

RESUMO

A terapia gênica é um procedimento que tem como base a introdução de material genético terapêutico em uma célula com o objetivo de substituição ou silenciamento de genes defeituosos, utilizando técnicas de DNA recombinante e de edição de genoma. Os vetores fazem a proteção e transporte do material genético para dentro da célula, a escolha ideal do vetor se faz dependendo do fim terapêutico e se pode escolher entre vetores virais e não virais. O uso da terapia gênica para o tratamento de doenças inicialmente foi pensado para doenças hereditárias monogênicas, entretanto, a maioria dos estudos hoje são direcionados para o tratamento de doenças adquiridas como o Câncer e a infecção por HIV. Embora existam muitas pesquisas e diversos meios de aplicação a terapia gênica mesmo sendo uma ótima promessa para o futuro tem diversos obstáculos para ultrapassar. O presente trabalho tem como objetivo descrever o que é a terapia gênica assim como sua aplicação usando como exemplo as doenças Câncer e infecção por HIV.

Palavras chave: Terapia gênica, *Genetherapy*, *Genetherapyandcancer*, *Genetherapyand HIV*, *Gene therapyanddiseases*, CRISPR, *Gene therapyand CRISPR*, *viral oncolysis* e Gene terapia.

ABSTRACT

Gene therapy is a procedure that is based on the introduction of therapeutic genetic material into a cell for the purpose of replacement or silencing of defective genes using recombinant DNA and genome-editing techniques. The vectors make the protection and transport of the genetic material into the cell, the ideal choice of the vector is made depending on the therapeutic target and it can be chosen between viral and nonviral vectors. The use of gene therapy for the treatment of diseases was initially thought to be monogenic hereditary diseases; however, most studies today are directed toward the treatment of acquired diseases such as cancer and HIV infection. Although there is much research and various means of application, gene therapy, while being a great promise for the future, has several obstacles to overcome. The present work aims to describe what is the gene therapy as well as its application using as an example the diseases Cancer and HIV infection.

Keywords: Terapia gênica, *Genetherapy*, *Genetherapyandcancer*, *Genetherapyand HIV*, *Gene therapyanddiseases*, CRISPR, *Gene therapyand CRISPR*, *viral oncolysis* e Gene terapia.

1. INTRODUÇÃO

Desde as primeiras manipulações genéticas por volta da década de 1940, começaram grandes avanços na manipulação de genes e, em meados da década de 1960, começaram as primeiras especulações a respeito das transferências de genes com uso de vírus para curar doenças genéticas. Já por volta dos anos de 1990 começaram a surgir as primeiras aplicações da terapia gênica com o uso de técnicas de DNA recombinante quando foi utilizada, pela primeira vez, em um paciente com uma imunodeficiência combinada severa (LIDEN, 2008).

Existem duas vertentes na terapia gênica, ou seja, a terapia de células somáticas e a terapia de células germinativas. Na primeira o objetivo é corrigir o gene das células de um determinado tecido de um único paciente, sem passar para seus descendentes e, na segunda, são feitas modificações genéticas em células germinativas que darão origem a uma pessoa. No ponto de vista da bioética o tratamento de células somáticas se assemelha a um transplante de órgãos, que visa à melhora de um organismo que não funciona corretamente; já o tratamento de células germinativas pode se materializar os preceitos da eugenia (CAREY; WHITE, 2003).

Na teoria do tratamento de genes defeituosos ou indesejados, estes poderiam ser substituídos ou retirados. Logo, a melhor definição de terapia gênica é a substituição ou inserção de genes pré-determinados, *in vivo* ou *ex vivo*, em células defeituosas. Sendo assim, uma célula com qualquer defeito genético de funcionamento poderia ser corrigida dando fim aos problemas causados por estes defeitos (LAZO; GRANDIS, 2005).

Na terapia gênica são utilizadas duas estratégias, a *ex vivo* e a *in vivo*. A estratégia *ex vivo* consiste na retirada de células do tecido desejado que são cultivadas *in vitro* e modificadas geneticamente e, em seguida, devolvidas para o organismo. Já a estratégia *in vivo* conta com a ajuda de vetores eficientes, podendo ser virais ou não virais, que são inseridos diretamente no organismo e carregam para o tecido alvo os genes a serem incorporados (MENCK; VENTURA, 2007).

Os vetores têm o objetivo de inserir os genes de interesse no genoma das células defeituosas do hospedeiro e são divididos em vetores virais e vetores não virais. Os vetores virais são em sua maioria adenovírus ou alguns retrovírus, que são geneticamente modificados e tem seu potencial patogênico e de multiplicação retirados. Vetores não virais são os plasmídeos, lipossomas e RNA interferente. Estes são mais

seguros por não apresentarem potencial de se multiplicar, de irem para outros tecidos ou de estimularem o sistema imune, embora não tenham a eficiência de entrada na célula e velocidade dos virais (GINN et al., 2013).

A aplicação real da terapia gênica permitirá um tratamento com maior eficácia e menos danos colaterais. Um exemplo é a sua aplicação na terapia de imunodeficiência combinada grave, que tenta substituir o transplante de medula óssea para evitar a demora de achar um paciente compatível e possível incompatibilidade. Neste caso, a terapia gênica vai utilizar células modificadas do próprio paciente para suprir sua necessidade de produção de células defensivas funcionais (LASTRA, 2006).

Os avanços na medicina estão cada dia aumentando os tratamentos de doenças e condições de vida dos pacientes e, com isso, terapias cada vez mais eficazes e menos nocivas estão sendo estudadas.

Devido a isso, o objetivo deste trabalho foi demonstrar os avanços da engenharia genética em desenvolver terapias gênicas que podem ser aplicadas no tratamento de doenças.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho descreve os conceitos do tema terapia gênica, como pode ser utilizada, seus métodos e técnicas, os possíveis usos no tratamento de doenças e a respeito das novas tecnologias que podem auxiliar a terapia gênica a dar certo.

Trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa por ter um critério mais amplo e de caráter qualitativo, onde se faz a análise da literatura já publicada na interpretação e análise crítica do autor (ROTHER, 2007). As informações utilizadas foram pesquisadas no período dos últimos 10 anos e encontradas em artigos científicos, revista científicas e periódicos internacionais. A pesquisa dos artigos foi realizada por meio de consulta às bases de dados PubMed (US National Library of Medicine), SciELO (Scientific Eletronic Library Online), EBSCO, Google Acadêmico, MDPI (Multidisciplinary Digital Publishing Institute) e BioMed central.

Para essa busca de artigos foram utilizadas as seguintes palavras chave: Terapia gênica, *Genetherapy*, *Genetherapyandcancer*, *Genetherapyand HIV*, *Gene therapyanddiseases*, *CRISPR*, *Gene therapyand CRISPR*, *viral oncolysis* e Gene terapia. Os conteúdos foram selecionados a partir de artigos nos idiomas português, inglês e espanhol.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. DNA, Gene e Mutação

Todo organismo vivo conhecido possui o seu genoma composto por um material genético (DNA ou RNA), o qual determina as características da espécie. Na espécie humana o material genético é o DNA (Ácido desoxirribonucleico) organizado em 46 cromossomos. O DNA é composto por dois filamentos em dupla hélice ligados por interações de hidrogênio. Cada filamento contém vários nucleotídeos constituídos, cada um, de uma molécula de ácido fosfórico, uma molécula de açúcar desoxirribose e uma molécula de base nitrogenada, podendo ser adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) (LOPES, 2008).

A estrutura e composição do DNA permitem com que ele consiga guardar várias informações necessárias para o funcionamento e desenvolvimento celular. Existem áreas no DNA denominadas de genes, que são caracterizadas pelo dogma da biologia molecular (transcrição e tradução) como unidades físicas e fundamentais da hereditariedade que codificam um produto final (RNA ou proteína). Os genes definem a identidade do organismo, como será a sua morfologia e funcionamento e, em parte, o comportamento é definido e influenciado por eles. Além da definição molecular básica, também existem genes que tem outras funções e não gera um produto final (proteína), eles podem ter função de regulação e manutenção de outros genes e da própria molécula de DNA (JOAQUIM; EL-HANI, 2010).

Genes que não geram proteínas são chamados de genes não codificantes, esses têm funções de regulação, processamento de outros genes e de manutenção do funcionamento da molécula de DNA. Esses genes, por exemplo, podem dar origem alguns tipos de RNA que serão importantes para todo o funcionamento celular, como o microRNA que ajuda a regular genes ou o RNA ribossômico e o RNA transportador que são essenciais na síntese de proteínas (GERSTEIN et al., 2007).

Muitas doenças são causadas por erros no DNA, mais especificamente em genes, e elas podem ocorrer devido a inserção, deleção ou substituição de pares de bases e são classificadas como mutações gênicas. Essas mutações acontecem devido aos erros que ocorrem durante a fase de replicação ou reparo do DNA, e podem ser espontâneas ou induzidas por algum agente mutagênico (NUSSBAUM, 2008).

Mutações também podem ocorrer devido à inserção de um genoma viral ao DNA da célula hospedeira, podendo induzir a célula a se multiplicar e não entrar em

apoptose, dando origem a uma célula mutante com potencial carcinogênico. A inserção do genoma viral ao DNA do hospedeiro faz com que o vírus fique protegido de fármacos e da ação do próprio sistema imune e, assim, possa dar continuidade ao ciclo de replicação viral (SANTOS, 2015).

Existem muitos tipos de mutações que vão desde muito pequenas que atingem um único nucleotídeo até aquelas que modificam a estrutura e a quantidade de cromossomos dentro de uma célula. Mesmo as pequenas mutações podem causar um grande impacto no fenótipo, pois se houver mudanças em determinados genes podem ocorrer perdas completas na expressão gênica ou na formação de uma proteína variante com propriedades alteradas. A falta de proteínas ou a sua produção defeituosa pode causar diversos problemas que podem ir desde imunodeficiências até doenças degenerativas (NUSSBAUM, 2008).

3.2. Terapia Gênica

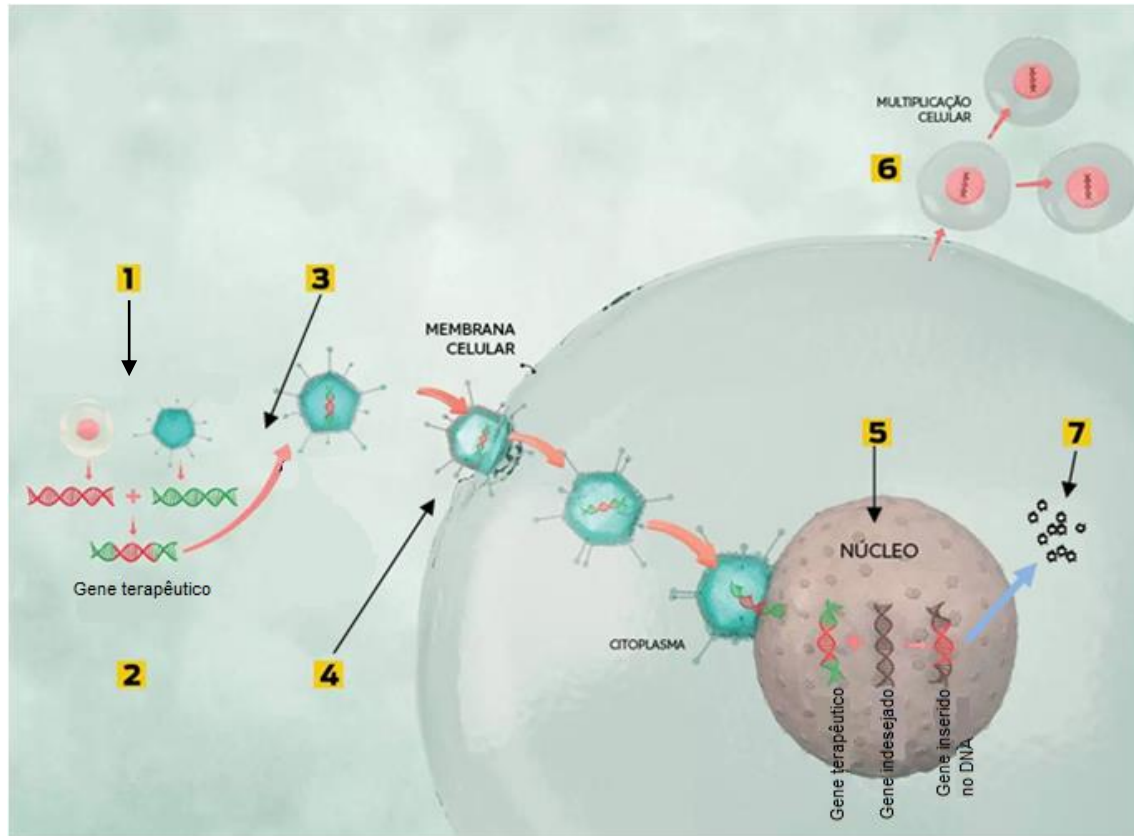
Atualmente os métodos de terapia e tratamento usam abordagens farmacológicas e cirúrgicas, que podem não ser específicas, eficazes e trazer diversos efeitos colaterais. Com o surgimento de novas ferramentas, técnicas e descobertas da biologia molecular a terapia gênica tornou-se uma importante possibilidade de tratamento, sendo mais eficaz e sem prováveis efeitos adversos, dando esperanças para cura de diversas doenças da atualidade (ARTIOLI; HIRATA; JUNIOR, 2007).

A terapia gênica é definida pela utilização de material genético para inserção em células de um indivíduo com fins terapêuticos (Figura 1). Quanto ao material genético a ser utilizado pode ser pensado em duas técnicas, a primeira é o uso de genes (DNA) específicos e funcionais para substituição de genes defeituosos, já a segunda técnica utiliza RNA de interferência para silenciar algum gene, geralmente defeituoso. A introdução do material genético é feita por meio de vetores e acontecem de duas formas, as estratégias *ex vivo* e *in vivo* (PÉREZ-LÓPEZ, 2013; FÉCCHIO; MACEDO; RICCI, 2015).

As duas estratégias, *in vivo* e *ex vivo* (Figura 2) são nomeadas pela forma de introdução dos vetores de transferência de material genético nas células. A estratégia *ex vivo* utiliza células retiradas do paciente, geralmente da medula óssea, e cultivadas *in vitro*. O uso de vetores acontece *in vitro* para que as células já estejam modificadas antes de serem reintroduzidas no paciente. Na estratégia *ex vivo* os vetores são injetados

diretamente no paciente próximo ou diretamente no tecido alvo e, com isso, os vetores irão agir dentro do paciente (MENK; VENTURA, 2007; SANTALLA et al., 2013).

Figura 1 – Descrição das etapas que envolvem a terapia gênica.



Legenda: 1, Seleção do gene terapêutico e do vetor; 2, Substituição de genes do vírus pelos genes terapêuticos; 3, Introdução do genoma no vírus; 4, transfecção; 5, Substituição do gene defeituoso pelo gene terapêutico; 6, Gene correto é passado para as células filhas; 7, Proteínas corretas começam a ser produzidas.

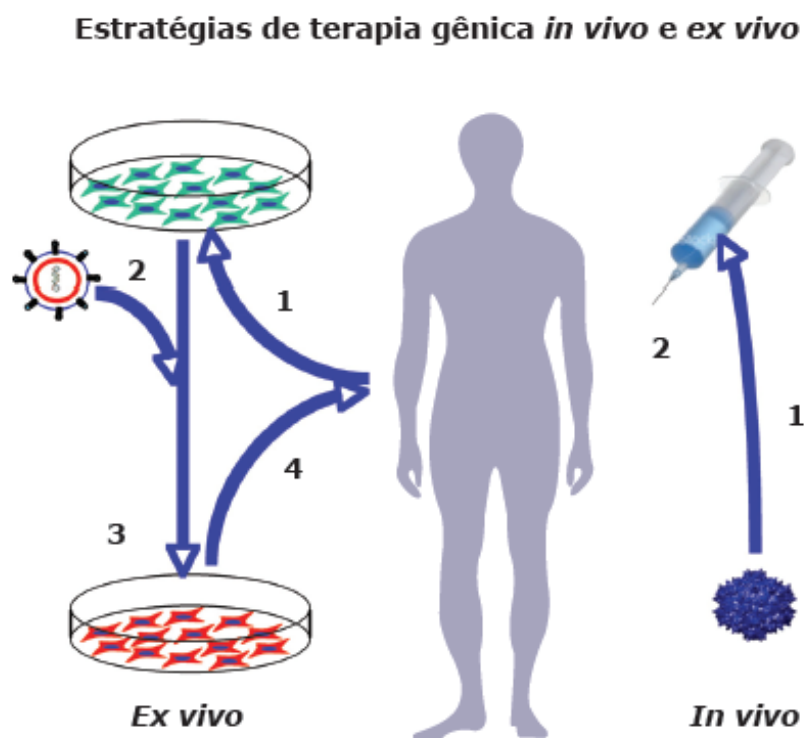
Fonte: Valentim (2016).

A terapia gênica pode ser realizada em células germinativas ou em células somáticas, dependendo do alvo e função desejados. A realização da terapia em células germinativas não é convencional, pois ao fazer edição ou supressão nos genes, a modificação é passada para a prole. Utilizar células somáticas como alvo não passa modificações à prole e tem como objetivo corrigir defeitos genéticos que causam consequências clínicas, como em doenças genéticas (AYALA et al., 2015).

Em 1990 a terapia gênica teve sua primeira aplicação no tratamento de doenças, onde foi tratado um paciente com imunodeficiência combinada grave ocasionada por mutações no gene da enzima adenosina deaminase (ADA), onde essa não é produzida e, assim, acontece uma baixa ou deficiência de células de defesa, linfócitos T, B ou NK.

No tratamento algumas células foram retiradas do paciente e cultivadas *in vitro*, onde ocorreu a transfecção de um gene selvagem da ADA por meio do emprego de retrovírus e, logo após, foi feito o transplante no paciente com essas células melhorando, assim, a atividade do sistema imune do paciente que agora passa a ter células de defesa funcionais devido a produção de enzima ADA (LASTRA, 2006; XU; TAILOR; GRUNEBAUM, 2017).

Figura 2 – Estratégias de terapia gênica *in vivo* e *ex vivo*.



Legenda: Meio *ex vivo*: 1, Coleta de células do paciente e cultivo *in vitro*; 2, Introdução do vetor contendo gene terapêutico na cultura; 3, Seleção e multiplicação das células modificadas e; 4, reintrodução das células no paciente. Meio *in vivo*: 1, Montagem do melhor vetor com gene terapêutico e; 2, Introdução dos vetores no tecido alvo do paciente.

Fonte: Menck; Ventura (2007).

3.3 Vetores e Técnicas de Introdução de DNA

A terapia gênica enfrenta algumas complicações para ser aplicada, pois a inserção do material genético nas células deve ser feita com cuidado e por meio de um vetor para que não haja degradação do gene e a inserção aconteça da forma mais eficiente possível. A definição exata de vetor no contexto da terapia gênica é ser uma estrutura de transporte que carrega moléculas de DNA para a célula do paciente. Vetores são os meios de transporte e entrada de um gene na célula. E, para ser definido

o melhor vetor, alguns parâmetros precisam ser levados em consideração como, por exemplo, as células e tecido alvo, custo, dificuldade de manipulação e produção, capacidade de carregar e manter o transgene, tempo de expressão do gene terapêutico, doença a ser tratada e meio de aplicação (*in vivo* ou *ex vivo*) (CÔCO; HAN; SALLUM, 2009).

A introdução de material genético terapêutico em células pode ser realizada por meios físicos e químicos (não virais) ou por meios biológicos (virais). Os métodos não virais utilizam técnicas de eletroporação, microinjeção, bombardeio de partículas, e uso de lipossomas e plasmídeos (Tabela 1). Estes não são métodos muito eficientes em processos de transferência, principalmente se comparados aos métodos virais, mas em compensação possuem baixa toxicidade e imunogenicidade (RODRÍGUEZ et al., 2014).

3.3.1 Vetores não Virais

O plasmídeo é uma estrutura circular composta por DNA de fita dupla que consegue se duplicar com autonomia, pois tem sua própria origem de replicação. Os plasmídeos são encontrados em bactérias e pelas técnicas de DNA recombinante podem ser modificados para carregar um gene terapêutico. A capacidade de carregar genes grandes (1-250 kb) e também sequências de DNA que ajudam a regular a expressão do gene, torna os plasmídeos ótimos vetores, porém é necessário induzir a competência da célula para introduzi-los, podendo causar lise nas células. A competência celular é a capacidade que a célula tem de receber DNA do meio externo, para aumentar a competência pode se fazer o uso das técnicas de microinjeção, eletroporação e bombardeio de partículas e, assim, auxiliar e melhorar a introdução de plasmídeos nas células (BROWN, 2010; LIDEN, 2010; FALEIRO; ANDRADE; JUNIOR, 2011).

Já os lipossomas são vesículas biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogênicas que podem carregar moléculas em seu interior ou aderidas em suas membranas. Devido à sua estrutura que é composta de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas arranjadas em torno de um meio aquoso. Os lipossomas possuem boa interação com a membrana celular favorecendo a entrada nas células e sua estrutura garante a proteção do material genético no meio extracelular e de ataques enzimáticos no meio intracelular. Mesmo não sendo tóxicos ou imunogênicos, os lipossomas não são muito utilizados em pesquisas de terapia gênica devido à baixa transformação obtida em estudos realizados (BATISTA et al, 2007; BORSATTO, 2015).

Tabela 1- Técnicas não virais de transferência de DNA.

Técnicas	Vantagens	Desvantagens
Biobalística (bombardeio de partículas)	Simples, rápido, permite uso de grandes sequências de DNA (ex: plasmídeos).	Dano celular, pouco específico e tem baixa eficiência.
Eletroporação	Simples, eficiente, mais facilidade de regeneração da célula, permite a entrada de DNA maior que 5 kb.	Dificuldade de execução da técnica.
Microinjeção	Transferência de DNA precisa, eficiente e pode usar grandes quantidades de DNA.	Cara e alto nível de dificuldade em realizar a técnica.
Plasmídeos	Simples, não tóxico ou imunogênico, carrega DNA de 1-250 kb	Baixa transformação, expressão gênica transitória, dificuldade de entrar nas células.
Lipossomas	Simples de ser produzido, pode ser feito para carregar grandes quantidades de DNA, boa permeabilidade celular, não imunogênico.	Baixa transformação, expressão transitória.

As técnicas de introdução de DNA não virais são geralmente utilizadas na terapia gênica *ex vivo*, quando se faz a transformação das células *in vitro*. Porém algumas aplicações *in vivo* pode ser realizadas com essas técnicas, como utilizar uma pistola com o objetivo de fazer o bombardeio de partículas na pele para fazer transferência de genes para tratamento de Epidermólise bolhosa (PEKING et al., 2016).

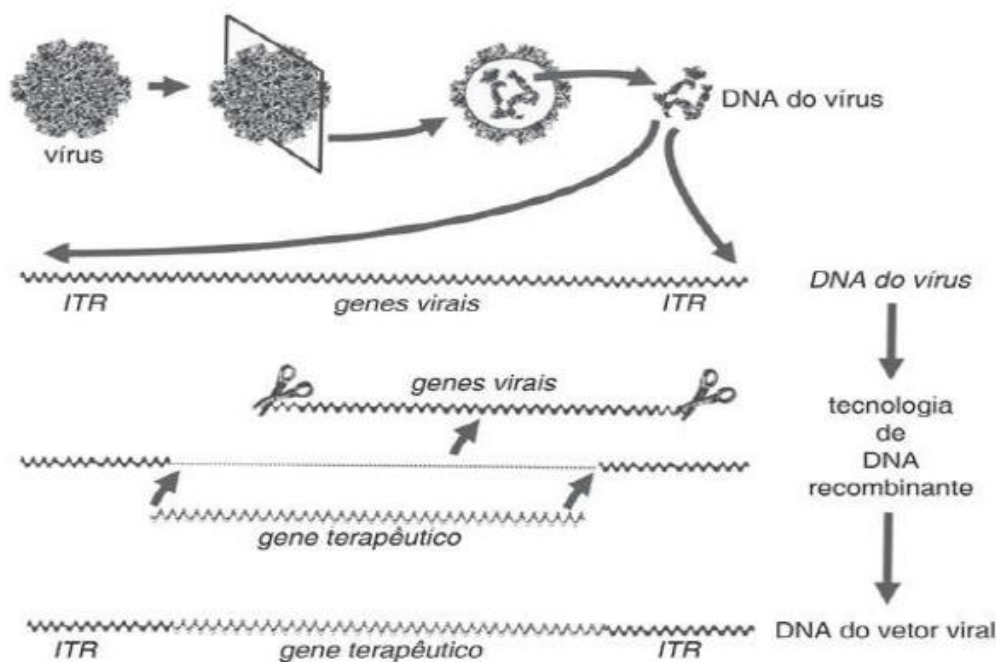
3.3.2 Vetores Virais

Os meios virais são os mais utilizados atualmente na terapia gênica graças à alta eficiência em introduzir material genético nas células e no genoma do hospedeiro (Transfecção). Os vírus para serem utilizados devem passar por procedimentos de inativação da sua patogenicidade, virulência e replicação e, para que isso ocorra, é feita

uma deleção e substituição destes genes pelo gene terapêutico de interesse (Figura 3). Os grupos de vírus mais utilizados são os pertencentes às famílias de retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados e herpes vírus simples (Tabela 2). Adenovírus e retrovírus representam cerca de 50% dos vetores que são atualmente utilizados na terapia gênica (SANTALLA et al., 2013; LIDEN, 2010).

Os adenovírus são vírus pequenos que contêm DNA de fita dupla e tem capacidade de infectar a maioria dos tipos de células existentes em mamíferos, tornando-se ótimos vetores em estratégias *in vivo*. Esse tipo de vírus possui uma ótima transfecção e consegue introduzir o seu genoma em qualquer fase de replicação celular, porém ele contém uma alta imunogenicidade, expressão transitória e por ser pequeno, fica limitado a carregar apenas pequenos genes. Graças à sua facilidade de produção, o adenovírus pode ser produzido em grande escala facilitando o seu uso em pesquisas (CÔCO; HAN; SALLUM, 2009; AMER, 2014).

Figura 3 - Construção de um vetor viral para terapia gênica.



Legenda: A figura ilustra na parte superior como é um vírus e onde está o seu material genético, na parte de DNA viral mostra um DNA de fita simples com os genes essenciais (ITRs) para o ciclo viral e genes virais que promovem replicação, patogenicidade e virulência. Já na 'tecnologia de DNA recombinante' se ilustra a retirada dos genes virais e substituição por genes terapêuticos de interesse e, por último, é representado o novo DNA do vetor viral, contendo os genes terapêuticos e os ITRs.

Fonte: LINDEN (2008).

Tabela 2– Descrição dos principais tipos de vetores virais.

Vetores	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Ótima transfecção, baixa imunogenicidade, ótimos para técnicas <i>ex vivo</i> , boa interação com genoma, expressão do transgene prolongada com inserção no genoma da célula hospedeira.	Apenas infecta células em divisão, só carrega genes de até 8 kb, risco de mutagênese durante a inserção, pouco eficiente <i>in vivo</i>
Adenovírus	Transfecção em qualquer tipo celular, fabricação fácil e alta estabilidade.	Muito imunogênico, expressão transitória do transgene, só carrega genes de até 8 kb.
Vírus adeno-associados	Transfecção eficiente, em diversos tipos celulares e com boa durabilidade, pouco imunogênico, ótimo para o uso <i>in vivo</i> , possui boa estabilidade.	Dificuldade de produção, só carrega genes de até 4,7 kb.
Herpes simples Vírus	Expressão gênica bastante prolongada, tropismo pelo sistema nervoso central.	Muito imunogênico, pode causar neurotoxicidade, risco de reversão do vírus ao seu estado selvagem.

A família dos retrovírus tem o genoma composto por duas cópias de RNA fita simples, são estruturados por um envelope lipídico, capsídeo protéico e tem a enzima transcriptase reversa no interior da partícula do vírus. Os vírus mais usados e conhecidos desse grupo são os vírus da imunodeficiência humana (HIV), pertencentes ao grupo dos lentivírus. Existem muitas vantagens no uso desses vírus na terapia gênica, tais como, grande eficiência de transfecção, baixa imunogenicidade, boa integração ao genoma e expressão bastante prolongada do transgene. Embora possua grandes vantagens, os vetores retrovirais só têm boa aplicação em estratégia *ex vivo* e apenas conseguem infectar células que estejam em divisão e que possuem bom potencial de replicação, como as células sanguíneas (TENÓRIO; SILVA; HAN, 2008; CAO; CRIPPS; WEI, 2010; VARGAS et al., 2016).

Os vírus adeno-associados são pequenos vírus de DNA fita simples pertencentes à família parvoviridae, são considerados ótimos vetores devido a: uma alta eficiência de entrada em diferentes tipos celulares, principalmente em células cerebrais e das córneas, conseguirem fazer transfecção, a qual é bastante duradoura, e não causarem muita imunogenicidade. A grande limitação desse vetor é o seu tamanho, menor que a maioria dos outros vírus, o qual suporta transportar apenas genes de tamanho pequeno, também, são difíceis de serem produzidos (CHACÓN-CAMACHO; ASTORGA-CARBALLO; ZENTENO, 2015; TOMÁS, 2010; MAO et al., 2016).

3.4 Aplicações

A terapia gênica hoje ainda se encontra em fase experimental e inicialmente foi pensada para o tratamento de doenças hereditárias com caráter monogênico, como no caso das hemofilias, fibrose cística e distrofias musculares, mas o fato de doenças adquiridas terem alta incidência em todo o mundo fez com que as pesquisas crescessem em busca de tratamentos para doenças como câncer, infecção por HIV e doenças cardiovasculares para conseguir beneficiar o maior número de pacientes (MENK; VENTURA, 2007; NABAIS, 2015).

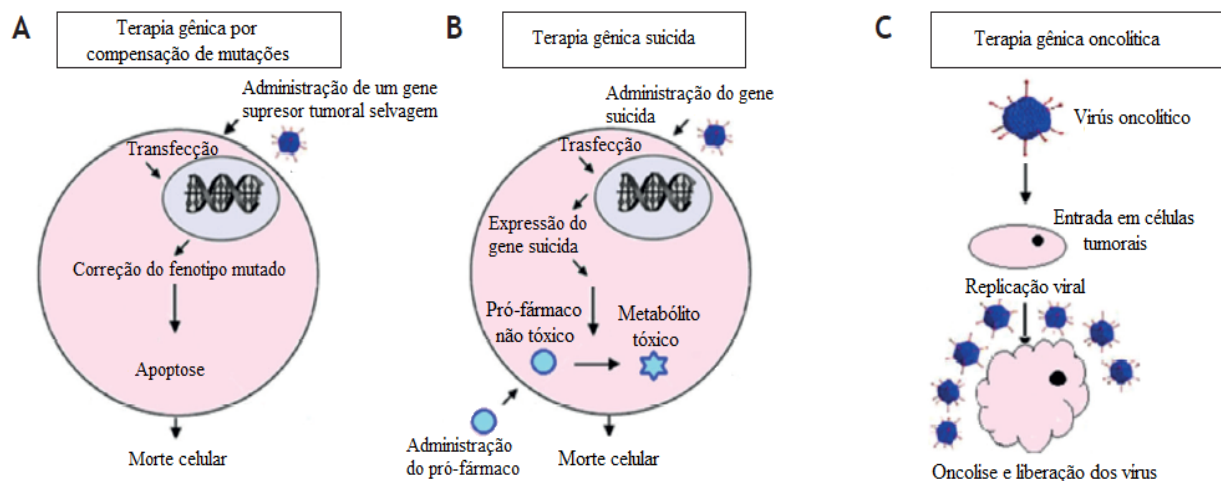
A terapia gênica foi pensada no grande número de pessoas que hoje sofrem de doenças que não possuem cura ou que o tratamento é de difícil acesso ou contem grandes efeitos colaterais. A terapia gênica possui como vantagem seu alto grau de pontualidade terapêutica e poucos efeitos colaterais possíveis, também pode ser levado em consideração o amplo campo de aplicação que pode ser voltada não apenas para tratamentos de doenças. As novas descobertas da biotecnologia colaboram bastante para se alcançar essas vantagens na terapia gênica, devido a vetores cada vez mais eficientes e menos imunogênicos e, também, a técnicas de edição de genoma muito pontuais (BORSATTO, 2015).

3.4.1 Câncer

No câncer as células tumorais tendem a ter características que fazem com que elas se proliferem descontroladamente e sem entrarem em apoptose, podendo invadir outros tecidos ao redor ou longe do local de origem. Proto-oncogenes e genes supressores tumorais são genes que se encontram em todas as células e controlam respectivamente a proliferação e a morte celulares. Sendo assim, mutações nesses genes

podem causar descontrole na proliferação celular e causar um câncer como consequência. A terapia gênica aplicada ao câncer foi desenvolvida tentando eliminar células tumorais, melhorar a resposta imune e impedir a proliferação celular e, devido a isso, existem três principais tratamentos genéticos para o câncer, que são: terapia gênica de compensação de mutações, terapia gênica suicida e a terapia oncolítica (figura 4) (ROUANET et al., 2017).

Figura 4 – Estratégias de terapia gênica para o tratamento de câncer.



Legenda: Na figura são demonstrados três caminhos para terapia gênica no câncer. A, uso de um vetor viral para a transfecção e substituição de um gene supressor tumoral ou proto-oncogene mutado por um selvagem resultando na apoptose da célula; B, vetor viral é utilizado para transfecção do gene suicida, a expressão desse gene causa a modificação de um pró-fármaco não tóxico em um metabólito tóxico, o qual estimula a morte celular; C, vírus modificados infectam células tumorais e se replicam até causar lise das células.

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ et al. (2014).

A maioria dos cânceres tem uma ou mais mutações nos proto-oncogenes e genes supressores tumorais causando uma proliferação descontrolada ou imortalidade. Pensando nisso a proposta de terapia com compensação de mutações tem como objetivo trocar esses genes mutados por genes selvagens para restabelecer o metabolismo normal da célula. O uso do gene selvagem *P53* (gene supressor tumoral) é um grande exemplo e um dos focos desse método. Devido ao fato de ser um dos genes mais frequentemente mutados em células tumorais, esse gene é geralmente adicionado ao genoma de um adenovírus para transfecção, que ao se integrar no genoma da célula estimula a morte da célula tumoral por apoptose (RODRIGUEZ et al., 2014).

A terapia oncolítica se baseia no princípio de utilizar um vírus modificado geneticamente para infectar células tumorais e, assim, se replicar até causar a lise nessas células. Para a realização desse método é utilizado em sua maioria os adenovírus, pois eles têm ciclo de replicação lítico, que é mais rápido. Esses vetores são modificados para se tornarem seletivos a células tumorais e realizarem uma infecção mais específica. Um exemplo desse tratamento é o uso do adenovírus ONYX-015, que foi geneticamente modificado para se replicar e causar lise em células tumorais que são deficientes de *gene p53* (RODRIGUEZ et al., 2014; TURNBULL; WEST; SCOTT et al., 2015).

Na terapia gênica suicida o mecanismo de ação é fazer a transfecção de um gene que produz alguma proteína ou enzima, capaz de transformar um pró-fármaco em metabólico tóxico para a célula e como resultado morte celular. Um exemplo que pode ser citado é a transfecção do gene que codifica a timidina quinase do herpes simples em células tumorais, para que essas realizem a síntese de um metabólito tóxico quando ocorrer à administração de fármacos para herpes, como o Ganciclovir. A timidina quinase que começa a ser produzida pela célula tumoral faz a fosforilação do Ganciclovir, esse Ganciclovir fosforilado se torna tóxico na célula e interfere nos processos de replicação de DNA assim causando apoptose da célula (FU et al., 2010; ROUANET et al., 2017).

Na terapia gênica para o câncer também existem outras estratégias menos abordadas em ensaios clínicos, são elas a terapia gênica antiangiogênese e a imunopotenciadora. Na terapia antiangiogênica o objetivo é fazer a supressão dos fatores de angiogênese e estimular fatores antiangiogênicos, como a endostatina. Já na terapia imunopotenciadora são usados vetores para aumentar a imunogenicidade das células tumorais, fazendo com que essas produzam antígenos tumorais ou citocinas que estimulem a resposta celular de células de defesa (CAO; CRIPPS; WEI, 2010).

Alguns testes clínicos foram aprovados e realizados na China, e eles acabaram demonstrando uma considerável ação da terapia gênica no tratamento de câncer de células escamosas da cabeça e pescoço, no qual pacientes que utilizavam a terapia gênica em conjunto com quimioterapia tinham uma regressão melhor do câncer que pacientes que faziam apenas o tratamento convencional. Um teste realizado em 2003 fez o uso do medicamento chamado Gendicine durante 12 semanas, sendo esse medicamento composto por um adenovírus recombinante com o gene *p53* selvagem. Os resultados dos testes clínicos com o uso desse medicamento foram que 93% dos pacientes que foram submetidos à combinação de terapia gênica com a radioterapia

tiveram alguma regressão do câncer, sendo 64% com regressão completa e 29% apenas parcial. Já pacientes que apenas foram submetidos somente à radioterapia 79% tiveram alguma regressão, sendo apenas 19% completa e 60% parcial (SIDDIQUE, 2016; LIU; KIRN, 2005).

3.4.2 Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O HIV é o vírus que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Esse vírus pertence à família *retroviridae* e ao gênero *lentivirus*, tem seu ciclo replicativo do tipo lisogênico, ou seja, tem integração do seu material genético no genoma da célula hospedeira e, devido a isso, ele possui um grande tempo de incubação. Hoje milhões de pessoas são portadoras do HIV, embora muitos consigam ter uma vida normal e sem desenvolver a AIDS devido a terapia de medicamentos anti-retrovirais, durante toda a vida. Vale ressaltar que ainda não existe uma cura comprovada e o vírus ainda é existente em latência devido à integração de seu genoma no DNA das células do hospedeiro, caracteristicamente, as células de defesa, principalmente em linfócitos T auxiliares (TCD4+). A entrada do HIV em células T auxiliares é devido à adesão do vírus na molécula CD4+ e sua interação com os co-receptores CCR5 e CXCR4, o qual permite a fusão de membranas (SANTOS, 2015).

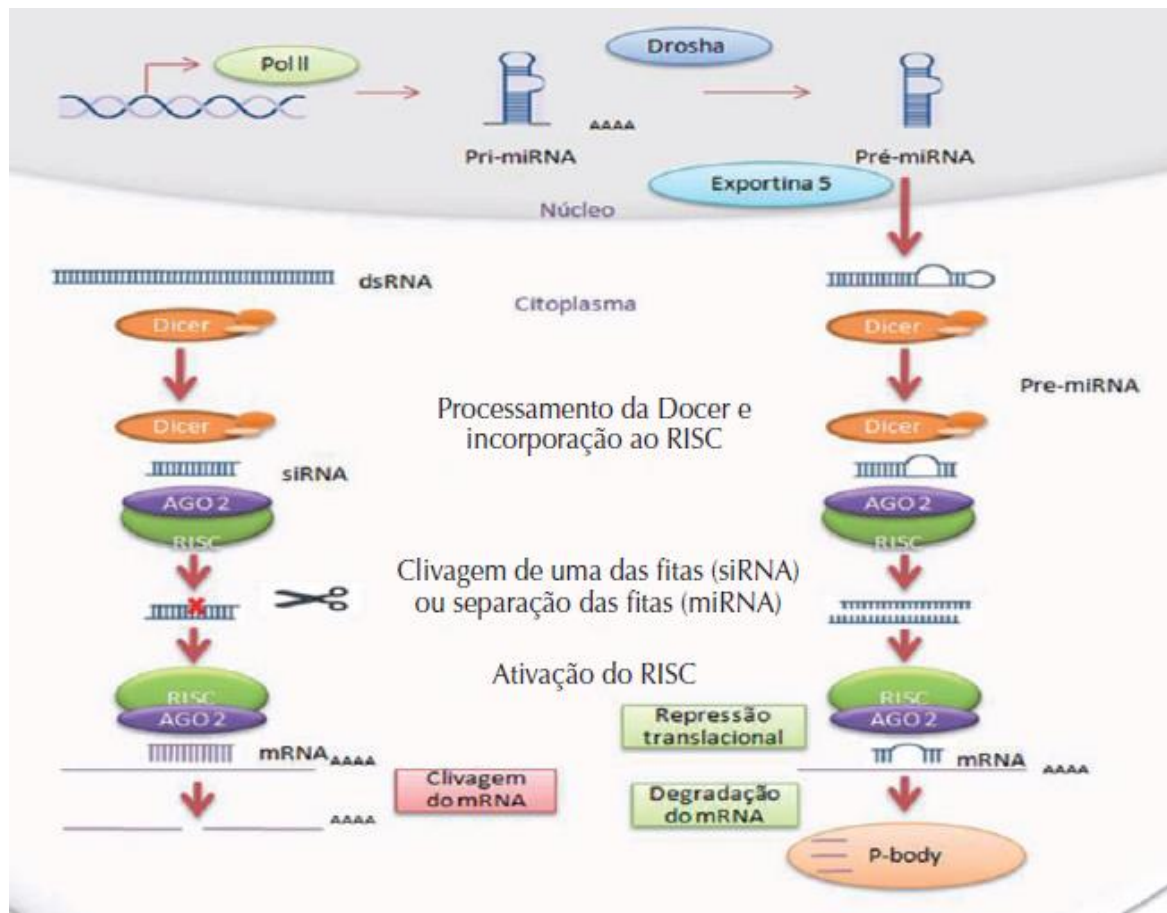
A aplicação da terapia gênica no tratamento do HIV pode acontecer de duas formas, silenciamento de genes por meio de RNAs de interferência (RNAi) ou por edição de genoma, no qual se vislumbram dois alvos, o primeiro é o gene que codifica o co-receptor CCR5, receptor essencial para entrada do vírus nas células, dos linfócitos T auxiliares e, o segundo alvo, é o próprio genoma do vírus HIV (NABAIS, 2015).

3.4.2.a Silenciamento por RNA - HIV

O silenciamento induzido pelo complexo de silenciamento ou de não-expressão induzido pelo RNA (RISC – *RNA-induced silencing complex*) é um mecanismo que existe naturalmente nas células humanas e consiste em um processo que produz um complexo de proteínas com um RNA pequeno incorporado que serve como guia para um determinado RNA mensageiro (mRNA) o qual tem complementaridade de bases. O RNA incorporado ao RISC pode ser um microRNA (miRNA) ou um RNA pequeno de interferência (siRNA), este último sendo de origem viral ou sintética (Figura 5). Os RNAs têm sido feitos sinteticamente para serem bastante específicos. Quando um dsRNA exógeno é introduzido na célula, acontece a clivagem pela proteína DICER que

é uma enzima do grupo da RNaseIII que reconhece e cliva grandes RNAs, e permite a incorporação no complexo RISC (CAVAGNARI, 2011; VLACHAKIS et al., 2013).

Figura 5 – Processo de silenciamento mediado pelo siRNA ou miRNA em associação com o complexo RISC.



Legenda: Na esquerda a RISC usa um siRNA exógeno, incorporado pela Dicer, para fazer silenciamento/clivagem do mRNA. Na parte superior e direita pode ser visto o processamento de um miRNA, mostrando sua origem no DNA da célula, clivagem pela Drosha e Dicer, nessa ordem, e incorporação a RISC para fazer o silenciamento/clivagem do mRNA.

Fonte: FRANÇA et al (2010).

O silenciamento pelo complexo RNA-RISC na célula humana naturalmente se inicia quando uma cadeia dupla de RNA (dsRNA) se origina de partes não codificantes do genoma transcrito pela RNA polimerase II. Esse dsRNA inicialmente é chamado de microRNA primário (pri-miRNA) que acaba sendo clivado pelo complexo enzimático Drosha (RNase III) e dá origem ao pré-microRNA (pré-miRNA), que contém aproximadamente 70 pares de bases. O pré-miRNA é transportado para o citoplasma

pela exportina-5 e, ao chegar ao citoplasma, ele é clivado pela enzima DICER, em um microRNA (miRNA) com cerca de 21 a 23 pares de bases. A proteína DICER também incorpora uma das fitas do miRNA, fita complementar, ao complexo RISC e, assim, formando um complexo que consegue silenciar ou degradar o mRNA (FRANÇA et al, 2010).

A aplicação dessa técnica no combate ao HIV tem como objetivo usar RNA de interferência (RNAi) sintético e, o mais usado é o siRNA, junto ao sistema do complexo RISC para silenciar genes de replicação ou de infectividade do vírus durante a replicação, pois nesse momento tem exposição do genoma viral por meio do mRNA. Sendo assim, esse tipo de tratamento inibe a replicação viral e tenta diminuir a infectividade do vírus, fazendo com que, quando utilizada em ensaios laboratoriais com camundongos, haja a redução da carga viral no organismo. Esse tipo de tratamento possui uma baixa toxicidade ao hospedeiro, não tem efeitos sobre os genes do hospedeiro e pode ser combinada com outras terapias antivirais (VLACHAKIS et al., 2013; BADIA et al., 2017).

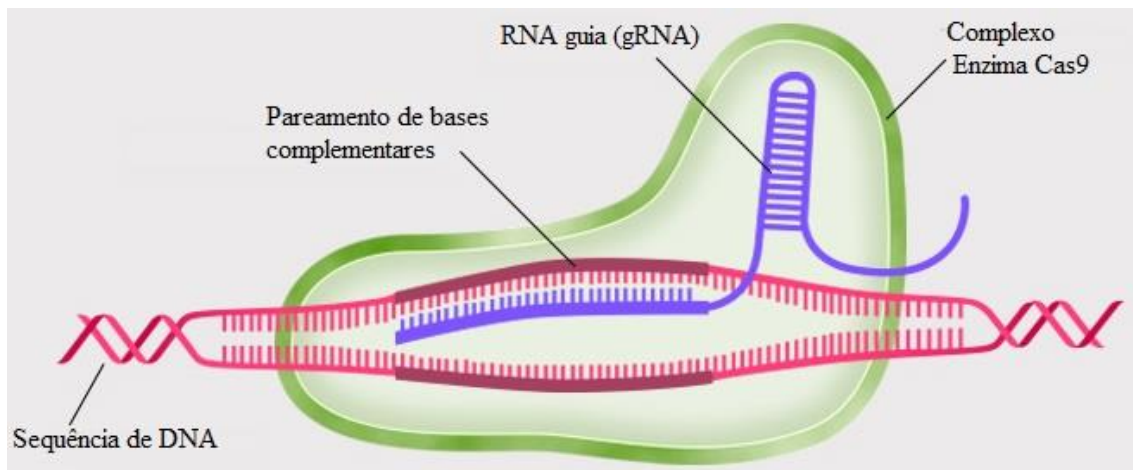
3.4.2b Edição de Genoma - HIV

O método de edição de genoma para eliminar o vírus HIV começou a ser pensado depois da descoberta de um paciente curado, devido ao recebimento de medula óssea, para tratamento de leucemia, de um doador que continha uma mutação no gene do receptor de membrana CCR5. A partir dessa descoberta, o CCR5 e seu co-receptor CXCR4 viraram um possível alvo terapêutico da terapia gênica, no qual o objetivo seria fazer a substituição dos genes normais por genes mutados desses receptores, como o gene CCR5 Δ 32, para que estes quando expressos nas membranas carregassem uma mutação que garantisse à célula resistência a ligação, reconhecimento e entrada do HIV (JÚNIOR et al, 2015; SOPPE; LEBBINK, 2017).

As novas estratégias de edição de genoma tornaram possível a excisão do genoma viral do HIV presente no DNA das células que tem a infecção em latência. O sistema formado por repetições palindrômicas curtas, interespaçadas e regulamente agrupadas (CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associado com a endonuclease Cas9 é uma dessas novas estratégias, permitindo que a Cas9 identifique o genoma do vírus, através de RNA guia (gRNA) e faça a excisão dos segmentos de DNA pró viral em diversas células, incluindo os linfócitos T auxiliares (LEE et al., 2016; WHITE et al., 2017).

O sistema CRISPR/Cas9 é originado do sistema imunológico de bactérias, onde CRISPR dá origem a um gRNA, derivado de sequências de genes adquiridos por um contato prévio ao invasor, que se liga a uma enzima de restrição (Cas9) para detectar e degradar material genético invasor em uma reinfecção, com o DNA proveniente de vírus (Bacteriófagos), concedendo imunidade a elas. O uso desse sistema na terapia gênica acontece com a produção *in vitro* de gRNA sintético e de Cas9 (Figura 6), para serem o mais específicos possíveis a um dado vírus, por exemplo, e incorporados ao sistema de entrega por vetores virais (AREND; PEREIRA; MARKOSKI, 2016; NICHOLSON; PEPPER, 2017).

Figura 6- Edição de genes efetuada pela endonuclease Cas9.



Legenda: A Cas9 (verde) ligada a um gRNA em formato de CLIP (azul) consegue reconhecer áreas específicas no DNA devido ao pareamento de bases complementares e, assim, fazer a excisão de genes específicos.

Fonte: Adaptado de Hobbs (2016).

Estudos atuais e ensaios clínicos demonstram que quando é utilizado apenas um tipo de gRNA o vírus rapidamente consegue escapar da edição mediada por CRISPR/Cas9. Então, a melhor forma de fazer a excisão é utilizar um multiplex com quatro gRNA, visando várias áreas do genoma viral, como os genes *gag*, *env*, *pol*, LTR e principalmente genes de replicação viral. Esses estudos e ensaios clínicos mostram que ao se utilizar a Cas9 derivada de *Staphylococcus aureus* (saCas9) junto com o multiplex em camundongos transgênicos, com células contaminadas por HIV-1, houve uma considerável quebra do HIV integrado no genoma das células de diversos tecidos, esse resultado foi investigado pelo uso de PCR para genotipagem, além de ter sido

alcançado em apenas 4 semanas. A estratégia de entrega do *saCas9*-multiplex foi realizada por meio de dois tipos de vírus adeno-associados (AAV), o AAV-DJ e o AAV-DJ/8, os quais são geneticamente modificados e contêm capsídeos derivados de diversos sorotipos de AVV (FEELIXGE; JEROME, 2017; YIN et al., 2017).

As duas formas de terapia gênica no HIV utilizam endonucleases associadas com RNA, entretanto, no silenciamento por RNA o método consiste basicamente em diminuir infectividade e replicação viral, assim como na terapia convencional com anti retrovirais, sem destruir o genoma viral em latência no DNA das células hospedeiras. Já na edição de genoma acontece a excisão do genoma viral do DNA das células hospedeiras, assim diminuindo a carga viral em latência proporcionando um tratamento mais ideal para o combate total ao vírus (JÚNIOR et al, 2015; NICHOLSON; PEPPER, 2017).

Os diversos vetores e formas de introdução de genes, as diferentes técnicas de edição de genoma e as várias maneiras de aplicação tornam a terapia gênica uma ótima estratégia para tratamentos de doenças, podendo contorná-las de muitos jeitos. Mas não só como tratamento de doenças a terapia gênica tem diversas aplicações que vão desde reprogramação celular até doping genético (NABAIS, 2015).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A terapia gênica é uma ótima perspectiva de tratamento para os diversos tipos de doenças e com uma ampla forma de aplicação a qual visa a melhor forma para se alcançar uma cura sem grandes efeitos colaterais. Diversos estudos e ensaios clínicos buscam uma prova concreta da eficácia da tão sonhada terapia gênica, e esses estudos mostram como os avanços da biotecnologia têm efeitos positivos sobre a edição de genes e a aplicação da terapia.

Apesar de ser uma proposta teoricamente perfeita a terapia gênica enfrenta muitas dificuldades às quais vão desde as limitações da tecnologia até possíveis efeitos ainda não descobertos. Um dos grandes desafios é o sistema de entrega dos genes, o qual além de ter que contornar as reações imunes do paciente e proteger o gene de possíveis danos, tem que ter um bom sistema de entrada e fixação do gene. Também existem os problemas que envolvem dificuldades na produção de vetores e em outras técnicas de manipulação de material genético.

O maior receio de se usar a terapia gênica é quanto ao material genético que vai ser introduzido na célula, pois este pode ser inserido em locais incorretos ou não adequados no genoma e causar diversas consequências, como induzir um crescimento tumoral. Além das possibilidades de causar novas mutações prejudiciais, há também a possibilidade do gene não ser expresso e/ou sofrer mutações resultando no fato de não ser expresso ou ser inativado.

Os desafios ainda são muitos e diversas barreiras ainda precisam ser vencidas, mas, a terapia gênica se apresenta como uma esperança de tratamento para diversas doenças sem cura e, assim, os avanços nas pesquisas e tecnologias se fazem de extrema ajuda e necessidade para a aplicação dessa metodologia. É de se esperar que fique cada vez mais próximo o dia no qual a terapia gênica será um dos tratamentos disponíveis para a população.

REFERÊNCIAS

- AMER, M. H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. **Molecular and Cellular Therapies**, Shanghai, v.2, n.7, ago, 2014.
- AREND, M. C.; PEREIRA, J. O.; MARKOSKI, M. M. O Sistema CRISPR/Cas9 e a possibilidade de edição genômica para a cardiologia. **Arquivo brasileiro de cardiologia**, São Paulo, v.108, n.1, p. 81-83. 2017.
- ARTIOLI, G. G.; HIRATA, R. D. C.; JUNIOR, A. H. L. Terapia gênica, doping genético e esporte: fundamentação e implicações para o futuro. **Revista brasileira de medicina do esporte**, São Paulo, v. 13, n. 5, p. 349-354, set/out. 2007.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M.; ARGÜELLES, S.; ZURITA, F.; CANO, M. Advanced therapy medicinal products: Gene therapy. **Pharmaceuticals Policy and Law**, Philadelphia, v. 17, p. 253-264. 2015.
- BADIA, R.; BALLANA, E.; ESTÉ, J. A.; RIVEIRA-MUÑOZ, E. Antiviral treatment strategies based on gene silencing and genome editing. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 24, p. 46-54, jul, 2017.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 167-179, abr/jun. 2007.
- BORSATTO, S. C. **Terapia gênica: sucessos e insucessos**. 2015. 44 f. Dissertação (especialização) do programa de ensino a distância da Universidade Federal do Paraná, Paranaíba, 2015.
- BROWN, T.A. Vectors for gene cloning: Plasmids and bacteriophages. In: BROWN, T.A. **Gene cloning and DNA analysis : an introduction**. Malaysia: Graphicraft Limited, 2010. p. 13-24.
- CAO, S.; CRIPPS, A.; WEI, M. Q. New strategies for cancer gene therapy: Progress and opportunities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford v. 37, p. 108-114, dez, 2010.
- CAREY, J.; WHITE, B. Genetic Testing and Gene Therapy. In Mosby (Ed.), **Medical Genetics** (3ª ed., pp. 296-302). 2003.

CAVAGNARI, B. M. Terapia gênica: los ácidos nucleicos como fármacos. Mecanismos de acción y vías de entrega a La célula. **Archivos Argentinos de Pediatría**, Buenos Aires, v.109, n. 3, p. 237-244. 2011.

CHACÓN-CAMACHO, O. F.; ASTORGA-CARBALLO, A. A.; ZENTENO, J. C. Gene therapy for hereditary ophthalmological diseases: Advances and future perspectives. **Gaceta Médica de México**, v.151, p.469-478. 2015.

COCÔ, M.; HAN, S. W.; SALLUM, J. M. F. Terapia gênica em distrofias hereditárias de retina. *Arquivo brasileiro de oftalmologia*, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 560-566. 2009.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. R. **BIOTECNOLOGIA: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. Ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011.

FÉCCHIO, D. C.; MACEDO, L. C.; RICCI, G. C. L. O uso da terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p. 44-49, jan/mar. 2015.

FEELIXGE, H. S. S.; JEROME, K. R. Exision of latent HIV-1 from infected cells in vivo: Na important step forward. **Molecular therapy**, Cambridge, v. 25, n. 5, maio. 2017.

FRANÇA, N. R.; JÚNIOR, D. M.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.50, n.6, p. 695-709. 2010.

FU, Y.; DU, J.; YANG, R.; YIN, L.; LIANG, A. Potential adenovirus-mediated gene therapy of glioma cancer. **Biotechnology Letters**, Oxford, v. 32, p. 11-18, Jan, 2010.

GERSTEIN, M. B.; BRUCE, C.; ROZOWSKY, J. S.; ZHENG, D.; DU, J.; KORBEL, J. O.; EMANUELSSON, O.; ZHANG, Z. D.; WEISSMAN, S.; SNYDER, M. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, v. 5, n. 1, p. 669-681, jun, 2007.

GINN, S. L. et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. **The Journal of Gene Medicine**, Chichester, v. 15, n.2, p. 65-7, fev. 2013.

HOBBS, B. CRISPR: The new tool in the gene editing revolution explained. 2016. Disponível em: <http://www.abc.net.au/news/science/2016-04-07/crispr-gene-editing-technology-explainer/7217782#lightbox-content-lightbox-13>. Acesso em: 24 jun. 2017.

- JOAQUIM, L. M.; EL-HANI, C. N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientia estudia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 93-128. 2010.
- JÚNIOR, A. J. B.; PINHEIRO, A. G. C.; SIMEÃO, F. N.; VALADARES, G. D. S. A engenharia genética como nova metodologia de combate ao HIV: A terapia gênica, a interferência por RNA e suas aplicações. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 13, n. 3, p. 50-55. 2015.
- LASTRA, O. L. V. Terapia gênica. **Medicina Interna de México**, Ciudad de México v. 22, n. 5, p. 422-438, set/out. 2006
- LAZO, J. S., GRANDIS, J. R. Terapia gênica. CRAIG, C. R. / STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna** - 6ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- LEE, J.; CHUNG, J.; KIM, H. M.; KIM, D.; KIM, H. Designed nucleases for targeted genome editing. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.14, p. 448-462, jan. 2016.
- LINDEN, R. **Genes contra doenças. Terapia gênica: Uma nova era na genética**. 1. ed. Rio de Janeiro: Vieira e Lent, 2008.
- LINDEN, R. **Terapia gênica: o que é, o que não é e o que não será**. Estudos Avançados 24 (70). 2010.
- LIU, T.; KIRN, D. Gene therapy progress and prospects cancer: Oncolytic viruses. **Gene Therapy**, Londres, v. 15, n. 12, p. 877–884, jun, 2008.
- LOPES, S. **Bio: volume único**. 2 ed. São Paulo: Saraiva, 2008.
- MAO, Y.; WANG, X.; YAN, R.; HU, W.; LI, A.; WANGS, S.; LI, H. Single point mutation in adenovirus-associated viral vectors –DJ capsid leads to improvement for gene delivery in vivo. **BMC Biotechnology**, Londres, v. 16, n. 1, dez, 2016.
- MENCK, C. F. M.; VENTURA, A. M. Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**. São Paulo, n75, p. 50-61, set/nov. 2007.
- NABAIS, A. T. G. **Técnicas de edição de genoma como abordagem promissora para a terapia gênica**. Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências farmacêuticas no Instituto de Superior de Ciências da saúde Egas Moniz, Almada, 2015.
- NICHOLSON, S. A; PEPPER, M. S. CRISPR-Cas: Revolutionising genome engineering. **South African Medical Research**, Cape Town, v.106, n.9, set, abr, 2016.

NUSSBAUM, R.L. et al. **Thompson & Thompson – Genetica Medica**. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

PEKING, P. et al. A Gene Gun-mediated Nonviral RNA trans-splicing Strategy for Col7a1 Repair. **Molecular therapy**, Cambridge, v.1, n. 5, mar, 2016.

PÉREZ-LÓPEZ, J. Terapia gênica en el tratamiento de los errores congénitos del metabolismo. **Medicina clinica**, 2013.

RODRÍGUEZ, J. A.; MARTÍNEZ, L. M.; CRUZ, N.; CÓMBITA, A. L. Terapia génica para el tratamiento Del câncer. **Revista Colombiana de cancerologia**, Bogotá, v. 18, n.1, p. 27-40. 2014.

ROUANET, M.; LEBRIN, M.; GROSS, F.; BOURNET, B.; CORDELIER, P.; BUSCAIL, L.; Gene for Pancreatic Cancer: Specificity, Issues and Hope. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, jun, 2017.

SANTALLA, M.; FESSER, E.; ASAD, A. S.; ACOSTA, D.; HARNICHAR, E.; FERRERO, P. V. Terapia génica: desde los extractos y las píldoras a las pociones de ADN. **Insight Medical Publishing Journals**, v. 9, n. 2:3, p. 1-9. 2013.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SIDDIQUE, N.; RAZA, H.; AHMED, S.; KHURSHID, Z.; ZAFAR, M. S. Gene therapy: A paradigm shift in dentistry. **Genes**, Basileia, v.7, n. 98, mar, 2016.

SOPPE, J. A.; LEBBINK. R. J. Antiviral goes viral: harnessing CRISPR/Cas9 to combat viruses in humans. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 1, n. 1, abr, 2017.

TENÓRIO, L. Z.; SILVA, F. H.; HAN S. W. A Potencialidade dos Lentivectores na Terapia. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 6, p. 260-267, jun, 2008.

TOMÁS, H. A. **Desenvolvimento de linhas celulares produtoras de vetores retrovirais para terapia gênica**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Estudos em biotecnologia na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2010.

TURNBULL, S.; WEST, E.J.; SCOTT, K.J.; APPLETON, E.; MELCHER, A.; RALPH C. Evidence for Oncolytic Virotherapy: Where Have We Got to and Where Are We Going?. **VIRUSES**, Basileia, v. 3, n. 1, p. 6291-6312, jun, 2015.

VALENTIM, M. Como é feita a terapia genética? 2016. Disponível em: <http://mundoestranho.abril.com.br/saude/como-e-feita-a-terapia-genetica/>. Acesso em: 23 jun. 2017.

VARGAS, J. E.; CHICAYBAM, L. STEIN, R. T.; TANURI, A.; DELGADO-CANEDO, A.; BONAMINO, M. A. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. **Jornal of translational medicine**, Londres, v.14, n. 288, set, 2016.

VLACHAKIS, D.; TSILIKI, G.; PAVLOPOULOU, A.; ROUBELAKIS, M. G.; TSANIRAS, S.C.; KOSSIDA, S. Antiviral Stratagems Against HIV-1 Using RNA Interference (RNAi) Technology. **Evolutionary Bioinformatics**, Thousand Oaks, v.9, p. 203-213, out, 2013.

WHITE, M. K.; KAMINSKI, R.; YOUNG, W.; ROEHM, P. C.; KHALILI, K. CRISPR editing in biological and biomedical investigation. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 116, n. 12, abr, 2017.

XU, X.; TAILOR, C. S.; GRUNEBAUM, E. Gene therapy for primary immune deficiencies: a Canadian perspective. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, Lodres, v.13, n.14, fev, 2017.

YIN, C.et al. In Vivo Excision of HIV-1 Provirus by saCas9 and Multiplex Single-Guide RNAs in Animal Models. **Molecular Therapy**, Cambridge, v.25 n. 5, p. 1168-1186, may, 2017.