (De Scriver C. R., Treacy E. P. [1999] Is there treatment for "genetic" disease? *Mol Gene Metab* 68:93-102.)

O tratamento "ao nível do fenótipo clínico" (ver Fig. 13.2) é uma categoria destinada a incluir todos os tipos de intervenção médica ou cirúrgica que não são únicas para o tratamento das doenças genéticas. Em geral, esta é a única terapia disponível e, em alguns casos, pode ser tudo o que é necessário, como descrevemos antes para algumas malformações cirurgicamente corrigíveis. Finalmente, a importância de educar o paciente não pode ser menosprezada — não só para alcançar a compreensão da doença, suas implicações gerais e seu tratamento, mas também para garantir sua cooperação com a terapia, que pode ser inconveniente e por toda a vida.

Tratamento das Doenças Metabólicas

O enfoque mais bem-sucedido para a abordagem do tratamento das doenças genéticas específicas tem sido no nível de uma ano-

malia metabólica. De fato, este conceito é bem familiar, porque se aplica a todos os *Homo sapiens*: os humanos e outros primatas, em contraste com a maioria dos mamíferos, compensam sua incapacidade de produzir ácido ascórbico (vitamina C) incluindo esta vitamina essencial em sua dieta. As principais estratégias usadas para manipular o metabolismo no tratamento de erros inatos são mostradas no Quadro 13.3. A necessidade que têm os pacientes com doenças farmacogenéticas, tais como a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, de evitar algumas drogas e substâncias químicas foi descrita no Cap. 12.

RESTRIÇÃO DIETÉTICA

A restrição dietética é um dos métodos mais antigos e mais efetivos de tratamento das doenças genéticas. Doenças que envol-

QUADRO 13-3

Tratamento de Doenças Genéticas por Manipulação Metabólica

Tipo de Intervenção Metabólica	Substância ou Técnica	Doença
Evitar	Drogas antimalarígenas Barbituratos	Deficiência de G6PD Porfíria intermitente aguda
Restrição dietética	Fenilalanina Galactose	PKU Galactosemia
Reposição	Tiroxina Biotina	Hipotireoidismo congênito Deficiência de biotinidase
Desvio	Benzoato de sódio Resinas orais	Distúrbios do ciclo da uréia Heterozigotos para hipercolesterolemia familiar
Inibição	Lovastatina	Heterozigotos para hipercolesterolemia familiar
Depleção	Aferese de LDL (remoção direta de LDL do plasma)	Homozigotos para hipercolesterolemia familiar

G6PD = glicose-6-fosfato desidrogenase; LDL = lipoproteína de baixa densidade; PKU = fenilcetonúria
Modificado de Rosenberg L. E. (1990) Treating genetic diseases: Lessons from three children *Pediatr Res* 27:S10-S16

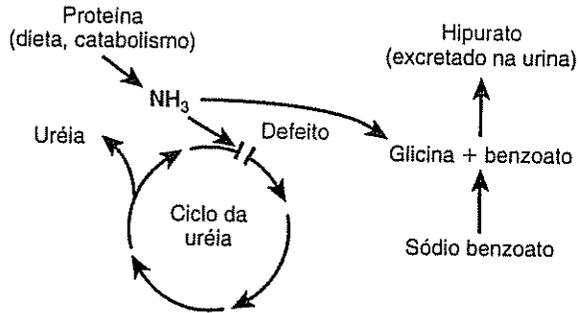


Fig. 13.4 A estratégia de desvio metabólico. Neste exemplo, a amônia não pode ser removida pelo ciclo da uréia devido a um defeito genético de uma enzima do ciclo da uréia. A administração de sódio benzoato desvia a amônia para a síntese de glicina, e a fração de nitrogênio é subsequentemente excretada como hipurato.

vem mais de 24 loci são tratadas deste modo hoje em dia. A vantagem deste enfoque é que ele pode ser altamente efetivo. Seu aspecto negativo é que em geral requer cooperação durante toda a vida para que seja mantida uma dieta restrita e normalmente artificial. As restrições dietéticas são caras para a família bem como para o paciente, especialmente na adolescência. Muitas das doenças tratáveis deste modo envolvem vias catabólicas de aminoácidos e, portanto, uma grande restrição da proteína dietética normal em geral é necessária. Nutrientes essenciais, tais como aminoácidos, entretanto, não podem ser totalmente abolidos. Sua ingestão deve ser suficiente para as necessidades anabólicas. Para este grupo de pacientes que têm defeitos enzimáticos brandos (alelos mutantes "vazantes" [*leaky*]), uma pequena fração do composto agressor em geral pode ser tolerada. Conseqüentemente, a dieta é menos restritiva e a adesão pode ser melhor. Se o precursor dietético da substância agressora não for um nutriente essencial, ele também pode ser eliminado da dieta. Um exemplo de tal composto é a galactose, que o corpo pode produzir a partir da glicose em quantidades adequadas para as pequenas necessidades dos processos bioquímicos normais, tais como a síntese de mucopolissacarídeos.

Uma dieta restrita em fenilalanina evita bem o dano neurológico na PKU clássica (ver Cap. 12). As crianças fenilcetonúricas são normais ao nascimento porque a enzima materna as protege durante a vida pré-natal. Os resultados do tratamento são melhores quando o diagnóstico é feito logo após o nascimento e o tratamento começa imediatamente. Se a criança é alimentada com uma dieta normal no primeiro mês de vida, ocorre um retardo mental irreversível. O grau de déficit intelectual está diretamente relacionado à demora na instituição de uma dieta pobre em fenilalanina. A condição mental normal dos pacientes com hiperfenilalaninemia benigna demonstra que o tratamento efetivo da PKU clássica pode ser obtido mantendo-se os níveis de fenilalanina abaixo de cerca de 0,4 mM. Sem esta orientação, seriam necessárias muitas tentativas para se estabelecer um nível "seguro" de fenilalanina plasmática na doença clássica. Hoje recomenda-se que os pacientes com PKU mantenham uma dieta pobre em fenilalanina por toda a vida, pois anomalias neurológicas e comportamentais desenvolvem-se em muitos (embora não em todos) pacientes quando a dieta é interrompida. Mesmo nos pacientes que foram tratados durante toda a vida, entretanto, hoje está claro que quando a inteligência (medida em QI) é normal, ou quase normal, ainda existem déficits neuropsicológicos (em habilidades conceituais, visuoespaciais e de linguagem). Entretanto, deve-se destacar que os procedimentos de tratamento produzem resultados muito superiores aos obtidos sem o tratamento.

REPOSIÇÃO

O fornecimento de metabólitos essenciais, co-fatores ou hormônios cuja deficiência deve-se a uma doença genética é simples em termos conceituais e, em geral, em termos de aplicação. Alguns dos defeitos monogênicos tratados de forma mais bem-sucedida pertencem a esta categoria. Um exemplo importante é dado pelo **hipotireoidismo congênito**. De 10% a 15% dele é de origem monogênica. Este distúrbio resulta de uma variedade de defeitos na formação da glândula tireóide ou de seu principal produto, a tiroxina. Como o hipotireoidismo congênito é comum (cerca de 1/4.000 neonatos) e o tratamento pode evitar o retardo mental associado, a triagem neonatal é feita em

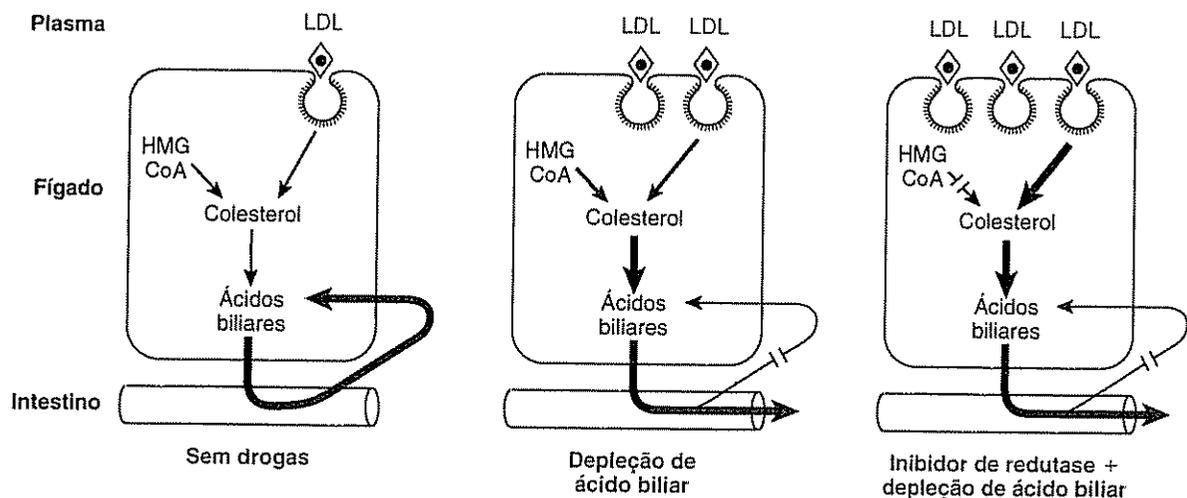


Fig. 13.5 Fundamento para o uso combinado de uma resina ligadora de ácidos biliares e um inibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase no tratamento dos heterozigotos para hipercolesterolemia familiar (De Brown M. S., Goldstein J. L. [1986] A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232:4. Copyright da Nobel Foundation.)

muitos países, de modo que a administração de tiroxina pode ser iniciada tão logo seja possível após o nascimento, a fim de evitar os graves defeitos intelectuais que de outro modo são inevitáveis. Um segundo exemplo é dado pela **deficiência de biotinidase**. A falta de atividade de biotinidase impede a recuperação de biotina das proteínas biotiniladas e, como resultado, a reciclagem deste co-fator enzimático é perturbada. A administração oral de grandes quantidades de biotina é totalmente corretiva, se for aplicada antes que se desenvolvam as graves seqüelas neurológicas.

DESVIOS

A terapia de desvios é o uso acentuado de vias metabólicas alternativas para reduzir a concentração de um metabólito prejudicial. A estratégia de desvio tem sido aplicada de modo bem-sucedido no tratamento de **distúrbios do ciclo da uréia** (Fig. 13.4). A função do ciclo da uréia é converter a amônia, que é neurotóxica, em uréia, que é um produto final benigno que é excretado. Se o ciclo for perturbado por um defeito enzimático, tal como a deficiência de argininosucinato ou liase, a hiperamoniemia conseqüente só pode ser parcialmente controlada pela restrição dietética da proteína. A amônia pode ser reduzida a níveis normais pelo desvio para vias metabólicas que normalmente são de significado secundário, levando à síntese de compostos não-prejudiciais. Por exemplo, a administração de grandes quantidades de benzoato de sódio força sua ligação com glicina a formar hipurato, que é excretado na urina (ver Fig. 13.4). A síntese de glicina é assim aumentada, e para cada mol de glicina formada, um mol de amônia é consumido.

Um enfoque similar tem sido bem-sucedido no que diz respeito a ajudar a reduzir o nível de colesterol nos *heterozigotos* para **hipercolesterolemia familiar (FH)** (revista no Cap. 12). Pelo desvio de uma fração aumentada de colesterol para síntese de bile, o único gene normal de receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) destes pacientes pode ser estimulado a produzir mais receptores hepáticos de LDL-colesterol (Fig. 13.5). O tratamento atinge uma redução significativa no colesterol do plasma porque 70% de toda a captação mediada pelo receptor de LDL de colesterol é pelo fígado. O aumento de síntese de ácidos biliares é obtido pela administração oral de resinas não-

absorvíveis, tais como a colestiramina e colestipol, que ligam ácidos biliares no intestino e aumentam sua excreção fecal.

Um princípio importante ilustrado neste exemplo é que as doenças autossômicas dominantes às vezes podem ser tratadas aumentando-se a expressão do alelo normal. Esta estratégia em geral é inefetiva nos pacientes sem o alelo normal, incluindo, por exemplo, os *homozigotos* para FH. Entretanto, os pacientes que são homozigotos para uma doença genética podem ter alguma resposta aos tratamentos usados para os heterozigotos (Fig. 13.5), se ainda houver alguma atividade residual de um dos dois alelos mutantes.

INIBIÇÃO

A inibição farmacológica das enzimas às vezes é usada para modificar as anomalias metabólicas dos erros hereditários. Este princípio também é explorado de modo efetivo no tratamento de pacientes com FH. Se forem usados métodos para diminuir a carga de colesterol desviando-o para outros compostos ou removendo-o com métodos físicos, como será descrito na seção que se segue, o fígado tentará compensar a deficiência de colesterol aumentando sua síntese. Em conseqüência, o tratamento dos heterozigotos FH é mais efetivo se a síntese de colesterol hepático for simultaneamente inibida. O desenvolvimento das estatinas — poderosos inibidores competitivos da enzima limitadora da taxa de síntese de colesterol, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase — permitiu um enfoque combinado racional que é altamente efetivo. As altas doses de estatina efetuam uma redução de 40% a 60% nos níveis de LDL-colesterol do plasma nos heterozigotos FH. Quando usada junto com a colestiramina (Fig. 13.5), o efeito é sinérgico, e diminuições maiores podem ser obtidas. A segurança a longo prazo das estatinas provou ser marcantemente boa. Como a maioria dos homozigotos FH tem pouca ou nenhuma atividade residual de receptor de LDL, as estatinas em geral são inefetivas no tratamento destes pacientes.

DEPLEÇÃO

As doenças genéticas caracterizadas pelo acúmulo de um composto prejudicial às vezes são tratadas pela remoção direta do

QUADRO 13-4

Tratamento de Doenças Genéticas no Nível da Proteína Mutante

Estratégia	Exemplo	Condição
Aumento da função da proteína mutante Administração de co-fator para aumentar a atividade enzimática	Homocistinúria responsiva à piridoxina	Tratamento de escolha em 50% dos pacientes que respondem
Reposição de proteína Reposição de uma proteína extracelular	Fator VIII na hemofilia A α_1 -antitripsina na deficiência de α_1 -antitripsina	Bem estabelecida, efetiva Infusão intravenosa (IV) para aumentar os níveis sérico/pulmonar. Bioquímica e clinicamente benéfica em muitos pacientes. A terapia com aerossol pode suplantiar a infusão IV
Reposição extracelular de proteína intracelular	Adenosina desaminase (PEG-ADA) modificada por polietileno glicol na deficiência de ADA	Bem estabelecida, segura e efetiva, mas cara
Reposição de proteínas intracelulares: direcionamento celular	Glicocerebrosidase modificada na doença de Gaucher	Estabelecida, efetiva bioquímica e clinicamente, cara

composto do corpo. Este princípio também é ilustrado pela FH. Os homocigotos FH respondem bem à remoção de LDL do plasma por um método chamado de aferese de LDL. Uma vez por semana, o plasma do paciente é passado continuamente, durante 2 a 3 horas, por colunas que removem a apolipoproteína B que contém lipoproteínas, incluindo LDL. São obtidas reduções de até 70% de LDL colesterol.

Tratamento no Nível da Proteína

Se uma proteína mutante tem alguma função residual, pode ser possível aumentar esta atividade aumentando-se a estabilidade da proteína ou a capacidade residual de função de cada molécula anormal. Nas enzimopatias, a melhoria obtida no funcionamento por este enfoque em geral é muito pequena, da ordem de alguns poucos por cento, mas normalmente este aumento é tudo do que se precisa para restaurar a homeostasia bioquímica. Logicamente, as mutações que impedem a síntese de qualquer proteína funcional não são sujeitas a este enfoque. Além disso, a maioria das proteínas não interage com ligandos "corretivos" que podem ser dados em grandes quantidades e, nestes casos, o tratamento em nível proteico pode ser obtido apenas com a substituição da própria proteína.

MELHORIA DO FUNCIONAMENTO DA PROTEÍNA MUTANTE

As anomalias bioquímicas de várias doenças metabólicas podem responder, às vezes intensamente, à administração de grandes quantidades do co-fator vitamínico da enzima prejudicada pela mutação (Quadro 13.4). Na verdade, os **erros hereditários responsivos à vitamina** estão entre as doenças genéticas tratadas de forma mais bem-sucedida. As vitaminas usadas são marcadamente atóxicas, o que em geral permite a

administração segura de quantidades 100 a 500 vezes maiores que as necessárias para a nutrição normal. Os mecanismos que contribuem para o efeito terapêutico variam com a doença. Na deficiência de biotinidase, por exemplo, a resposta ocorre porque a biotina administrada substitui a biotina que não é removida e reciclada devido à deficiência de biotinidase, a partir das enzimas às quais é ligada. Na **homocistinúria** decorrente de deficiência de cistationina sintase (ver Fig. 12.7), o mecanismo difere, pois o co-fator, o piridoxal fosfato, não é covalentemente ligado à apoenzima. Cerca de 50% destes pacientes respondem à administração de altas doses de piridoxina (vitamina B₆, o precursor de piridoxal fosfato). Na maioria destes pacientes, a homocistina desaparece do plasma. O aumento na atividade da enzima hepática é de apenas algumas vezes: em um caso, por exemplo, de 1,5% para apenas 4,5% da atividade controle. As concentrações aumentadas de piridoxal fosfato podem superar a afinidade reduzida da enzima mutante pelo co-fator (Fig. 13.6). A enzima mutante também pode ser estabilizada por sua associação com o co-fator. Em qualquer caso, o tratamento com piridoxina melhora substancialmente o curso clínico da doença nos pacientes que respondem. Nos pacientes não-responsivos em geral não há atividade residual de cistationina sintase a aumentar.

REPOSIÇÃO DE PROTEÍNA

Os principais tipos de reposição de proteínas usados hoje em dia estão resumidos no Quadro 13.4. A reposição de proteínas é parte do repertório terapêutico *rotineiro* em apenas algumas doenças, todas as quais afetam proteínas cujo principal sítio de ação é o plasma ou líquido extracelular. A prevenção ou o fim de episódios de sangramento nos pacientes com hemofilia pela infusão de frações do plasma enriquecidas do fator VIII é o exemplo princi-

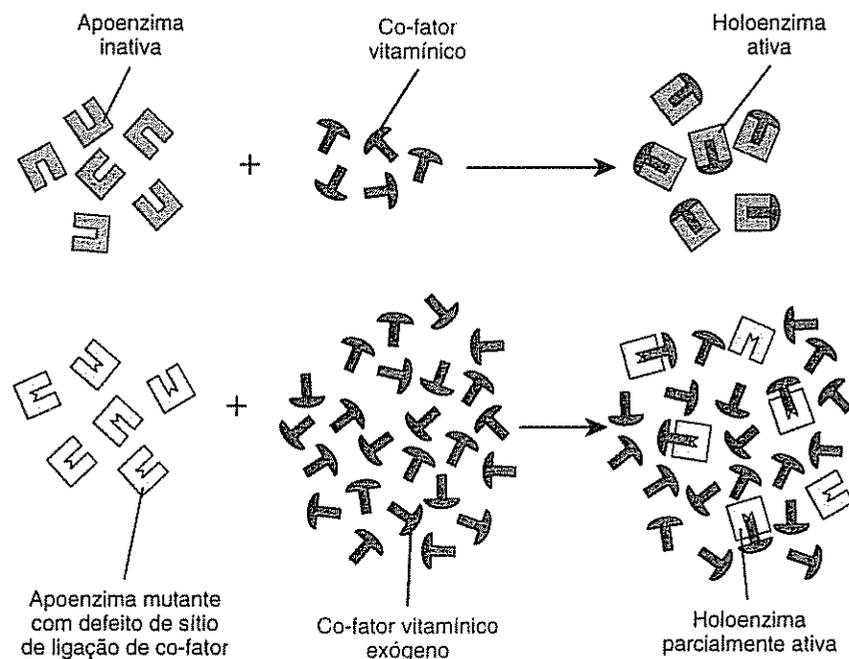


Fig. 13.6 O mecanismo de resposta de uma apoenzima mutante à administração de seu co-fator em altas doses. Os defeitos enzimáticos responsivos à vitamina em geral são devidos a mutações que reduzem a afinidade normal (*em cima*) da enzima (apoenzima) pelo co-fator necessário para ativá-la. Na presença de altas concentrações do co-fator que resultam da administração de até 500 vezes a necessidade diária normal, a enzima mutante adquire uma pequena quantidade de atividade suficiente para restaurar a normalidade bioquímica (Redesenhado de Valle D. [1987] Genetic disease: An overview of current therapy. Hosp Pract 22:167-182.)

pal. Os anos de experiência com esta doença também indicam os problemas que podem ser antecipados à medida que novas estratégias, descritas mais adiante, estimulam as tentativas de reposição de outros polipeptídeos, particularmente intracelulares. Os problemas incluem a dificuldade e o custo para procurar quantidades suficientes de proteína para tratar todos os pacientes com uma frequência ideal, a necessidade de administrar a proteína com uma frequência compatível com sua meia-vida (apenas 8 a 10 horas para o fator VIII), a formação de anticorpos neutralizantes em alguns pacientes (5% dos hemofílicos clássicos) e a contaminação da proteína com agentes exógenos, particularmente vírus (hepatite, vírus da imunodeficiência humana).

Reposição de Uma Proteína Extracelular: Deficiência de Alfa₁-Antitripsina

A α_1 -AT, descrita no Cap. 12, é o principal inibidor de elastase do neutrófilo, uma enzima proteolítica destrutiva estocada nos neutrófilos. Existem cerca de 40.000 homozigotos Z Z apenas nos EUA. Assim, a deficiência de α_1 -AT é uma causa significativa de morte prematura na população de adultos (ver Fig. 12.9). O tratamento mais efetivo da deficiência de α_1 -AT é uma modificação ambiental — evitar o fumo. O objetivo da terapia adicional é restabelecer o equilíbrio entre a elastase e a α_1 -AT pelo direcionamento da α_1 -AT ao epitélio pulmonar e líquido intersticial alveolar. Nos pacientes com deficiência de α_1 -AT, a α_1 -AT pode ser infundida por via intravenosa em doses grandes o suficiente para manter a concentração intersticial de α_1 -AT em um nível inibidor efetivo por 1 semana ou mesmo por mais tempo. Um efeito clínico significativo é observado apenas nos pacientes com prejuízo moderado (entre 30% e 65% do normal) da função pulmonar antes do tratamento. Isto é, nos pacientes com uma redução maior ou menor de funcionamento pulmonar antes do tratamento, não se observa uma diminuição significativa da perda da função pulmonar. Um enfoque ainda mais promissor é oferecido pela administração de α_1 -AT diretamente nos pulmões por inalação de aerossol. Este tratamento requer apenas 10% da dose intravenosa de α_1 -AT e atinge níveis efetivos tanto no pulmão quanto no plasma com inalações realizadas duas vezes ao dia.

Reposição Extracelular de Uma Enzima Intracelular: Deficiência de Adenosina Desaminase

A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima crucial do metabolismo de purinas que catalisa a desaminação da adenosina em inosina e da desoxiadenosina em desoxiinosina (Fig. 13.7).

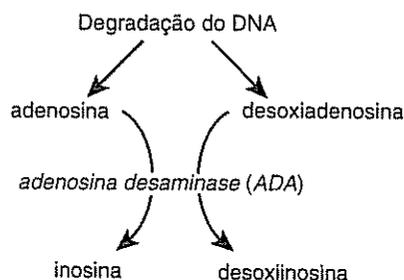


Fig. 13.7 A adenosina desaminase (ADA) converte a adenosina em inosina e a desoxiadenosina em desoxiinosina. Na deficiência de ADA, o acúmulo de desoxiadenosina nos linfócitos é linfotóxico, matando as células por prejudicar a replicação do DNA e a divisão celular para causar uma imunodeficiência combinada grave (SCID).

Os efeitos patológicos da deficiência de ADA, uma doença autossômica recessiva, resultam inteiramente de anomalias nos linfócitos, nos quais a enzima é normalmente encontrada em seus níveis mais altos. A linfotóxicidade resultante causa uma profunda insuficiência de imunidade tanto mediada por célula (célula T) quanto humoral (célula B), tornando a deficiência de ADA uma das causas da imunodeficiência combinada severa (SCID) (ver Cap. 14). Os pacientes que não são tratados morrem de infecção dentro dos primeiros 2 anos de vida. O transplante de medula óssea de um doador totalmente compatível quanto à HLA é o tratamento atual de escolha. Na ausência de um doador apropriado, um tratamento muito efetivo é a administração de ADA bovina que tenha sido modificada para aumentar sua eficácia.

Adenosina Desaminase Modificada. Numerosos estudos estabeleceram que a infusão de hemácias normais em pacientes com deficiência de ADA reduz os níveis de metabólitos tóxicos, particularmente de desoxiadenosina. Entretanto, a resposta era variável e pouco mantida. Para evitar estes problemas, a ADA bovina é modificada pela ligação covalente de um polímero inerte, o polietileno glicol (PEG). A ADA modificada por PEG tem pouca imunogenicidade, não entra nas células e tem uma meia-vida de 3 a 6 dias no plasma (em comparação com 30 minutos no camundongo normal). A terapia de reposição PEG-ADA (injeção intramuscular uma ou duas vezes por semana) quase normaliza as anomalias metabólicas no metabolismo de purina. Embora PEG-ADA não corrija completamente o funcionamento imune (muitos pacientes continuam T linfopênicos), a imunoproteção é restaurada e ocorre uma acentuada melhora clínica. Este enfoque, embora muito caro, representa uma importante estratégia nova para o tratamento de uma doença genética.

Os princípios gerais exemplificados pelo uso de PEG-ADA são (1) que as proteínas podem ser modificadas para melhorar sua efetividade como reagentes farmacológicos, sem interferir necessariamente em sua atividade biológica e (2) que uma enzima que normalmente é situada dentro da célula pode ser efetiva extracelularmente se seu substrato estiver em equilíbrio com o líquido extracelular e se seu produto puder ser captado pelas células que o necessitam. Como será ilustrado na próxima seção, a estratégia de modificação pode ser estendida a proteínas que podem funcionar apenas intracelularmente, direcionando a proteína para um tipo celular específico.

Reposição de Proteínas Intracelulares: Enzimas Direcionadas

A possibilidade de direcionar um polipeptídeo para uma célula específica e um determinado compartimento intracelular já foi demonstrada para a **doença de Gaucher**, o mais prevalente distúrbio de armazenamento lisossômico, que afeta até 1/450 judeus Ashkenazi e 1/40.000 a 1/100.000 indivíduos de outras populações. Esta condição autossômica recessiva deve-se a uma deficiência da enzima glicocerebrosidase. Seu substrato, glicocerebrosídeo, é um lipídio complexo normalmente degradado no lisossomo. Esta patologia resulta do acúmulo de glicocerebrosídeo, em particular nos lisossomos de macrófagos no sistema reticuloendotelial. O processo de armazenamento do macrófago leva a um grande aumento do fígado e do baço. Além disso, a medula óssea é lentamente substituída por macrófagos cheios de lipídeos ("células de Gaucher"), que no final comprometem a produção de eritrócitos e plaquetas, causando ane-

mia e trombocitopenia. As lesões da medula óssea causam dor episódica, osteonecrose e grande morbidade. Uma minoria de pacientes tem uma degeneração progressiva do sistema nervoso central.

A reposição de glicocerebrosidase na doença de Gaucher ilustra o desafio de direcionar uma proteína tanto para um tipo particular de célula quanto para um endereço intracelular específico, neste caso o macrófago e o lisossomo, respectivamente. A doença de Gaucher é um modelo propício ao direcionamento de proteína por vários motivos. Primeiro, como na maioria das proteínas o sistema nervoso central não está envolvido, a enzima deve ser direcionada apenas para o sistema reticuloendotelial periférico. Segundo, a única terapia alternativa no momento é o transplante de medula óssea, um procedimento relativamente de alto risco. Terceiro, a enzima humana está disponível em abundância, purificada ou da placenta ou de uma forma recombinante secretada por células cultivadas. Finalmente, a biologia do macrófago é bem compreendida o bastante para se sugerir uma estratégia de direcionamento da enzima para ele.

Mais de 2.500 pacientes estão sendo tratados hoje em todo o mundo com glicocerebrosidase, com intensos benefícios clínicos. O aumento do nível de hemoglobina de um paciente, uma resposta representativa vista na maioria dos pacientes, é mostrado na Fig. 13.8. Além de tudo, esta terapia também reduz o aumento do fígado e do baço, aumenta a contagem de plaquetas, acelera o crescimento e melhora as anomalias esqueléticas características. Este sucesso depende de uma modificação dos carboidratos que normalmente se associam a esta glicoproteína: os açúcares terminais são removidos para expor o cerne das unidades α -manosil. As manoses expostas direcionam a enzima para o macrófago, via um receptor de manose na membrana plasmá-

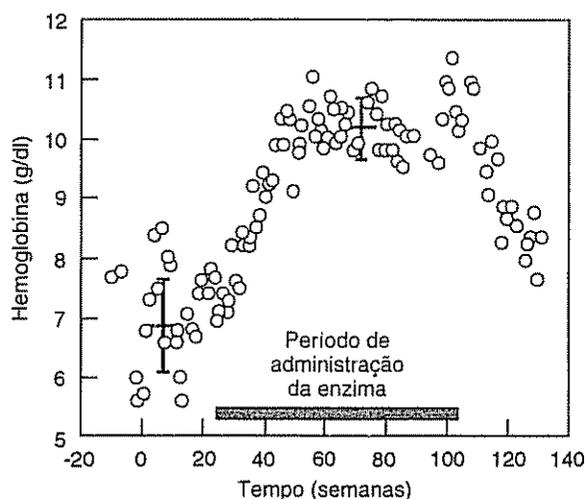


Fig. 13.8 O efeito de infusões intravenosas semanais de glicocerebrosidase modificada na concentração de hemoglobina de uma criança com doença de Gaucher sem envolvimento neurológico. O tratamento foi iniciado aos 4 anos de idade e continuou por 18 meses. A terapia foi acompanhada de um aumento na contagem de plaquetas e melhora radiológica nas anomalias ósseas. Os parâmetros hematológicos retornaram aos níveis anteriores ao tratamento quando as infusões pararam. A barra na abscissa representa o período de administração da enzima. (Redesenhado de Barton N. W., Furbish F. S., Murray G. J., et al [1990] Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci USA 87:1913-1916.)

tica. Uma vez ligada, a enzima é internalizada e dirigida ao lisossomo. Como na terapia de PEG-ADA, a reposição de glicocerebrosidase atualmente é muito cara. Entretanto, esta estratégia demonstra um princípio importante e ilustra a possibilidade de direcionar uma enzima intracelular para seu local fisiologicamente relevante, a fim de produzir efeitos clinicamente significativos. Para muitas doenças, deve ser possível usar o gene clonado para produzir grandes quantidades da proteína relevante em cultura e modificar o polipeptídeo do modo necessário para o direcionamento celular e intracelular específico.

Modulação da Expressão Gênica

Como demonstraram os erros hereditários do metabolismo responsivos a vitaminas, mesmo pequenos aumentos no funcionamento de uma proteína mutante podem ser vantajosos se ela tiver um funcionamento residual. Efeitos terapêuticos também podem ser obtidos, pelo menos em princípio, extraindo-se pequenos aumentos na quantidade de RNA mensageiro transcrito pelo locus afetado (Quadro 13.5), desde que a proteína mutante retenha alguma função residual. No momento, não existe nenhum exemplo no qual se possa demonstrar um efeito terapêutico benéfico que tenha surgido em decorrência deste mecanismo. Uma estratégia alternativa, em estudo para a anemia falciforme, é aumentar a expressão de um gene normal que compense o efeito da mutação em outro locus. Este exemplo ilustra um conceito que provavelmente é aplicável a uma variedade de condições.

Terapia de Butirato na Anemia Falciforme. A anemia falciforme causa doença tanto pela anemia quanto pelo afoiçamento das hemácias (ver Cap. 11). Duas observações sugeriram que a indução de um aumento no nível de hemoglobina (Hb) F ($\alpha_2\gamma_2$) beneficiaria os pacientes com este distúrbio. Primeiro, a HbF é um transportador de oxigênio perfeitamente adequado na via pós-natal, embora sua abundância nas hemácias adultas dos humanos normais seja baixa (< 1% da hemoglobina total). Segundo, a polimerização de desoxiemoglobina S é inibida pela HbF, e demonstrou-se que os altos níveis de HbF (a níveis de mais de 20 g/100 ml) nos pacientes com anemia falciforme de algumas partes da Índia e da Arábia Saudita melhoram a gravidade clínica da doença. (A base genética de seu aumento de expressão do gene γ , uma forma de persistência hereditária de hemoglobina fetal [ver Cap. 11], é desconhecida.)

O reconhecimento de que o butirato pode aumentar a expressão do gene de γ -globina surgiu da observação de que nas crianças com mães diabéticas as altas concentrações de plasma de ácido α -amino-n-butírico estão associadas a uma demora na mudança pós-natal do gene γ para β (ver Fig. 11.4). Subseqüentemente, vários estudos de pacientes com anemia falciforme mostraram que a administração de butirato de fato aumenta a expressão do gene de γ -globina por um mecanismo desconhecido (Fig. 13.9). Um trabalho posterior é necessário para estabelecer os benefícios a longo prazo deste tratamento e identificar os efeitos colaterais. No mínimo estas observações demonstram que, na clínica, é possível aumentar a expressão pós-natal de genes para um grau terapêuticamente significativo.

Modificação do Genoma Somático por Transplante

As células transplantadas conservam o genótipo do doador e, conseqüentemente, o transplante pode ser visto como uma for-

QUADRO 13-5

Tipo de Modificação	Exemplo	Situação
Modulação farmacológica da expressão gênica	Terapia de butirato para estimular a síntese de γ -globina (e, portanto, da HbF) na anemia falciforme e na β -talassemia	Em pesquisa
Modificação parcial do genótipo somático		
Por transplante	Transplante de medula óssea na β -talassemia Transplante de medula óssea nas doenças de armazenamento, p. ex., a síndrome de Hurler Transplante de fígado na deficiência de α_1 -antitripsina	Curativo com doador compatível em HLA; em geral, bons resultados Excelentes resultados em algumas doenças, mesmo se o cérebro for afetado, como na síndrome de Hurler Até 80% de sobrevida em 5 anos para doença genética do fígado
Por transferência gênica em tecidos somáticos	Hemofilia B	Em pesquisa: uma tentativa inicial em 3 pacientes usando injeção intramuscular de doses baixas de um vírus adeno-associado expressando fator IX levou a pequenas mudanças nas metas clínicas

ma de terapia de transferência gênica porque leva a uma modificação do genoma somático. Como o genoma do receptor permanece inalterado em todas as outras células, o receptor torna-se, de fato, um mosaico. Existem duas indicações gerais para o uso de transplante no tratamento de uma doença genética. Primeiro, as células ou órgãos podem ser transplantados *para introduzir cópias tipo selvagem de um gene* em um paciente com mutações neste gene. Esta indicação tem a irônica consequência de fazer com que um órgão aparentemente normal às vezes seja removido porque sua disfunção bioquímica está danificando outro tecido. Este é caso, por exemplo, da homozigose para FH, na qual o transplante de fígado é um procedimento efetivo, mas de alto risco. À medida que cresce a experiência com o transplante parcial (p. ex., de células hepáticas para um local ectópico), entretanto, e a terapia gênica seja bem-sucedida, os transplantes de

órgãos inteiros para esta finalidade se tornarão menos frequentes. A segunda e mais comum indicação para o transplante é a de *reposição celular*, para compensar um órgão danificado por uma doença genética (p. ex., um fígado que se torna cirrótico na deficiência de α_1 -AT). Alguns exemplos de usos de transplante na doença genética são dados no Quadro 13.5.

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA EM DOENÇAS DE NÃO-ARMAZENAMENTO

Além do amplo uso no tratamento de câncer, o transplante de medula óssea também é o tratamento de escolha para um grupo seletivo de distúrbios de deficiência imune, incluindo a SCID de qualquer tipo. Salvo algumas outras condições sem nenhuma outra terapia efetiva, seu papel no tratamento das doenças genéticas em geral é menos certo e realizado sob cuidadosa avaliação. Por exemplo, o tratamento convencional de pacientes com talassemia por meio de transfusões frequentes e quelação de ferro tem dado excelentes resultados em alguns centros. Por outro lado, ótimos resultados também têm sido obtidos com transplante de medula óssea no tratamento de pacientes com β -talassemia com menos de 16 anos. Mais de 90% dos pacientes com função hepática normal e uma história de boa quelação têm sobrevida de 3 anos livres de efeitos prejudiciais. Antes de tomar qualquer decisão sobre o melhor modo de tratamento (padrão *versus* transplante de medula óssea), deve-se fazer uma avaliação a longo prazo dos pacientes que eram relativamente saudáveis antes do início do tratamento e então foram tratados com um ou outro enfoque. O papel do transplante de medula óssea nos pacientes com alguma doença de armazenamento lisossômico será discutido mais adiante.

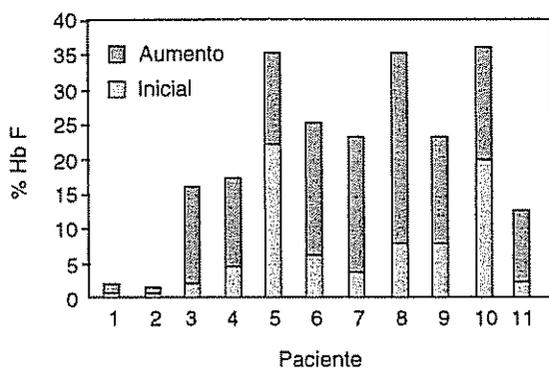


Fig. 13.9 O efeito da administração de pulsos de butirato na porcentagem de hemoglobina (HbF) em 11 pacientes com anemia falciforme. Cada barra gráfica mostra os níveis iniciais de HbF e o aumento em HbF durante a terapia nos 11 pacientes. Cada paciente recebeu a droga por 4 dias (o "pulso"), seguida de 10 a 24 dias sem ela. Os níveis de HbF aumentaram de uma média de 7.2% para uma média de 21% de butirato (Adaptado de Atweh G. F., Sutton M., Nassif I., *et al* [1999] Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. *Blood* 93:1790-1797.)

Transplante de Células-tronco Hematopóicas de Sangue da Placenta. As células-tronco são células que se auto-renovam definidas por duas propriedades: (1) elas podem se proliferar para produzir tipos celulares diferenciados de um tecido *in vivo* e, uma vez desenvolvidas, (2) podem continuar a se auto-renovar durante a vida do organismo. As células-tronco embrionárias, que podem originar o organismo inteiro, serão discutidas no Cap. 17. No momento, a única célula-tronco de relevância clínica é a célula-

tronco hematopoética, que pode reconstituir o sistema sanguíneo após o transplante de medula óssea. Embora a medula óssea há muito seja a principal fonte de células-tronco hematopoéticas transplantáveis e de células geradoras, a descoberta de que o sangue placentário (que está prontamente disponível) representa uma fonte rica de células-tronco hematopoéticas está começando a causar um impacto substancial no tratamento da malignidade e da doença genética.

O uso de sangue placentário tem três grandes vantagens sobre a medula óssea como uma fonte de células-tronco hematopoéticas. Primeiro, os receptores são mais tolerantes ao sangue placentário histoincompatível que às outras células alogênicas doadoras. Assim, o enxerto pega mesmo se até três antígenos de HLA não forem compatíveis entre o doador e o receptor. Segundo, a grande disponibilidade de sangue placentário, juntamente com o aumento de tolerância das células doadoras histoincompatíveis, amplia muito o número de potenciais doadores para qualquer receptor. Esta última característica é de particular significado para os pacientes de grupos étnicos minoritários, para os quais o grupo de potenciais doadores é relativamente pequeno. Terceiro, o risco de doença enxerto-*versus*-receptor é substancialmente reduzido usando-se células do sangue placentário como fonte doadora. É provável que o isolamento e a caracterização das células-tronco de outros tecidos, incluindo o sistema nervoso, eventualmente possibilite a reposição celular em uma ampla variedade de malignidades e doenças genéticas.

TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA EM DOENÇAS DE ARMAZENAMENTO LISOSSÔMICO

Mecanismo de Efeito. No final da década de 1980, começou a emergir um quadro cautelosamente encorajador a partir dos estudos animais e humanos de transplantes de medula óssea nas

doenças de armazenamento lisossômico. Agindo por meio dos dois mecanismos mostrados na Fig. 13.10, os transplantes de medula óssea são efetivos em corrigir o armazenamento lisossômico em muitos tecidos, incluindo, em algumas doenças, o cérebro. Primeiro, as células transplantadas são uma fonte de enzimas lisossômicas que podem ser transferidas para outras células pelo líquido extracelular, como foi inicialmente mostrado pelos experimentos de co-cultivo de Neufeld e colaboradores com células das síndromes de Hurler e Hunter (ver Cap. 12). Como as células derivadas da medula óssea constituem cerca de 10% do total da massa celular do corpo, o impacto quantitativo das enzimas transferidas delas pode ser significativo. Segundo, o sistema mononuclear-fagócito na maioria dos tecidos, se não em todos, é derivado de células-tronco da medula óssea e, assim, após o transplante de medula óssea, este sistema é de origem do doador em todo o corpo. De especial destaque são as células microgliais perivasculares do cérebro, cuja origem da medula pode responder em parte pela correção das anomalias do sistema nervoso por transplante de medula óssea em alguns distúrbios de armazenamento.

Hoje está bem estabelecido que o transplante de medula óssea corrige ou reduz as anomalias viscerais de muitas doenças de armazenamento. Por exemplo, como se poderia prever pela eficácia da terapia enzimática (já descrita), os pacientes com doença de Gaucher são curados pela transferência de enzimas conferidas pelas células da medula óssea do doador, com correções do retardo de crescimento, da dor óssea e da esplenomegalia. Uma normalização ou redução comparável no tamanho do fígado, do baço, e do coração também é obtida na síndrome de Hurler (ver Cap. 12), e melhorias na obstrução das vias aéreas superiores, na mobilidade das articulações e na opacidade da córnea também são alcançadas. As anomalias esqueléticas da síndrome de Hurler em geral

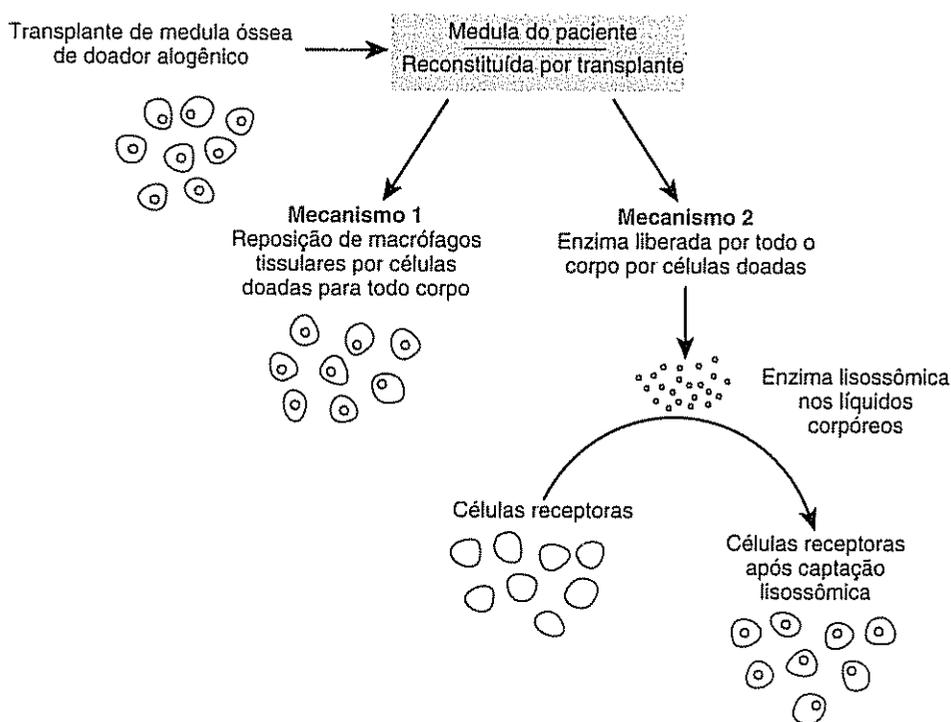


Fig. 13.10 Os dois principais mecanismos pelos quais o transplante de medula óssea ou a transferência gênica para a medula óssea podem reduzir o acúmulo de substrato nas doenças de armazenamento lisossômico. A medula óssea transfectada expande-se para repopular o sistema monócito-macrófago do paciente. Além disso, as enzimas lisossômicas são liberadas pelas células da medula óssea derivadas do doador e captadas pelas células deficientes da enzima do líquido extracelular.

não são corrigidas pelo transplante de medula óssea, entretanto, e esta ausência de efeito sobre as doenças esqueléticas também ocorre com outras doenças de armazenamento.

O resultado mais recompensador após o transplante de medula em pacientes com doença de Hurler é o efeito deste tratamento no cérebro. Os pacientes com síndrome de Hurler que têm bons índices de desenvolvimento antes do transplante e que se submetem ao transplante antes dos 24 meses de idade continuam a se desenvolver cognitivamente após o transplante, em contraste com a perda inexorável da função intelectual que ocorreria de outro modo. Curiosamente, um efeito de dosagem gênica é manifesto na medula doada: as crianças que recebem células de doadores normais homocigotos parecem ter mais probabilidade de reter uma inteligência totalmente normal que os receptores de células doadoras heterólogas.

Um efeito ainda mais acentuado no componente neurológico de uma doença de armazenamento tem sido observado após o transplante de medula óssea de pacientes com a forma de manifestação tardia de leucodistrofia de célula globóide (ou doença de Krabbe), um distúrbio degenerativo da substância branca. Os pacientes com a forma de manifestação tardia desta doença, que se deve a uma deficiência da enzima galactocerebrosidase, têm um início clínico entre 0,5 e 3 anos de idade. O distúrbio caracteriza-se por uma degeneração progressiva da mielina periférica e central, espasticidade, demência e neuropatia periférica. Os pacientes que sofreram transplantes não só tiveram uma parada do processo da doença como também uma melhora ou normalização dos tremores, da ataxia, da descoordenação motora e de outras anomalias. Além disso, os defeitos estruturais da substância branca no cérebro destes pacientes em geral são reversíveis (Fig. 13.11). O sucesso dos transplantes de medula óssea no tratamento de alguns distúrbios de armazenamento indicam a eficácia da terapia de transferência

gênica em muitas destas condições. Neste caso, o gene de interesse será transferido para as células do paciente cultivadas, precedendo o transplante de medula.

TRANSPLANTE DE FÍGADO

Para algumas doenças hepáticas metabólicas, o transplante de fígado é o tratamento de escolha, porque é o único tratamento benéfico conhecido. Por exemplo, a doença hepática crônica associada à fibrose cística e à deficiência de α_1 -AT só pode ser tratada com transplante hepático, e juntos estes dois distúrbios são responsáveis por uma grande fração de todos os transplantes de fígado feitos na população pediátrica. O transplante de fígado tem sido feito para duas dúzias de doenças genéticas. No momento, a taxa de sobrevivência de 5 anos para todas as crianças que receberam transplante de fígado está na faixa de 70% a 85%. Para quase todos estes pacientes, a qualidade de vida em geral é muito melhorada, a anomalia específica que determinou o transplante é corrigida (como nos homocigotos para FH) e, nas condições nas quais ocorreu o dano hepático (tais como a deficiência de α_1 -AT), o fornecimento de um tecido hepático saudável restaura o crescimento e o desenvolvimento puberal normal.

OS PROBLEMAS E O FUTURO DOS TRANSPLANTES

Existem dois grandes problemas que limitam o uso mais amplo dos transplantes. Primeiro, a mortalidade após o transplante é significativa e a morbidade por infecções decorrentes da necessidade de imunossupressão e da doença hospedeiro-*versus*-enxerto são substanciais. A meta final das pesquisas relativas aos transplantes — transplantes sem imunossupressão — está cada vez mais próxima, e se isto for alcançado a condição terapêutica atual de mui-

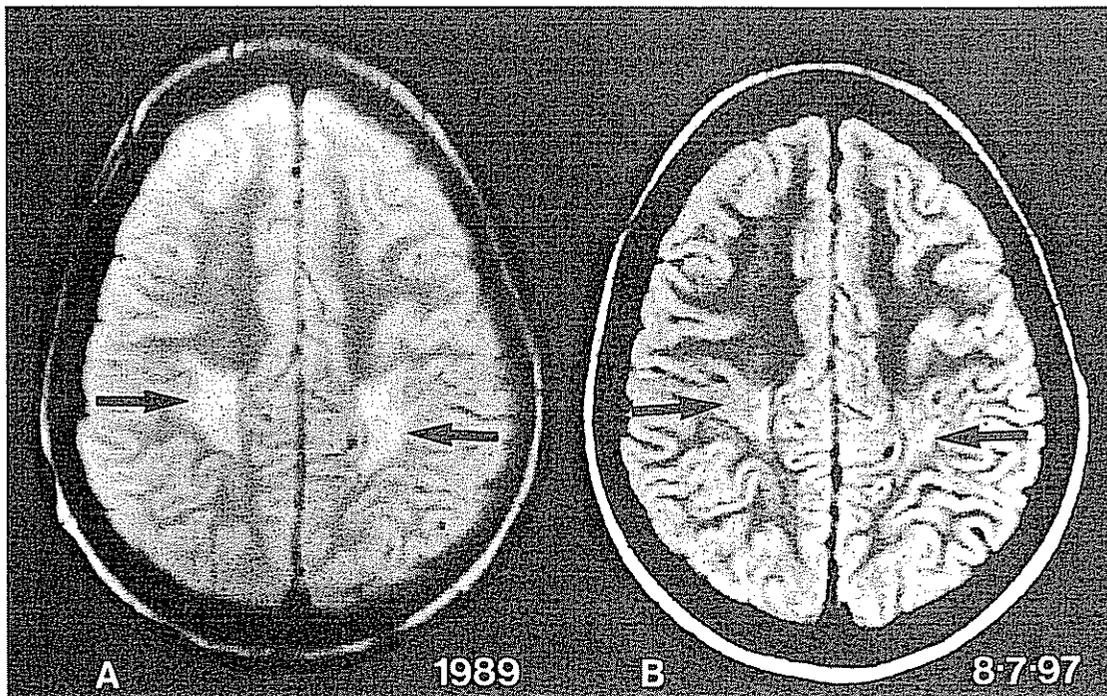


Fig. 13.11 O efeito do transplante de medula óssea nas anomalias da substância branca em um paciente com a forma de manifestação tardia da leucodistrofia de célula globóide. Oito anos após o transplante o aumento do sinal de substância branca visto antes do tratamento está bem reduzido (De Krivit W *et al* | 1998 | Hematopoietic stem-cell transplantation in globoid cell leukodystrophy. *N Eng J Med* 338:1119-1126. copyright © 1998 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

tas doenças, tanto genéticas quanto adquiridas, será transformada. A tolerância aumentada do receptor às células-tronco do sangue do cordão umbilical do doador (comparada com as células doadas derivadas de medula óssea) exemplifica os avanços nesta área. Além da necessidade de imunossupressão, um segundo problema é o suprimento finito de órgãos. Por exemplo, para todas as indicações, entre 4.000 e 5.000 transplantes de fígado podem ser necessários anualmente apenas nos EUA. Além disso, ainda permanece por ser demonstrado que os órgãos transplantados em geral são capazes de funcionar normalmente durante toda a vida.

Uma solução que evitaria muitos dos problemas associados aos transplantes isogênicos envolve a combinação de terapia com células-tronco e a gênica. Nesta situação, as próprias células-tronco do paciente seriam cultivadas *in vitro*, transfectadas por terapia gênica com o gene de interesse e retornadas ao paciente para repopular o tecido afetado com células geneticamente restauradas. A identificação das células-tronco em uma variedade de tecidos humanos adultos e os recentes avanços na terapia de transferência gênica são muito promissores a este respeito.

Terapia Gênica



A tecnologia do DNA recombinante possibilitou considerar a correção das doenças genéticas no nível mais fundamental, o gene. A terapia gênica é a introdução de um gene em uma célula com o fim de obter um efeito terapêutico. Transferindo cópias funcionais do gene relevante para o paciente, a correção de características reversíveis do fenótipo mutante deve, em princípio, ser possível. A cura genética *permanente* de uma doença humana herdada ainda não foi demonstrada, mas muitas tentativas clínicas estão sendo feitas para avaliar tanto a eficiência quanto a eficácia da terapia de transferência gênica. As principais conclusões de um painel do National Institutes of Health em 1995 sobre a situação e as perspectivas da terapia gênica ainda estão de pé: o progresso neste campo tem sido lento, a ênfase das pesquisas nem sempre tem sido apropriada e as primeiras notícias de eficácia foram superestimadas. Entretanto, o painel concluiu que a longo prazo a terapia gênica é promissora para o tratamento de doenças humanas.

Os estudos pré-clínicos em animais e as tentativas iniciais em humanos sugerem que a terapia gênica será bem-sucedida em vári-

as doenças, embora muitas dificuldades tenham que ser superadas. Como descrito mais adiante, uma tentativa em dois pacientes com uma forma de SCID parece ter corrigido a doença, pelo menos a curto prazo. Um outro estudo de terapia gênica do fator IX em três pacientes com hemofilia B não teve efeitos prejudiciais e apresentou uma modesta melhoria clínica. Nesta seção, destacaremos o potencial, os métodos e as prováveis limitações da transferência gênica para o tratamento das doenças genéticas humanas. Os requisitos mínimos que devem ser atendidos antes que o uso da transferência gênica possa ser considerado para o tratamento de um distúrbio genético são apresentados no box (ver adiante).

TERAPIA GÊNICA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A meta da terapia gênica é melhorar a saúde do paciente pela correção do fenótipo mutante. Para este fim, é necessário o endereçamento do gene normal para as células *somáticas* apropriadas (em oposição à linhagem germinativa). Independente das dificuldades éticas e técnicas envolvidas, não é necessário nem desejável alterar a linhagem germinativa do paciente que está sendo tratado de uma doença genética. Um risco é que qualquer esforço para integrar uma cópia normal de um gene à linhagem germinativa (ou a um zigoto) teria um risco substancial de introduzir uma mutação nova.

A introdução de um gene nas células somáticas pode ser necessária para um dentre três propósitos (Fig. 13.12). Primeiro, a terapia gênica deve ser capaz de **compensar** um gene celular mutante que tenha uma mutação de perda de função. Para tais doenças, a introdução de cópias normais funcionais de um gene seria suficiente para corrigir um fenótipo reversível, tal como o aumento do nível de fenilalanina na PKU (neste caso, o gene ou genes mutantes do paciente são deixados no local). Nestes casos, em geral não seria importante em que lugar do genoma de uma célula o gene transferido seria inserido. Para funcionar em uma célula na qual foi introduzido, o produto do gene transferido precisaria ter acesso a co-fatores apropriados ou a outras moléculas essenciais para seu funcionamento. Por exemplo, o co-fator para a fenilalanina hidroxilase, a tetraidrobiopterina ou BH₄ (ver Cap. 12), teria que ser dado oralmente se esta enzima fosse introduzida na medula óssea ou nas células musculares, que normalmente não produzem BH₄.

Requisitos Mínimos da Terapia Gênica Para um Distúrbio Genético

1. Identificação do locus afetado ou pelo menos da base bioquímica do distúrbio.
2. Um clone de DNA complementar (cDNA) do gene, o próprio gene (particularmente se não for grande) ou uma versão funcional do gene do qual foram removidos os componentes que não são cruciais para reduzir seu tamanho.
3. Um prejuízo substancial da doença e uma relação risco/benefício favorável em comparação com a terapia alternativa.
4. Um conhecimento suficiente da base molecular da doença para se ter segurança de que a transferência gênica tem probabilidade de melhorar ou corrigir a patologia bioquímica e evitar ou reverter as anomalias fenotípicas críticas. Embora as mutações de perda de função vão exigir a substituição por um gene funcional, alguns alelos dominantes, tais como os alelos dominantes negativos, vão exigir a inativação do gene mutante ou de seus produtos.
5. Componentes reguladores apropriados para a transferência gênica. Uma rígida regulação do nível de expressão gênica é relativamente sem importância em algumas doenças e crucial em outras. Na talassemia, por exemplo, a hiperexpressão do gene transferido causaria um novo desequilíbrio de cadeias de globina, enquanto os baixos níveis de expressão seriam inefetivos. Em contraste, em algumas enzimopatias, os níveis anormalmente altos de expressão podem não ter efeito adverso.
6. Uma célula-alvo apropriada com, em termos ideais, uma meia-vida longa ou bom potencial replicativo *in vivo*.
7. Dados adequados de células cultivadas e estudos animais para indicar que o vetor, o gene construído e a célula-alvo são tanto eficazes quanto seguros.
8. Revisão do protocolo e aprovação por uma comissão institucional de revisão e, em muitos países, uma supervisão de uma agência governamental.

Segundo, a terapia gênica pode ser feita para **substituir ou inativar** um gene mutante dominante cujo produto anormal causa a doença (geralmente dominante). A substituição de todo um gene mutante ou de parte dele no locus normal é muito mais difícil. Esta estratégia seria necessária, por exemplo, para substituir um gene de doença de Huntington contendo uma repetição CAG ampliada ou pelo menos a maior parte da própria expansão CAG. Como alternativa, a "cirurgia" gênica deste tipo também poderia ser obtida pela modificação ou degradação do RNA mutante e não do gene que o codifica. Por exemplo, a degradação seletiva de um mRNA mutante que codifica um pró- α_1 (I) dominante negativo que causa a osteogênese imperfeita (ver Cap. 12) deveria, em princípio, evitar as anomalias ósseas deste distúrbio. Os genes terapêuticos que codificam as enzimas de RNA, ou ribozimas, destinadas a degradar apenas o mRNA do alelo mutante mostraram-se muito promissores nos estudos laboratoriais. Embora tais métodos provavelmente sejam factíveis, este tipo de pesquisa de terapia gênica ainda está em seus estágios iniciais. Terceiro, a terapia gênica deve ser mais amplamente usada para obter um **efeito farmacológico** para contrabalançar os efeitos de um gene celular mutante ou para compensar de algum outro modo a patogenia da doença. Os pacientes com doenças adquiridas, inclusive o câncer, provavelmente serão beneficiados por esta estratégia (ver Fig. 13.12, B-D).

Nesta discussão, usamos o termo "gene transferido" para nos referir a qualquer DNA construído que contenha as seqüências codificantes do gene em questão, sob o controle dos elementos reguladores apropriados. Com mais freqüência, um gene transferido consiste em um cDNA sob o controle de um promotor que pode não ser necessariamente o promotor natural do gene (Fig. 13.13). Os elementos reguladores devem ser escolhidos de modo que o gene seja transcrito nas células-alvo em níveis adequados e, se necessário, responda a sinais reguladores essenciais.

A CÉLULA-ALVO

Uma das considerações cruciais na escolha de uma célula-alvo apropriada é que ela tenha uma meia-vida longa *in vivo* ou um potencial replicativo significativo, de modo que o efeito biológico da transferência possa ser de duração útil. As células-alvo ideais são células-tronco (que são auto-replicativas) ou células geradoras com substancial potencial replicativo. A introdução do gene nas células-tronco pode resultar na expressão do gene transferido em uma grande população de células filhas. No momento, a medula óssea é o único tecido para o qual podem ser usadas células-tronco ou células geradoras como receptoras dos genes transferidos. A transferência de medula óssea será apropriada tanto para doenças que afetam células sanguíneas, tais como a talassemia e anemia falciforme, quanto para outras doenças que não envolvem o sistema sanguíneo em si (p. ex., a PKU). No último caso, a circulação levaria o substrato para a enzima na medula e também removeria o produto. A terapia de transferência gênica para as células-tronco do sangue provavelmente também é efetiva para o tratamento de doenças de armazenamento, para as quais o transplante de medula óssea tem sido efetivo (ver discussão anterior).

Outras estratégias devem ser usadas para as células que não podem se dividir muito em cultura e então ser reimplantadas no paciente, ou que não têm células-tronco identificáveis ou células geradoras no animal maduro. Por exemplo, os hepatócitos podem ser mantidos por um breve período em culturas primárias transfectadas com um gene e então são retornadas para o animal. Como alternativa, a introdução direta do gene nas células-

alvo *in vivo* (p. ex., por injeção) foi demonstrada em muitos tipos de células, incluindo o fígado e o músculo. As células endoteliais podem se revelar como alvos particularmente úteis para a transferência gênica porque revestem as paredes dos vasos sanguíneos. O produto proteico de um gene expresso nas células endoteliais pode ser liberado na circulação para atingir um efeito sistêmico. Uma consideração logística importante surge com todos estes enfoques: o número de células nas quais o gene deve ser introduzido tem que ser muito grande. Por exemplo, o número aproximado de células hepáticas para as quais o gene deve ser transfectado para corrigir um típico erro hereditário do metabolismo, tal como a PKU, é de cerca de 5% da massa de hepatócitos, ou cerca de 10^{10} células (supondo-se que o nível de expressão do gene transferido é similar ao do tipo selvagem).

Não se deve esquecer que a célula-alvo também deve fornecer quaisquer proteínas adicionais ou ligandos necessários à atividade biológica do polipeptídeo (ver Quadro 11.1).

ESTRATÉGIAS DE TRANSFERÊNCIA GÊNICA

Um gene apropriadamente criado deve ser transferido para as células-alvo por uma de duas estratégias gerais (ver Fig. 13.13). A primeira envolve a introdução *ex vivo* do gene nas células que foram cultivadas do paciente, as quais são reintroduzidas após a transferência gênica. No segundo enfoque, o gene é injetado diretamente *in vivo* no tecido ou no líquido extracelular de interesse (do qual é seletivamente captado pelas células-alvo). O direcionamento deste tipo em geral é obtido modificando-se o envoltório de um vetor viral, de modo que apenas as células destinadas ligam-se às partículas virais.

TRANSFERÊNCIA DE DNA NAS CÉLULAS: VETORES VIRAIS

O vetor ideal para a terapia gênica tem que ser seguro, prontamente feito, de fácil introdução no tecido-alvo apropriado e precisa gerar uma longa expressão do gene de interesse em níveis apropriados. No momento, não foi identificado nenhum vetor, viral ou não-viral, que atenda a todos estes critérios. Na verdade, provavelmente nenhum vetor isolado é satisfatório em todos os aspectos para todos os tipos de terapia gênica (ver Fig. 13.12), e é provável que um repertório de vetores seja necessário. Aqui, veremos resumidamente três das classes de vetores virais mais usadas, as derivadas de **retrovírus**, **adenovírus** e **vírus adeno-associados**.

Uma das classes de vetores mais usadas é derivada dos retrovírus, vírus simples a RNA com apenas três genes estruturais que podem ser removidos e substituídos pelo gene a ser transfectado (ver Fig. 13.13). Uma vantagem importante dos vetores virais é que eles são capazes de entrar em praticamente cada célula da população-alvo. A geração atual de vetores retrovirais foi projetada para se tornar incapaz de replicação. Seus outros méritos incluem os seguintes fatos: não são tóxicos para a célula, apenas um baixo número de cópias do DNA viral (com o gene transferido) se integra ao genoma hospedeiro, o DNA integrado é estável e os vetores retrovirais podem acomodar grandes segmentos de DNA adicionado (de até 8 kb), sendo espaçosos o suficiente para acomodar muitos genes (mas nunca todos) que poderiam ser transferidos. Uma limitação importante de muitos vetores retrovirais é que o DNA viral não se integra ao DNA hospedeiro das células que não se dividem, o que impede o uso de tais vetores em muitos tecidos. Os **lentivírus**, entretanto, a classe de retrovírus que inclui o vírus da imunodeficiência humana, podem ser capazes de se integrar ao DNA de muitas células de divisão

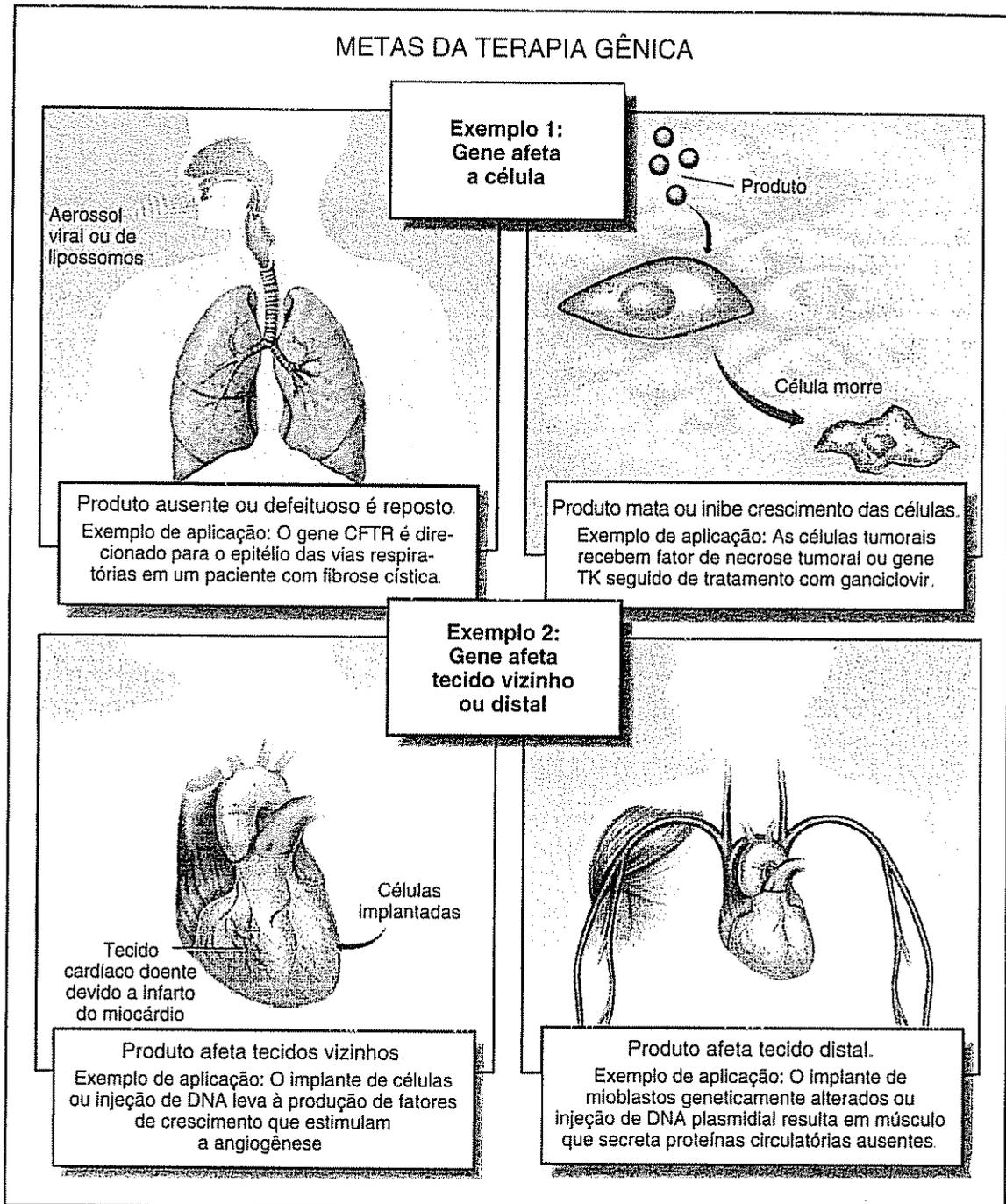


Fig. 13.12 Quatro tipos de terapia gênica. CFTR indica o regulador de condutância transmembranar de fibrose cística e TK indica timidina cinase do vírus da herpes simples. O exemplo D ilustra a estratégia usada em um dos primeiros experimentos de terapia gênica humana que comprovadamente teve algum benefício clínico, a injeção e a expressão do gene do fator IX no músculo de pacientes com hemofilia B (ver texto) (Reproduzido com permissão de Blau H. M., Springer M. L. [1995] Gene therapy — a novel form of drug delivery. *N Engl J Med* 333:1204-1207. copyright © 1995 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

lenta ou células que não se dividem, incluindo os neurônios. Os primeiros trabalhos experimentais oferecem a esperança de que estes vetores possam de fato ser adequados ao tratamento de distúrbios neurológicos.

Os vetores adenovirais têm as vantagens de poderem ser obtidos em alto título, de infectarem uma grande variedade de tipos celulares, com ou sem divisão, e de poderem acomodar inserções de 30 a 35 kb. Sua principais limitações são ser episômos e expressos apenas temporariamente (semanas) nas célu-

las-alvo e o fato de as proteínas virais provocarem fortes respostas imunes e inflamatórias. Os vírus adeno-associados, em contraste, são muito comuns na população humana e não têm efeitos adversos conhecidos. Além disso, infectam células com e sem divisão em uma administração *in vivo* e podem existir seja epissômica ou estavelmente integrados ao cromossomo hospedeiro. As desvantagens incluem o fato de que os atuais vetores virais adeno-associados podem acomodar inserções de até 5 kb apenas.

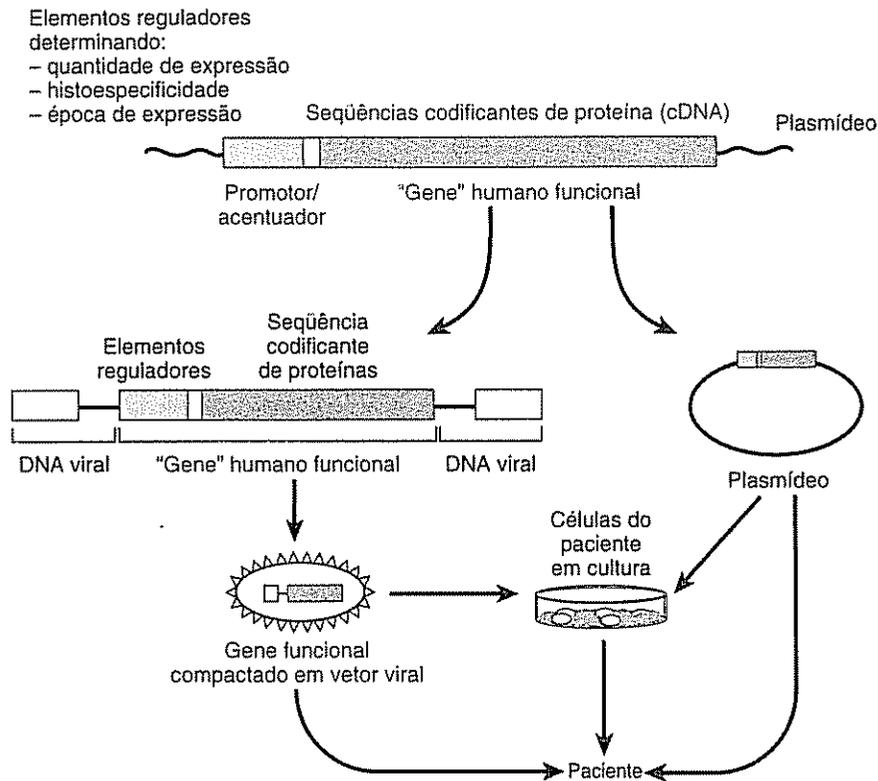


Fig. 13.13 As duas estratégias que podem ser usadas para transferir um gene para um paciente com uma doença genética, com base na expressão de um gene humano modificado para uso na transferência gênica usando um vetor plasmidial (direita) ou com base em um vetor retroviral contendo um cDNA humano (esquerda). Os componentes virais no final da molécula são necessários para a integração do vetor no genoma do hospedeiro

TRANSFERÊNCIA DE DNA PARA AS CÉLULAS: VETORES NÃO-VIRAIS

Em princípio, os vetores não-virais são atraentes porque não têm riscos biológicos (p. ex., contaminação viral) associados aos vetores virais e porque sua preparação, pelo menos teoricamente, é mais direta. Os vetores não-virais são de quatro tipos gerais:

1. **DNA descoberto**, por exemplo, um cDNA com elementos reguladores em um plasmídeo;
2. **DNA embalado em lipossomos**, uma camada dupla contínua de lipídeos envolvendo um volume aquoso;
3. **Conjugados proteína-DNA**, nos quais o DNA forma complexo com uma proteína — tal como um peptídeo que se liga a um receptor de superfície celular —, o que facilita a entrada do complexo nas células ou em um compartimento subcelular; e
4. **Cromossomos artificiais**, nos quais os componentes funcionais mínimos de um cromossomo natural (ver Cap. 3) são combinados ao cDNA ou gene de interesse, com os elementos reguladores apropriados

Embora o potencial dos vetores não-virais seja substancial, seu sucesso geral tem sido limitado. As principais dificuldades são: o DNA introduzido por estes vetores tende a ser captado por lisossomos e degradado e, além disso, o DNA que escapa deste destino não é eficientemente captado pelo núcleo. Além do mais, cada um dos sistemas não-virais tem seus problemas característicos. Por exemplo, o endereçamento de DNA descoberto é al-

tamente ineficiente, embora possa ser muito útil se puder ser injetado diretamente no tecido de interesse e quando é necessário apenas um efeito passageiro, como no tratamento de malignidades. Os lipossomos são difíceis de direcionar para o tecido de interesse, e o planejamento e a construção de cromossomos artificiais ainda estão em um estado inicial. Além disso, a introdução de grandes cromossomos artificiais (potencialmente bem acima de um megabase de tamanho) em um número substancial de células é difícil, exceto por injeção direta. Assim, a tecnologia e a biologia de vetores não-virais ainda está em estágio muito inicial para nos permitir definir seu verdadeiro potencial de tratamento de doença.

RISCOS DE TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica para o tratamento de doenças humanas tem riscos tanto demonstrados quanto teóricos que são de três tipos gerais. Primeiro, pelo menos um paciente morreu, aparentemente de uma reação adversa ao vetor adenoviral com o qual foi injetado. Assim, a principal preocupação é que o paciente tenha uma reação adversa ao vetor ou ao gene transferido. Tais problemas devem ser amplamente antecipados com estudos animais e humanos preliminares apropriados. Segundo é a preocupação de que o gene transferido se integre ao DNA do paciente e ative um proto-oncogene ou perturbe um gene supressor tumoral, possivelmente levando à malignidade (ver Cap. 16). A expressão ilícita de um oncogene tem menos probabilidade de ocorrer com a geração atual de vetores virais, os quais foram alterados para diminuir a capacidade de seus promotores de ativar a expressão de genes hospedeiros adjacentes. A ativação insercional de um

gene supressor tumoral provavelmente é infrequente e, como tal, é um risco aceitável nas doenças para as quais não há alternativa terapêutica.

Um terceiro risco — que a ativação insercional possa perturbar um gene essencial — em geral não tem efeito significativo, pois tais mutações letais são raras e matarão apenas algumas células. Como o sítio de integração de um vetor viral é mais ou menos aleatório, há pouca chance de que o mesmo gene seja danificado em mais de uma célula. A única exceção a esta situação aplica-se à linhagem germinativa: uma inserção em um gene da linhagem germinativa poderia criar uma mutação dominante causadora de doença. Tais eventos, entretanto, provavelmente são raros e o risco é aceitável, pois seria difícil justificar a recusa de tentativas cuidadosamente planejadas e revisadas de terapia gênica a pacientes que não têm outro recurso. Além disso, o problema da modificação da linhagem germinativa pelo tratamento para doenças não está confinado à terapia gênica. Por exemplo, a maior parte da quimioterapia usada no tratamento de malignidades é mutagênica, mas este risco é aceito devido aos benefícios terapêuticos.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Como em qualquer tratamento novo, as propostas de tentativas de transferir genes para pacientes devem ser submetidas a um rigoroso escrutínio pelas agências reguladoras e pelos comitês de ética hospitalar. Entretanto, quase todas as agências governamentais e religiosas que examinaram as propostas para a terapia gênica humana de tratamento de doenças genéticas concordaram que esta oportunidade terapêutica deve ser perseguida. Em contraste com a transferência de genes para a linhagem germinativa, a terapia de células somáticas levanta alguns aspectos éticos que não são rotineiramente considerados quando outra terapia nova é avaliada (p. ex., uma nova droga contra o câncer).

ALGUMAS DOENÇAS CANDIDATAS À TERAPIA GÊNICA

Muitos distúrbios monogênicos, alguns dos quais já foram mencionados na discussão anterior, são candidatos potenciais à correção por terapia gênica. Eles incluem condições hematopoéticas tais como a talassemia, a hemofilia e várias formas de imunodeficiência, bem como distúrbios tais como a PKU, os distúrbios do ciclo da uréia, a FH e a deficiência de α_1 -AT, cada uma afetando proteínas produzidas no fígado. Considerações adicionais relevantes ao uso da terapia gênica para quatro distúrbios importantes são destacadas aqui.

Imunodeficiência Combinada Grave. A primeira cura possível de uma doença herdada pela terapia gênica foi relatada no início de 2000. Cada um dos dois pacientes tratados tinha uma forma de SCID (ver Cap. 14), SCID-X1, devida a mutações no gene ligado ao X codificante da subunidade receptora de citocina γ_c de vários receptores de interleucina. A deficiência de receptor causa um bloqueio inicial no crescimento de linfócitos T e *natural killer* (NK), na sobrevivência e na diferenciação. Embora um transplante bem-sucedido de medula óssea possa salvar a vida neste distúrbio, os pacientes com SCID-X1 que recebem transplantes têm um funcionamento extremamente pobre de células B. Cuidadosos estudos pré-clínicos sugeriram que uma tentativa clínica provavelmente seria segura e efetiva. As células-tronco da medula óssea dos pacientes foram infectadas em cultura (*ex vivo*) com um vetor retroviral que expressou a subunidade

γ_c de cDNA. Uma vantagem seletiva foi conferida às células transduzidas, porque a subunidade transmite sinais de sobrevivência às genitoras de células T e sinais proliferativos às genitoras de linfócitos NK.

Dez meses após a transferência gênica, células T e NK expressando o transgene de subunidade γ_c ainda eram detectadas nos pacientes, e as contagens de células T, B e NK e o funcionamento foram restaurados aos níveis dos controles de mesma idade. Além disso, ocorreu uma acentuada melhora clínica, com a resolução da diarreia e das lesões de pele, bem como restauração do crescimento e desenvolvimento normais. Não foram observados efeitos adversos. A questão crucial agora é se a correção é permanente. A sobrevivência continuada das células-tronco transduzidas aparentemente responsável pelos benefícios deve ser documentada, e a expressão do gene transferido deve ser mantida. Independente do resultado a longo prazo deste sucesso inicial, entretanto, os resultados demonstram o grande potencial da terapia gênica para a correção da doença humana herdada.

Hemofilia B. Este distúrbio de sangramento ligado ao X, que resulta de mutações no gene do fator IX, é outra doença monogênica para a qual a terapia gênica tem demonstrado convincentemente um efeito clínico, embora modesto. O fator IX é uma pró-enzima necessária para a formação de um coágulo de fibrina. A hemofilia B grave surge quando o nível do fator IX circulante é menor que 1% do normal. Uma doença mais branda ocorre com níveis entre 1% e 5%. A infusão regular de concentrados do fator de coagulação para manter os níveis acima de 1% impede as muitas complicações do sangramento, inclusive os danos nas articulações.

O potencial de uma tentativa de terapia gênica em pacientes com hemofilia B foi sugerido por estudos de animais com deficiência do fator IX. Em dois pacientes, a terapia gênica com um vírus adeno-associado contendo fator IX injetado no músculo esquelético levou a um aumento muito pequeno nos níveis do fator IX, para cerca de 1% em um paciente e ainda menos em um segundo paciente. Mais importante: as necessidades de infusões do fator IX nestes dois pacientes caiu em 50% em um e em 80% no outro por períodos de pelo menos 3 meses. Não foram observados efeitos prejudiciais, não ocorreu transmissão de linhagem germinativa e não ocorreram anticorpos inibidores do fator IX. Como estes pacientes foram os primeiros tratados em um projeto experimental de escalonamento de dose e receberam as menores doses do vetor, espera-se que doses maiores sejam ainda mais benéficas.

Distrofia Muscular Duchenne. O problema especial na DMD é o tamanho (11 kb) do cDNA de distrofina que codifica a proteína, muito grande para ser acomodado pela atual geração de vetores retrovirais. Entretanto, a identificação de um paciente com distrofia muscular Becker branda o suficiente para permitir que ele dirija seu automóvel aos 65 anos sugere que pode não ser necessário usar toda a região codificante de distrofina para a transferência gênica. Neste paciente, o alelo mutante (ver Fig. 12.16) não tem quase metade da região codificante, de modo que seqüências altamente repetidas no domínio da distrofina foram deletadas. A distrofina encurtada conserva uma função suficiente para evitar o fenótipo completo da DMD. Estes achados destacam a necessidade de pesquisas básicas para identificar os domínios funcionais críticos de uma proteína, de modo que eles possam ser conservados em qualquer cDNA terapêutico. Como já foi dito com relação à hemo-

filia B, a injeção direta de vetores no músculo pode ser efetiva e indica um enfoque potencial para colocar um gene de distrofina nos pacientes com DMD. Uma segunda dificuldade maior com qualquer terapia de transferência gênica para a DMD, entretanto, é a necessidade de que o gene seja colocado em uma fração significativa da massa do músculo esquelético (e, em alguns pacientes, também no músculo cardíaco). Esta é uma imensa barreira logística.

Deficiência de Adenosina Desaminase. Os primeiros estudos de transferência gênica para o tratamento de um paciente com uma doença monogênica foram feitos em 10 pacientes com deficiência de ADA, outra causa de SCID (ver Fig. 13.7). Esta condição foi escolhida porque o transplante de medula óssea cura a condição e porque se acreditava que as células portadoras do gene transferido teriam uma vantagem seletiva de sobrevivência. Os linfócitos T autólogos foram tratados *ex vivo* com vetores retrovirais que expressam cDNA de ADA e então reintroduzidos no paciente (as células T vivem bastante, algumas durante anos). Muitos dos problemas que caracterizam a terapia gênica humana em geral são exemplificados por estas tentativas iniciais de ADA. Pelo menos duas diferenças principais podem contribuir para o tratamento bem-sucedido dos pacientes com SCID-X1 e a falta de sucesso nos esforços iniciais da terapia nos pacientes com deficiência de ADA. Primeiro, em contraste com a poderosa seleção de células transduzidas nos pacientes com SCID-X1, a pressão seletiva foi diminuída nos pacientes com deficiência de ADA pela administração concomitante da terapia de reposição de enzima PEG-ADA, que todos os pacientes com deficiência de ADA continuaram a receber. Segundo, a tecnologia de transferência gênica melhorou consideravelmente entre o início da década de 1990, quando foram feitas as tentativas com ADA, e o ano 2000, quando os dois pacientes com SCID-X1 foram tratados. Assim, a eficiência de transdução (transferir o DNA para a célula-alvo) foi baixa na tentativa com ADA, como foram os níveis de expressão de ADA na maioria dos casos. Embora algumas células T circulantes continuem a expressar o gene introduzido em níveis baixos, nenhum benefício clínico foi atribuído à terapia gênica.

Problemas

1. A doença granulomatosa ligada ao X (CGD) é um distúrbio incomum caracterizado por um defeito na defesa do hospedeiro que leva a infecções piogênicas graves, recorrentes e em geral fatais que começam no início da infância. O locus *CGD* ligado ao X codifica a cadeia pesada de citocromo-*b*, um componente da oxidase que gera superóxido nos fagócitos. Como se sabia que o interferon- γ (IFN- γ) aumentava a atividade de oxidase dos fagócitos normais, ele foi administrado a meninos com CGD ligada ao X para ver se sua atividade de oxidase aumentava. Antes do tratamento, os fagócitos de alguns pacientes afetados de modo menos grave tinham picos detectáveis mas pequenos de atividade de oxidase (ao contrário dos pacientes gravemente afetados), sugerindo que o aumento de atividade nestas pessoas afetadas com menor gravidade é o resultado de uma maior produção de citocromo-*b* pelo locus afetado. Nestes casos menos graves, o IFN- γ aumentou o conteúdo de citocromo-*b*, a produção de superóxido e a morte de *Staphylococcus aureus* nos granulócitos. O efeito do IFN- γ foi associado a um aumento definido na quantidade de cadeias de citocromo-*b*. Supostamente, o polipeptídeo citocromo-*b* destes pacientes é parcialmente funcional, e o aumento de expressão da função residual melhorou o defeito fisiológico. Des-

creva as diferenças genéticas que podem contribuir para o fato de que os fagócitos de alguns pacientes com CGD ligada ao X respondam ao IFN- γ *in vitro* e outros não.

2. Identifique algumas das restrições dos tipos de proteínas que podem ser consideradas na terapia de reposição extracelular, como exemplificado por PEG-ADA. O que torna este enfoque impróprio para a deficiência de fenilalanina hidroxilase? E para a síndrome de Hurler? E para a síndrome de Lesch-Nyhan? Se a doença de Tay-Sachs causasse apenas doença hepática, esta estratégia seria bem-sucedida? Caso não, por quê?
3. Uma menina com 3 anos de idade, Rhonda, tem FH devida a uma deleção da ponta 5' do gene. A mutação removeu o promotor e os primeiros dois éxons de cada alelo. (Os genitores de Rhonda são primos em segundo grau.) Você explica aos genitores que ela vai precisar de uma terapia de troca de plasma a cada 1 a 2 semanas durante anos. Na clínica, entretanto, eles encontram outra família com um menino de 5 anos com a mesma doença. O menino foi tratado com medicamentos com algum sucesso. Os genitores de Rhonda querem saber por que não foi oferecida a ela uma terapia farmacológica similar. Explique.
4. Que classes de mutações provavelmente são encontradas nos pacientes com homocistinúria que não respondem à administração de grandes doses (1 000 mg/dia) de piridoxina (vitamina B₆)? Como você pode explicar o fato de que Tom é totalmente responsivo, enquanto seu primo em primeiro grau, Allan, tem apenas uma redução parcial de homocistina do plasma quando recebe a mesma quantidade de vitamina B₆?
5. Você clonou o gene para fenilalanina hidroxilase e quer introduzi-lo em pacientes com PKU. Seu enfoque será cultivar células do paciente, introduzir uma versão funcional do gene nas células e reintroduzir as células no paciente.
 - (a) Que componentes do DNA você precisa para fazer uma fenilalanina hidroxilase funcional em um experimento de transferência gênica?
 - (b) Que tecidos você escolheria para expressar a enzima e por quê? Como esta escolha afeta sua construção gênica em (a)?
 - (c) Você introduziu sua versão do gene em uma cultura de fibroblastos de uma amostra de biópsia de pele do paciente. A análise da transferência Northern (RNA) mostra que o RNA mensageiro está presente em quantidades normais e tem o tamanho correto. Entretanto, nenhuma proteína fenilalanina hidroxilase pode ser detectada nas células. Que tipos de anomalias no gene transferido explicariam este achado?
 - (d) Você corrigiu todos os problemas identificados em (c). Ao introduzir a nova versão do gene nas células cultivadas, você agora descobre que a fenilalanina hidroxilase está presente em grande quantidade, e quando você colhe as células e dosa a enzima (na presença de todos os componentes necessários), é obtida a atividade normal. Entretanto, quando você adiciona fenilalanina marcada com ³H às células em cultura, não se forma nenhuma tirosina marcada com ³H (em contraste, algumas células hepáticas cultivadas produzem uma grande quantidade de tirosina marcada com ³H nesta situação). Quais as explicações mais prováveis para a não formação de ³H-tirosina? Como este resultado afeta o seu enfoque da terapia gênica dos pacientes?
 - (e) Você desenvolveu um método para introduzir sua versão funcional do gene diretamente em uma grande proporção dos hepatócitos dos pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase. Inesperadamente, você descobre que níveis muito mais baixos de atividade enzimática de fenilalanina hidroxilase são obtidos nos pacientes nos quais eram detectáveis quantidades significativas de homodímero de fenilalanina hidroxilase inativa nos hepatócitos antes do tratamento do que nos pacientes que não tinham fenilalanina hidroxilase detectável antes do tratamento. Como você pode explicar este resultado? Como você poderia superar o problema?

Referências Gerais

- Blau HM, Springer ML (1995) Gene therapy—A novel form of drug delivery *N Engl J Med* 333:1204–1207.
- Desnick RJ (ed) (1991) *Treatment of Genetic Diseases*. Churchill Livingstone, New York.
- Desnick RJ, Schuchman EH (1998) Gene therapy for genetic diseases. *Acta Paed Japonica* 40:191–203.
- Kay M, Russell DW (2000) Gene therapy. *In* Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed McGraw Hill, New York.
- Orkin S, Motulsky A (1995) Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. See online at <http://www.nih.gov/news/panelrep.html>.
- Rosenberg LE (1990) Treating genetic diseases: Lessons from three children. *Pediatr Res* 27:S10–S16.
- Scriver CR, Treacy EP (1999) Is there treatment for "genetic" disease? *Mol Gen Metab* 68:93–102.
- Treacy EP, Childs B, Scriver CR (1995) Response to treatment in hereditary metabolic disease: 1993 survey and 10-year comparison. *Am J Hum Genet* 56:359–367.
- Treacy EP, Valle D, Scriver CR (2001) Treatment of genetic disease. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed McGraw-Hill, New York.

Referências Específicas a Tópicos Particulares

- Anderson WF (2000) Perspectives: Gene therapy. The best of times, the worst of times. *Science* 288:627–629.
- Atweh GF, Sutton M, Nassif I, et al (1999) Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. *Blood* 93:1790–1797.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint-Basile G, et al (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669–672.
- Couture LA, Sünchcomb DT (1996) Anti-gene therapy: The use of ribozymes to inhibit gene function. *Trends Genet* 12:510–514.
- Cox DW (2001) α_1 -AT deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- Friedmann T (2000) Medical ethics: Principles for human gene therapy studies. *Science* 287:2163–2165.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells *Science* 287:1433–1438.
- Giardini C (1997) Treatment of β -thalassemia. *Curr Opin Hematol* 4:79–87.
- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS (2001) Familial hypercholesterolemia. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed McGraw-Hill, New York.
- Grabowski GA, Leslie N, Wenstrup R (1998) Enzyme therapy for Gaucher disease: The first 5 years. *Blood Rev* 12:115–133.
- Hayes A, Costa T, Scriver CR, Childs B (1985) The effect of mendelian disease on human health. II: Response to treatment. *Am J Med Genet* 21:243–255.
- Hershfield MS (1998) Adenosine deaminase deficiency: Clinical expression, molecular basis, and therapy. *Semin Hematol* 35:291–298.
- Hollon T (2000) Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. *Nat Med* 6:6.
- Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordigoni P, et al (1995) Allogenic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. *Lancet* 345:1398–1402.
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector *Nat Genet* 24:257–261.
- Kelly DA (1998) Current results of evolving indications for liver transplantation in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27:214–221.
- Krivit W, Shapiro EG, Peters C, et al (1998) Hematopoietic stem cell transplantation in globoid-cell leukodystrophy *N Engl J Med* 338:1119–1126.
- Miano M, Porta F, Locatelli F, et al (1998) Unrelated donor marrow transplantation for inborn errors. *Bone Marrow Transplant* 21:(Suppl 2) S37–S41.
- Oliveri NF (1999) The β -thalassemias. *N Engl J Med* 341:99–109.
- Parkman R (1998) The future of placental-blood transplantation. *N Engl J Med* 339:1627–1629.
- Peters C, Shapiro EG, Anderson J, et al (1998) Hunter syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. *Blood* 91:2601–2608.
- Rosenberg LE, Schechter AN (2000) Gene therapist, heal thyself. *Science* 287:1751.
- Scriver CR, Kaufman S (2001) The hyperphenylalaninemias: Phenylalanine hydroxylase deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- Starzl TE, Demetris AJ (1990) Liver transplantation: A 31-year perspective. Part I *Curr Probl Surg* 27:49–116.
- Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 287:1442–1446.
- Van der Kooy D, Weiss S (2000) Why stem cells? *Science* 287:1439–1441.