Associação da terapia gênica com o vetor p53 à quimioterapia

Assunto escolhido: Terapia gênica

Alunos: Amanda Roberta Paiva Silva e Gabriel Nakanishi Fortes

Introdução

Câncer é o nome dado ao conjunto de diversas doenças que tem como principal característica o crescimento descontrolado de células com alguma mutação. Sabe-se que mutações na estrutura do DNA podem ocorrer por causa de hereditariedade ou exposição a fatores de risco, como tabagismo, sedentarismo, exposição aos raios ultravioletas, entre outros. Essa de enfermidade é responsável por atingir milhões de pessoas em escala global e apresentar uma grande taxa de letalidade. Nesse sentido, diferentes tratamentos são utilizados no combate a essa doença. Um exemplo é a quimioterapia, tal procedimento consiste na introdução de compostos químicos, chamados quimioterápicos, na corrente sanguínea. Esses medicamentos circulam pelo organismo e têm como finalidade destruir células cancerígenas, geralmente bloqueando a síntese dos ácidos nucleicos, ou seja, DNA e RNA. Entretanto esse tratamento possui efeitos colaterais, uma vez que pode destruir células normais do corpo que também possuem alta taxa de replicação, como gastrointestinais e do sistema imunológico, acarretando em náuseas, diarreia, perda de cabelo e apetite, infecções e outros.

Desse modo, com o avanço de tecnologias modernas, surge uma medida de controle dos efeitos adversos da quimioterapia, na associação desta com a terapia gênica, tratamento baseado na introdução de genes sadios com uso de técnicas de DNA recombinante. Nesse método é necessário definir o gene terapêutico, vetor e a forma de administração.

Descrição do Problema

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. (SCHILITHZ, A. et al., 2019). O tratamento utilizado para essa condição é a quimioterapia, porém este possui muitos efeitos adversos que acabam debilitando o paciente. Um medicamento antineoplásico utilizado na clínica é o cabazitaxel, que em associação com prednisona é indicado para o tratamento de pacientes com câncer de próstata metastático. É um medicamento disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), porém ainda possui

uma elevada toxicidade do fármaco no organismo, o que acaba ocasionando muitos efeitos adversos. Uma das principais estratégias é o investimento na terapia gênica através da imunoterapia. O objetivo do projeto foi injetar o vírus com associação do fármaco cabazitaxel, diretamente na massa tumoral do paciente, onde penetrou nas células e introduziu o gene p53, o qual ativa outros genes, que causaram a morte da célula inibindo o crescimento do tumor.

Ferramentas e conteúdos de Biologia Molecular necessários para a resolução do problema

O tratamento de câncer de próstata utiliza geralmente quimioterápicos, como o cabazitaxel cujo mecanismo de ação envolve a inibição da interfase e da mitose, por meio do bloqueio dos microtúbulos utilizados nesses processos. A fim de melhorar a terapia, ferramentas da biologia molecular podem ser aplicadas na terapêutica. Nesse sentido, o tratamento convencional é combinado com a terapia gênica, ou seja, introdução de genes sadios com base na tecnologia do DNA recombinante. Para esse estudo foi utilizado o vetor viral com o gene p53, conhecido como ‘’guardião do genoma’’ devido às suas propriedades de manutenção do DNA.

Como vetor da terapia gênica foi utilizado um adenovírus do tipo 5. Esse vírus pertence à família *Adenoviridae* e possuem como material genético uma molécula de DNA dupla hélice linear com duas origens de replicação nas extremidades. Para transformar o vírus selvagem em um vetor que não cause prejuízo em humanos é preciso remover a capacidade de replicação dele. Nesse sentido, realiza-se uma modificação no genoma viral, removendo a parte conhecida com E1. Sem essa região sendo transcrita e traduzida, outros importantes processos não ocorrem, como a transcrição da região E2, impedindo a síntese de proteínas essenciais, como a DNA polimerase e as de ligação ao DNA em fita simples para estabilizá-lo momentaneamente.

O motivo da escolha do gene p53 foi que este sintetiza a proteína p53, a qual tem sido estudada pois apresenta um papel no controle da célula, podendo ativar a transcrição de genes responsáveis por diversas funções como parada do ciclo celular, morte programada (apoptose) e reparo de DNA, sendo que todos esses processos são relevantes e benéficos contra o crescimento de tumores e atuam no controle e possível eliminação do câncer.

Além do gene de interesse, é necessário a presença de um sequência regulatória para expressar o transgene. Para isso, foi feito um procedimento novo, de unificação do transgene e do promotor, em um sistema de auto regulação, ou seja, o transgene induz atividade do promotor e este aumenta a expressão gênica específica.

Para a construção do vetor de interesse foi utilizado uma bactéria para a criação do plasmídeo recombinante com os genes para sintetizar a proteína p53 e para resistência à ampicilina, bem como um repórter lacZ, com a finalidade de expressar um fenótipo capaz de ser mensurável. Para a transformação de bactérias, dois métodos foram utilizados. Para as quimiocompetentes utilizou-se choque térmico a 42ºC. Enquanto para as eletrocompetentes utilizou-se eletroporação. Ambas receberam o plasmídeo com o gene de interesse. Em seguida, foram incubadas por 1 hora com agitação, para expressar o gene de resistência ao antibiótico. Por fim, essa plasmídeo é introduzido no vírus, que agora passa a ter o gene p53. Testes de PCR em tempo real ou PCR seguido por eletroforese em gel de agarose podem ser feitos para relatar a eficácia do processo de expressão do gene e quantificá-lo.

Vale destacar que a quantidade de proteína p53 expressa não é um único fator que determina a ativação e desativação dos seus alvos. Também são necessárias modificações pós traducionais, sendo que a melhor estudada e descrita é a fosforilação do aminoácido serina que se encontra na posição 15 da cadeia polipeptídica. De acordo com teste de PCR em tempo real, feito com base em um mRNA do gene alvo, o quimioterápico cabazitaxel ajuda nessa etapa, aumentando a fosforilação e a atividade da proteína.

Por fim, o vetor viral é injetado diretamente na massa tumoral, após penetrar nas células, ele fará a introdução do gene p53 e reativará essa importante via, por meio da proteína p53 e de outros genes benéficos, resultando na morte celular e diminuição do tumor. Nessa nova abordagem, doses menores do fármaco são utilizadas. A combinação de ambos os fatores aumenta a eficácia do processo e resulta em menos efeitos colaterais, diminuindo consideravelmente a massa total do tumor em câncer de próstata *in vivo*, com modelo de camundongos.

NOTÍCIA E ARTIGO BASE DO TRABALHO:
https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-biologicas/combinacao-de-tratamentos-controla-cancer-sem-causar-efeitos-negativos/

Tamura, R.E., Lana, M.G., Costanzi-Strauss, E. *et al.* **Combination of cabazitaxel and p53 gene therapy abolishes prostate carcinoma tumor growth**. *Gene Ther* 27, 15–26 (2020). https://doi.org/10.1038/s41434-019-0071-x

REFERÊNCIAS:

AZEVEDO, G.; NORONHA, C.; ALMEIDA, L. **A situação do câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Rio de Janeiro. 2006. p. 117.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: **GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken, v. 68, n. 6, p. 394-424. 2018.