

Terapia Gênica

Eliane S. Azevêdo

Médica, Ph.D. em Genética, Pesquisadora do CNPq

Métodos e técnicas empregados em terapia gênica são registros em paralelo a conflitos éticos pertinentes. Técnicas de terapia gênica de células somáticas ex vivo e in vivo, e os tipos de vetores preferencialmente usados para transporte de DNA, são apresentadas de forma resumida, objetivando melhor compreensão de potenciais riscos e malefícios para o paciente. Do ponto de vista bioético, a terapia gênica de células somáticas é considerada comparável ao transplante de órgãos entre humanos. A terapia gênica de células germinativas, todavia, implica em mudança definitiva do genoma do paciente e seus descendentes; conseqüentemente, é apresentada com argumentos contrários favoráveis, conforme a literatura, acrescidos de comentários da autora.

UNITERMOS - Geneterapia, bioética, células germinativas, alterações do genoma

As questões bioéticas pertinentes à terapia gênica apresentam-se sob dois aspectos distintos em objetivos e conseqüências. O primeiro diz respeito à ação de modificar definitivamente o patrimônio genético, e essa mudança gera o conflito fundamental da terapia gênica de células germinativas. O segundo, decorre da possibilidade de danos à saúde advindos de procedimentos técnicos inerentes à própria transferência do DNA. Os riscos previstos dizem respeito tanto à terapia gênica de células Terminativas quanto à de células somáticas. Conseqüentemente, a discussão bioética em terapia gênica estende-se do respeito ao princípio da autonomia sobre o genoma individual aos prováveis malefícios advindos das técnicas empregadas (1). Como os riscos das conseqüências diretas dos procedimentos técnicos, os aspectos bioéticos do binômio risco-benefício somente podem ser avaliados em paralelo ao conhecimento das técnicas em uso.

Métodos e técnicas em terapia gênica

A seguir, conceitos e procedimentos em terapia gênica serão aqui revistos de forma geral e sumária.

Terapia gênica ou geneterapia é o tratamento, ou a sua tentativa, de doenças genéticas ou não-genéticas por meio da introdução, em células específicas do paciente, de cópias de genes com objetivos terapêuticos. Assim, terapia gênica é o uso de genes ao invés de drogas para tratamento de doenças.

A possibilidade de transferir informação genética de um organismo para outro, que constitui o fundamento da terapia gênica, é conhecida, em bactérias, desde 1944, a partir da clássica experiência de Avery, McLeod e McCarty (2). Nas décadas de 60 e 70, a idéia de transferir genes para curar doenças em humanos tornou-se mais próxima da realidade: desenvolveram-se linhas de células geneticamente marcadas; compreendeu-se o mecanismo de transformação celular em mamíferos pelos vírus polioma e SV40 e, posteriormente, criaram-se as técnicas de DNA recombinante permitindo, assim, a primeira tentativa de transferência gênica em organismos complexos (3,4,5).

No final da década de 80, o National Institutes of Health (NIH) aprovou o primeiro protocolo para teste de terapia gênica em humano, o qual consistia na transferência de genes do sistema imune para um paciente em estado avançado de neoplasia maligna. O objetivo, à época, não era avaliar eficácia terapêutica, mas sim demonstrar que um gene pode ser transferido, com segurança, para dentro do paciente e em seguida identificado em células retiradas do mesmo (5,6,7,8). Em 1990, foram realizados nos Estados Unidos, com objetivos clínicos científicos, os primeiros casos de terapia gênica em humanos: duas crianças com deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA) foram tratadas por terapia gênica somática, visando avaliar a eficácia terapêutica de linfócitos autólogos nos quais se inseriu o gene normal da ADA, e determinar a sobrevivência desses linfócitos in vivo e o tempo de expressão do gene nele inserido (7). Para Weatherall, os procedimentos técnicos necessários à terapia gênica em humanos são fáceis de enumerar (cinco passos), porém difíceis de alcançar (8): o primeiro passo consiste em isolar o gene e suas seqüências reguladoras; o segundo - visando a obtenção de um número necessário de células para reintrodução no paciente -, na necessidade de se obter em cultura uma quantidade suficiente de células retiradas do paciente, nas quais será inserido o gene terapêutico. O terceiro passo é dispor de um mecanismo eficiente (vetores) para inserir o gene nas células; o quarto, que o gene inserido incorpore-se ao genoma celular e funcione, isto é, que haja produto gênico em quantidade suficiente e por longo tempo; e o quinto, que todos estes procedimentos não apresentem efeitos colaterais indesejáveis (9,10).

Dois tipos de técnicas, denominadas de *ex vivo* e *in vivo*, são utilizadas para levar genes para o interior das células somáticas do corpo humano. Na técnica *ex vivo*, retiram-se células do paciente, faz-se cultura das mesmas, usam-se vetores para nelas inserir o gene previamente isolado e engenheirado, e, por infusão, essas células tratadas são levadas de volta ao paciente. As células da medula são as mais usadas em terapia *ex vivo*, embora existam testes em outros tipos de células. Na técnica *in vivo*, o gene engenheirado é levado diretamente ao organismo do paciente, também usando vetores, porém dispensando a retirada de células e sua subsequente reintrodução no paciente (5).

O isolamento do gene e o seu teste em culturas de células não constituem grandes problemas de ordem técnica e/ou bioética para fins de tratamento de doenças. A tecnologia de DNA recombinante, desenvolvida em organismos simples, vem sendo, com sucesso, transposta para organismos complexos, inclusive o humano. O desenvolvimento de vetores, todavia, continua sendo um dos grandes problemas em terapia gênica, tanto do ponto de vista técnico como ético. O gene isolado e replicado precisa de um vetor que o transporte para dentro de células específicas do paciente, que o incorpore ao DNA destas células e o ative para desempenho exclusivo e adequado da função corretiva desejada (11).

Vetores mais usados em terapia gênica

Ainda que haja maior ênfase nas pesquisas para construção de vetores vireis, existe também busca por vetores físicos e químicos. Um segmento de DNA pode ser posto dentro de uma célula por métodos relativamente simples como coprecipitação em fosfato de cálcio, inclusão em vesículas de lipídios, bombardeamento com partículas de ouro ou de tungstênio e até mesmo injeções diretas de DNA. Todavia, o uso de vetores não-virais, ainda que aparentemente mais seguros, tem demonstrado pouca eficácia devido à expressão temporária do DNA transportado (9,12).

Os primeiros testes com vetores virais ocorreram na década de 80, utilizando vírus do papiloma e adenovírus. Em 1989, os retrovírus tornaram-se o mais eficaz e popular modelo de vetores. Os últimos cinco anos foram marcados por entusiasmos e frustrações nas pesquisas com vetores, creditando-se a esses a responsabilidade pelo não-avanço em terapia gênica (10). Em 1994, o NIH reconheceu a importância de se resolver o problema dos vetores em terapia gênica e anunciou um investimento da ordem de 3,5 milhões de dólares para o estabelecimento de alguns laboratórios nacionais de vetores (13). Em 1996, já existiam três desses laboratórios concentrando equipes multidisciplinares de cientistas trabalhando no conhecimento e produção de vetores. Três vetores virais e um não-viral ocupam posição de destaque nas pesquisas: retrovírus; adenovírus e adenovírus associado; e complexos lipídios-DNA. Do balanço entre riscos e vantagens de cada tipo de vetor, a seguir discriminados, fundamentam-se as questões bioéticas:

Retrovírus - são os vetores preferidos em 80% das experiências clínicas em terapia gênica, pelo fato de apresentarem algumas vantagens tais como eficiente integração ao genoma da célula, e expressão gênica por longo tempo (14,15). Todavia, seu uso é restrito à terapia *ex vivo* devido às dificuldades para purificação e concentração vital, além do fato de que os retrovírus infectam exclusivamente as células que se dividem. Por serem vírus patogênicos, na construção de vetores retrovirais a parte viral patogênica é removida, por medida de segurança. Todavia, essa medida não exclui o perigo de reversão ao estado selvagem patogênico seguido de multiplicação viral e suas conseqüências, conforme relato em macacos (14). Esta possibilidade é uma das principais preocupações dos pesquisadores e instituições de vigilância em saúde pública, como a Food and Drug Administration (FDA) (15). Além disso, a integração dos retrovírus ao genoma humano ocorre ao acaso. Esse fato é também preocupante, pois existe, entre outras, a possibilidade de transformação neoplásica de células do paciente por mutagenese insercional (16). Ainda que as experiências em animais e humanos demonstrem que esse risco é baixo, existe risco adicional de transformação celular em decorrência de alta taxa de erros da transcriptase reversa do retrovírus (14,17);

Adenovírus e adenovírus associado - ao contrário dos retrovírus, os adenovírus representam preocupações bioéticas em menor escala mas também apresentam menor eficácia como vetores. As propriedades de poderem ser purificados em grandes quantidades e de infectarem qualquer tipo de célula, diferenciadas ou não, que se dividem ou não, constituem as vantagens dos adenovírus (18). Por outro lado, os adenovírus apresentam a grande desvantagem de conterem genes com potencial de estimular resposta imune no paciente e, conseqüentemente, efeitos adversos. Adenovírus e adenovírus associado estão sendo usados, de preferência, para o tratamento da doença fibrocística em animais experimentais e em humanos, por meio da instilação nas vias respiratórias. Vetores contendo o gene normal (alelo) da doença fibrocística penetram as células epiteliais e nelas se expressam os genes transportados. Todavia, a expressão gênica é transitória (duas a três semanas) e uma repetição terapêutica é caracterizada por expressão quase indetectável (16,18,19). Finalmente, os vetores adenovírus associados quando do tipo repetem a vantagem de serem sem fio específicos quanto à sua inserção no DNA, isso é, inserem-se no cromossomo 19, na região 13.4 do braço longo (18);

Complexos lipídios - DNA - os lipossomos catiônicos, por terem carga elétrica positiva, ligam-se espontaneamente

à superfície celular e diretamente ao DNA ou RNA, sem serem degradados pelos lisossomos. Estas propriedades fizeram com que os lipossomos tornassem-se um eficiente meio para transportar DNA para dentro de uma variedade de células em cultura. Todavia, a proporção entre os lipídios e a quantidade de DNA ou RNA deve ser cuidadosamente calculada para evitar intoxicação lipídica da célula a ser tratada (12).

Terapia gênica de células germinativas

Datam do início da década de 80 os primeiros trabalhos demonstrando ser possível introduzir segmentos de DNA (genes) no pronúcleo fertilizado de ratos, implantar os zigotos no oviduto e identificar os genes introduzidos em todas as células do animal recém-nascido. Os ratos nascidos dessa manipulação são chamados de transgênicos e já se tornaram ferramenta de amplo uso para o estudo de doenças genéticas, alterações do desenvolvimento, imunologia, oncologia e neurobiologia (20).

Nos últimos dez anos, os avanços obtidos com a produção de ratos transgênicos criaram uma nova área de conhecimento denominada, de forma ampla, de tecnologias de células embrionárias (21). Ainda que em ratos já seja possível promover alterações de células embrionárias usando vetores retrovirais, recombinação homóloga e inativação específica de gene gene knockout, em outros animais, devido a grande número de limitações, apenas a técnica da microinjeção vem sendo empregada (20,21). Mesmo em ratos, cujo genoma amplamente conhecido é fator favorável ao sucesso dessas técnicas, sérios problemas persistem, traduzindo a complexidade da manipulação do genoma embrionário. Baixa frequência de integração do gene introduzido; integração, produzindo deleção, duplicação e translocação; integração ocorrendo ao acaso dentro do genoma; risco potencial de mutagenese insercional devido à falta de controle do sítio de integração tendo como conseqüências o impedimento da função de um gene normal; a conversão de um protooncogene em oncogene e/ou a inativação de um gene supressor tumoral, são os problemas mais comumente citados (20).

Paralelamente ao desenvolvimento das técnicas de manipulação genética de embriões, está surgindo uma nova fronteira dentro da genética médica denominada genética da pré-implantação. Para Pergament e Bonnicksen, a genética da pré-implantação surge como uma conseqüência da possibilidade atual de fazer-se diagnóstico de doença genética em células embrionárias, antes da implantação (preimplantation diagnosis), e da possibilidade futura da instituição de alterações terapêuticas na pré-implantação (preimplantation therapy) ou seja, da terapia de células germinativas. Considerando as dificuldades de ordem clínica e laboratorial encontradas no diagnóstico da pré-implantação e o problema ético da manipulação de embriões, esses autores advertem ser absolutamente necessário e urgente que o American College of Medical Genetics, nos Estados Unidos, se posicione sobre questões de ética, segurança, precisão, custos e mérito em geral da genética da pré-implantação (22).

Dessa forma, a manipulação genética de embriões humanos e a terapia gênica de células germinativas, mesmo antes de terem sua viabilidade técnica comprovada, estão provocando forte impacto no cenário das discussões científicas devido aos problemas éticos pertinentes. Pela primeira vez em medicina, existem em alguns países legislação e/ou recomendação contra a manipulação de embriões e a terapia de células germinativas, mesmo antes de existirem as possibilidades técnicas para humanos (22,23).

A proposta fundamental da terapia gênica de células germinativas consiste na mudança definitiva da expressão gênica para fins terapêuticas e requer conhecimentos de princípios básicos de biologia, os quais estão sendo adquiridos com o próprio progresso das pesquisas. Modelos animais de doença humana vêm sendo usados da seguinte forma: ratos transgênicos, nos quais se insere o gene de certa doença genética humana, são produzidos e tenta-se por terapia gênica germinativa avaliar a eficácia do tratamento e compreender os princípios básicos de biologia envolvidos no mesmo. A experiência vem trazendo grandes lições: ratos engenheirados com o gene responsável pela síndrome de Lesch-Nyhan em humanos não apresentaram nenhuma característica da síndrome; a manifestação clínica da deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA) em ratos transgênicos difere fundamentalmente da verificada em humanos, isso é, os ratos morrem no período pré-natal devido à falência de múltiplos órgãos, à exceção da linfopoiese que, curiosamente, apresenta-se normal. Por outro lado, nos ratos transgênicos outras doenças genéticas apresentam-se de forma semelhante à observada em humanos, a exemplo da hipercolesterolemia familiar e da doença de Gaucher. Todavia, no dizer de Wilson, a lição mais importante consiste na identificação de efeitos do ambiente e do restante do genoma na expressão da doença em ratos engenheirados, conforme observações realizadas em ratos transgênicos para doença fibrocística. Ainda que de forma sumária, esses fatos traduzem, do ponto de vista eminentemente técnico, que a terapia gênica de células germinativas ainda está engatinhando, mesmo em modelos de animais experimentais (24).

Aspectos bioéticos da terapia gênica de células germinativas

Do ponto de vista ético, não existem diferenças entre a terapia gênica de células germinativas (TGCG) realizada na fase de pré-implantação, quando o zigoto apresenta apenas algumas células, ou antes da fertilização, isto é, nos próprios gametas ou nas células que lhes dão origem (20). Qualquer dessas técnicas tem o objetivo de mudar, em definitivo, o genoma da pessoa e descendentes, antes do nascimento. Esta mudança definitiva do genoma não é

apenas um ato de experimentação científica para avanço do conhecimento da biologia humana, mas também um ato de manipulação da constituição biológica da humanidade. Para Reiter (1992), a intervenção técnico-genética sobre o óvulo fecundado, mesmo que realizada com propósitos médicos, não tem o significado de tratamento da pessoa mas de manipulação de sua identidade (25). É exatamente nessa diferença entre conhecimento/tratamento e manipulação que se centram as principais questões bioéticas da TGCG. Não é recente a discussão sobre aspectos éticos da manipulação do genoma humano. Muito antes da viabilidade técnica, o debate ético pertinente já ocupava espaço na literatura científica, inspirado, sobretudo, nas experiências genéticas (26). Em 1990, Fletcher estudou a própria evolução do debate ético em terapia gênica de células somáticas e identificou quatro estágios: primeiro, o estágio limiar a partir do apelo de Niremberg, em 1967; segundo, a abertura dos conflitos desencadeada por dois casos iniciais e controversos de terapia gênica de células somáticas, os quais ficaram conhecidos como caso Rogers e caso Cline; terceiro, a ampliação dos debates ocorrida a partir de 1980; e, finalmente, o quarto estágio, denominado, pelo autor, de adaptação, no qual começam a surgir as políticas públicas para aplicação da técnica (27). Ao longo da evolução do debate ético, principalmente na TGCG, fortes cargas emocionais, provenientes de ambos os lados, estão, muitas vezes, dificultando uma visão racional do problema (28). Assim, sem a pretensão de exaurir a literatura sobre o tema, argumentos favoráveis e contrários à TGCG serão aqui relatados, preservando a imparcialidade nos relatos, bem como o direito à opinião pessoal.

Argumentos a favor da terapia gênica de células germinativas

Mesmo entre os autores que se manifestam favoráveis à TGCG, ao lado da argumentação sobre vantagens identificadas existem sempre palavras de cautela, derivadas das limitações técnicas e do não-conhecimento sobre complicações indesejadas (29,30,31,32,33).

Os argumentos favoráveis convergem para as seguintes questões: a) existe, entre os profissionais da área da saúde, a obrigação moral de por em prática os melhores métodos disponíveis para tratamento de doenças; b) os pais devem ter plena autonomia e direito de acesso à tecnologia disponível visando a obtenção de gerar filhos sadios; c) a TGCG é mais eficiente e tem menor custo efetivo que a TGCS (terapia gênica de células somáticas); d) deve-se preservar a liberdade de pesquisa e o valor intrínseco do conhecimento (20). Outros autores, ainda que sem apresentar uma sistematização de argumentos a favor, defendem a TGCG não apenas para tratamento de doenças mas também para melhoramento genético da espécie humana. Resnik sugere que esse melhoramento genético seja governado por regulamentação própria e acompanhado de educação adequada, não necessitando violentar reconhecidos princípios de moralidade e justiça social (34). Frota-Pessoa, por sua vez, questiona àqueles que, em sua avaliação, têm medo da eugenia, e afirma que "adotar medidas que tendem a melhorar o patrimônio genético da humanidade é tarefa benéfica e admirável quando feita com total respeito aos direitos humanos e com base em conhecimentos científicos seguros" (35). Gardner (36) avança muito além, prevendo que o melhoramento genético das pessoas terá forte apelo para os pais que competem por filhos mais capazes e por nações que competem pelo acúmulo de capital humano de melhor qualidade (36). Gerar filhos competentes é desejo de todos os pais, do mesmo modo que possuir cidadãos competentes é desejo de todas as nações. Assim, havendo tecnologia disponível, é bem possível que sua aplicação comece de forma clandestina em serviços médicos. Finalmente, citando Harris (1992), Gardner afirma que se a melhoria das pessoas pudesse ser alcançada por uma inovadora técnica educacional poucas questões éticas seriam levantadas (36,37).

Argumentos contra a terapia gênica de células germinativas

No contexto da revolução biológica, a TGCG traduz com propriedade as reflexões de Jean Bernard, Presidente da Academia Francesa, de que não apenas o doente mas toda a sociedade humana são atingidos por graves problemas de ordem ética (38). Os principais conflitos éticos da TGCG resumem-se em duas perguntas fundamentais: quando começa a vida individual e a quem pertence o patrimônio genético de cada pessoa?

Para nenhuma dessas perguntas existem respostas científicas que subsidiem as pertinentes decisões legais e éticas. Ao contrário do fim da vida individual, que, neste século, a ciência decretou ser a morte encefálica, o início da vida contínua provocando discordâncias (39). Para alguns, a pessoa está presente a partir do momento da concepção; para outros, é necessário o cumprimento de etapas mais tardias para reconhecimento dessa presença. Todavia, as discordâncias no estabelecimento dessa etapa: alguns preferem o sexto dia, privilegiando a implantação a partir desta data; outros, destacam o aparecimento do sulco neural e decidem-se pelo 11º dia; outros, relacionam a presença da pessoa à fase de viabilidade e optam pela 24ª semana e outros, ainda, radicalizam no nascimento a presença da nova pessoa (38).

Em minha avaliação pessoal, ainda que estes diversos pontos de vista ganhem maior ênfase quando o tema em debate é o aborto, na TGCG a finalidade do ato implica no reconhecimento de uma vida em curso, a qual se oferta um tratamento. A oferta terapêutica seria sem sentido caso não existisse uma pessoa em potencial; a alteração genética praticada no conjunto de células denominado embrião tem a finalidade de alterar a pessoa nele existente, e não as células embrionárias em si. A intervenção terapêutica sobre um embrião, independentemente do número de células existentes, quatro, oito ou mais, é reconhecidamente uma intervenção sobre uma pessoa por vir a ser e

seus descendentes. Assim, para os favoráveis à TGCG, a presença potencial da pessoa é o fundamento da prática. Por outro lado, para os defensores do aborto é exatamente a negação desta presença que respalda a prática. Retira-se o caráter delituoso do aborto admitindo-se que o embrião não contém, ou mesmo o feto, o potencial de pessoa com direito à vida, mas pretende-se ministrar esse tratamento ao embrião por reconhecer-se, nele, o direito à saúde física e mental da pessoa que potencialmente já existe. A lição que esta contradição ensina tem duas leituras: a primeira é que na ausência de firmes convicções morais e éticas o poder técnico converte-se em poder moral e fomenta decisões éticas variadas e até conflitantes. A segunda é que, invadindo o complicado cenário da reprodução e da genética, o avanço da ciência moderna conseguiu evidenciar ser possível manipular a hereditariedade de certa pessoa, e que essa possibilidade começa onde começa a vida pessoal de cada um, ou seja, no embrião. Assim, riscos e benefícios da TGCG ministrada às células do embrião são riscos e benefícios à pessoa potencial nele existente, do mesmo modo que a eliminação completa do embrião é considerada como uma eliminação radical desta mesma pessoa potencial.

A propriedade do genoma também é assunto com opiniões divergentes. O conjunto dos genes humanos é uma propriedade privada ou uma propriedade coletiva de todos os membros da espécie, ou, ainda, uma propriedade de Estado e governantes? (20) O direito sobre o corpo, que é mortal e temporal, também inclui o direito sobre os genes que se perpetuam nas gerações futuras e transcendem à temporalidade do corpo? O fato de admitir-se morte genética apenas para aquelas pessoas que nunca tiveram filhos não implicaria que os genes dos reprodutivamente competentes transcendem a propriedade corpórea e faz-se prevalecer nos descendentes?

Se, por um lado, alterações genéticas promovidas por terapia de células somáticas têm efeitos limitados ao corpo do paciente tratado, não se discute aí a propriedade sobre genes e corpo. Na TGCG os efeitos do tratamento são restritos ao corpo da pessoa por nascer, e estarão absolutamente ausentes do corpo dos genitores. Os genes presentes no zigoto e que originam o embrião já deixaram de pertencer aos genitores dos quais provieram. Óvulo e espermatozóide, que transportaram esses genes, deixam de existir no momento da fertilização. O conjunto gênico que surge no embrião é único no mundo e dessa unicidade será formada uma pessoa também única. A quem compete a decisão de alterar essa unicidade genética? Quem responderá pelo insucesso de uma alteração irreversível e transmissível? Para Clotet, "cabe aos cientistas informar e promover a reflexão ética e social sobre as vantagens e desvantagens da manipulação genética e da terapia gênica" (40). Ainda que pesquisas de opinião nos Estados Unidos, Japão e Nova Zelândia indiquem que as pessoas percebem tanto os riscos como os benefícios da manipulação genética, a conclusão é no sentido da necessidade de estudos internacionais sobre a percepção que as pessoas têm da terapia gênica, assim como propiciar a melhoria do nível educacional das mesmas, a fim de que melhor possam discutir e decidir sobre o assunto (41).

Terapia Gênica

Eliane S. Azevêdo

Médica, Ph.D. em Genética, Pesquisadora do CNPq

Métodos e técnicas empregados em terapia gênica são registros em paralelo a conflitos éticos pertinentes. Técnicas de terapia gênica de células somáticas ex vivo e in vivo, e os tipos de vetores preferencialmente usados para transporte de DNA, são apresentadas de forma resumida, objetivando melhor compreensão de potenciais riscos e malefícios para o paciente. Do ponto de vista bioético, a terapia gênica de células somáticas é considerada comparável ao transplante de órgãos entre humanos. A terapia gênica de células germinativas, todavia, implica em mudança definitiva do genoma do paciente e seus descendentes; conseqüentemente, é apresentada com argumentos contrários favoráveis, conforme a literatura, acrescidos de comentários da autora.

UNITERMOS - Geneterapia, bioética, células germinativas, alterações do genoma

As questões bioéticas pertinentes à terapia gênica apresentam-se sob dois aspectos distintos em objetivos e conseqüências. O primeiro diz respeito à ação de modificar definitivamente o patrimônio genético, e essa mudança gera o conflito fundamental da terapia gênica de células germinativas. O segundo, decorre da possibilidade de danos à saúde advindos de procedimentos técnicos inerentes à própria transferência do DNA. Os riscos previstos dizem respeito tanto à terapia gênica de células Terminativas quanto à de células somáticas. Conseqüentemente, a discussão bioética em terapia gênica estende-se do respeito ao princípio da autonomia sobre o genoma individual aos prováveis malefícios advindos das técnicas empregadas (1). Como os riscos das conseqüências diretas dos procedimentos técnicos, os aspectos bioéticos do binômio risco-benefício somente podem ser avaliados em paralelo ao conhecimento das técnicas em uso.

Métodos e técnicas em terapia gênica

A seguir, conceitos e procedimentos em terapia gênica serão aqui revistos de forma geral e sumária.

Terapia gênica ou geneterapia é o tratamento, ou a sua tentativa, de doenças genéticas ou não-genéticas por meio da introdução, em células específicas do paciente, de cópias de genes com objetivos terapêuticos. Assim, terapia gênica é o uso de genes ao invés de drogas para tratamento de doenças.

A possibilidade de transferir informação genética de um organismo para outro, que constitui o fundamento da terapia gênica, é conhecida, em bactérias, desde 1944, a partir da clássica experiência de Avery, McLeod e McCarty (2). Nas décadas de 60 e 70, a idéia de transferir genes para curar doenças em humanos tornou-se mais próxima da realidade: desenvolveram-se linhas de células geneticamente marcadas; compreendeu-se o mecanismo de transformação celular em mamíferos pelos vírus polioma e SV40 e, posteriormente, criaram-se as técnicas de DNA recombinante permitindo, assim, a primeira tentativa de transferência gênica em organismos complexos (3,4,5).

No final da década de 80, o National Institutes of Health (NIH) aprovou o primeiro protocolo para teste de terapia gênica em humano, o qual consistia na transferência de genes do sistema imune para um paciente em estado avançado de neoplasia maligna. O objetivo, à época, não era avaliar eficácia terapêutica, mas sim demonstrar que um gene pode ser transferido, com segurança, para dentro do paciente e em seguida identificado em células retiradas do mesmo (5,6,7,8). Em 1990, foram realizados nos Estados Unidos, com objetivos clínicos científicos, os primeiros casos de terapia gênica em humanos: duas crianças com deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA) foram tratadas por terapia gênica somática, visando avaliar a eficácia terapêutica de linfócitos autólogos nos quais se inseriu o gene normal da ADA, e determinar a sobrevida desses linfócitos in vivo e o tempo de expressão do gene nele inserido (7). Para Weatherall, os procedimentos técnicos necessários à terapia gênica em humanos são fáceis de enumerar (cinco passos), porém difíceis de alcançar (8): o primeiro passo consiste em isolar o gene e suas seqüências reguladoras; o segundo - visando a obtenção de um número necessário de células para reintrodução no paciente -, na necessidade de se obter em cultura uma quantidade suficiente de células retiradas do paciente, nas quais será inserido o gene terapêutico. O terceiro passo é dispor de um mecanismo eficiente (vetores) para inserir o gene nas células; o quarto, que o gene inserido incorpore-se ao genoma celular e funcione, isto é, que haja produto gênico em quantidade suficiente e por longo tempo; e o quinto, que todos estes procedimentos não apresentem efeitos colaterais indesejáveis (9,10).

Dois tipos de técnicas, denominadas de ex vivo e in vivo, são utilizadas para levar genes para o interior das células somáticas do corpo humano. Na técnica ex vivo, retiram-se células do paciente, faz-se cultura das mesmas, usam-se vetores para nelas inserir o gene previamente isolado e engenheirado, e, por infusão, essas células tratadas são levadas de volta ao paciente. As células da medula são as mais usadas em terapia ex vivo, embora existam testes em outros tipos de células. Na técnica in vivo, o gene engenheirado é levado diretamente ao organismo do paciente, também usando vetores, porém dispensando a retirada de células e sua subsequente reintrodução no paciente (5).

O isolamento do gene e o seu teste em culturas de células não constituem grandes problemas de ordem técnica e/ou bioética para fins de tratamento de doenças. A tecnologia de DNA recombinante, desenvolvida em organismos simples, vem sendo, com sucesso, transposta para organismos complexos, inclusive o humano. O desenvolvimento de vetores, todavia, continua sendo um dos grandes problemas em terapia gênica, tanto do ponto de vista técnico como ético. O gene isolado e replicado precisa de um vetor que o transporte para dentro de células específicas do paciente, que o incorpore ao DNA destas células e o ative para desempenho exclusivo e adequado da função corretiva desejada (11).

Vetores mais usados em terapia gênica

Ainda que haja maior ênfase nas pesquisas para construção de vetores vireis, existe também busca por vetores físicos e químicos. Um segmento de DNA pode ser posto dentro de uma célula por métodos relativamente simples como coprecipitação em fosfato de cálcio, inclusão em vesículas de lipídios, bombardeamento com partículas de ouro ou de tungstênio e até mesmo injeções diretas de DNA. Todavia, o uso de vetores não-virais, ainda que aparentemente mais seguros, tem demonstrado pouca eficácia devido à expressão temporária do DNA transportado (9,12).

Os primeiros testes com vetores virais ocorreram na década de 80, utilizando vírus do papiloma e adenovírus. Em 1989, os retrovírus tornaram-se o mais eficaz e popular modelo de vetores. Os últimos cinco anos foram marcados por entusiasmos e frustrações nas pesquisas com vetores, creditando-se a esses a responsabilidade pelo não-avanço em terapia gênica (10). Em 1994, o NIH reconheceu a importância de se resolver o problema dos vetores em terapia gênica e anunciou um investimento da ordem de 3,5 milhões de dólares para o estabelecimento de alguns laboratórios nacionais de vetores (13). Em 1996, já existiam três desses laboratórios concentrando

equipes multidisciplinares de cientistas trabalhando no conhecimento e produção de vetores. Três vetores virais e um não-viral ocupam posição de destaque nas pesquisas: retrovírus; adenovírus e adenovírus associado; e complexos lipídios-DNA. Do balanço entre riscos e vantagens de cada tipo de vetor, a seguir discriminados, fundamentam-se as questões bioéticas:

Retrovírus - são os vetores preferidos em 80% das experiências clínicas em terapia gênica, pelo fato de apresentarem algumas vantagens tais como eficiente integração ao genoma da célula, e expressão gênica por longo tempo (14,15). Todavia, seu uso é restrito à terapia *ex vivo* devido às dificuldades para purificação e concentração vital, além do fato de que os retrovírus infectam exclusivamente as células que se dividem. Por serem vírus patogênicos, na construção de vetores retrovirais a parte viral patogênica é removida, por medida de segurança. Todavia, essa medida não exclui o perigo de reversão ao estado selvagem patogênico seguido de multiplicação viral e suas conseqüências, conforme relato em macacos (14). Esta possibilidade é uma das principais preocupações dos pesquisadores e instituições de vigilância em saúde pública, como a Food and Drug Administration (FDA) (15). Além disso, a integração dos retrovírus ao genoma humano ocorre ao acaso. Esse fato é também preocupante, pois existe, entre outras, a possibilidade de transformação neoplásica de células do paciente por mutagênese insercional (16). Ainda que as experiências em animais e humanos demonstrem que esse risco é baixo, existe risco adicional de transformação celular em decorrência de alta taxa de erros da transcriptase reversa do retrovírus (14,17);

Adenovírus e adenovírus associado - ao contrário dos retrovírus, os adenovírus representam preocupações bioéticas em menor escala mas também apresentam menor eficácia como vetores. As propriedades de poderem ser purificados em grandes quantidades e de infectarem qualquer tipo de célula, diferenciadas ou não, que se dividem ou não, constituem as vantagens dos adenovírus (18). Por outro lado, os adenovírus apresentam a grande desvantagem de conterem genes com potencial de estimular resposta imune no paciente e, conseqüentemente, efeitos adversos. Adenovírus e adenovírus associado estão sendo usados, de preferência, para o tratamento da doença fibrocística em animais experimentais e em humanos, por meio da instilação nas vias respiratórias. Vetores contendo o gene normal (alelo) da doença fibrocística penetram as células epiteliais e nelas se expressam os genes transportados. Todavia, a expressão gênica é transitória (duas a três semanas) e uma repetição terapêutica é caracterizada por expressão quase indetectável (16,18,19). Finalmente, os vetores adenovírus associados quando do tipo repetem a vantagem de serem sem fio específicos quanto à sua inserção no DNA, isso é, inserem-se no cromossomo 19, na região 13.4 do braço longo (18);

Complexos lipídios - DNA - os lipossomos catiônicos, por terem carga elétrica positiva, ligam-se espontaneamente à superfície celular e diretamente ao DNA ou RNA, sem serem degradados pelos lisossomos. Estas propriedades fizeram com que os lipossomos tornassem-se um eficiente meio para transportar DNA para dentro de uma variedade de células em cultura. Todavia, a proporção entre os lipídios e a quantidade de DNA ou RNA deve ser cuidadosamente calculada para evitar intoxicação lipídica da célula a ser tratada (12).

Terapia gênica de células germinativas

Datam do início da década de 80 os primeiros trabalhos demonstrando ser possível introduzir segmentos de DNA (genes) no pronúcleo fertilizado de ratos, implantar os zigotos no oviduto e identificar os genes introduzidos em todas as células do animal recém-nascido. Os ratos nascidos dessa manipulação são chamados de transgênicos e já se tornaram ferramenta de amplo uso para o estudo de doenças genéticas, alterações do desenvolvimento, imunologia, oncologia e neurobiologia (20).

Nos últimos dez anos, os avanços obtidos com a produção de ratos transgênicos criaram uma nova área de conhecimento denominada, de forma ampla, de tecnologias de células embrionárias (21). Ainda que em ratos já seja possível promover alterações de células embrionárias usando vetores retrovirais, recombinação homóloga e inativação específica de gene gene knockout, em outros animais, devido a grande número de limitações, apenas a técnica da microinjeção vem sendo empregada (20,21). Mesmo em ratos, cujo genoma amplamente conhecido é fator favorável ao sucesso dessas técnicas, sérios problemas persistem, traduzindo a complexidade da manipulação do genoma embrionário. Baixa freqüência de integração do gene introduzido; integração, produzindo deleção, duplicação e translocação; integração ocorrendo ao acaso dentro do genoma; risco potencial de mutagênese insercional devido à falta de controle do sítio de integração tendo como conseqüências o impedimento da função de um gene normal; a conversão de um protooncogene em oncogene e/ou a inativação de um gene supressor tumoral, são os problemas mais comumente citados (20).

Paralelamente ao desenvolvimento das técnicas de manipulação genética de embriões, está surgindo uma nova fronteira dentro da genética médica denominada genética da pré-implantação. Para Pergament e Bonnicksen, a genética da pré-implantação surge como uma conseqüência da possibilidade atual de fazer-se diagnóstico de doença genética em células embrionárias, antes da implantação (*preimplantation diagnosis*), e da possibilidade futura da instituição de alterações terapêuticas na pré-implantação (*preimplantation therapy*) ou seja, da terapia de células germinativas. Considerando as dificuldades de ordem clínica e laboratorial encontradas no diagnóstico da

pré-implantação e o problema ético da manipulação de embriões, esses autores advertem ser absolutamente necessário e urgente que o American College of Medical Genetics, nos Estados Unidos, se posicione sobre questões de ética, segurança, precisão, custos e mérito em geral da genética da pré-implantação (22).

Dessa forma, a manipulação genética de embriões humanos e a terapia gênica de células germinativas, mesmo antes de terem sua viabilidade técnica comprovada, estão provocando forte impacto no cenário das discussões científicas devido aos problemas éticos pertinentes. Pela primeira vez em medicina, existem em alguns países legislação e/ou recomendação contra a manipulação de embriões e a terapia de células germinativas, mesmo antes de existirem as possibilidades técnicas para humanos (22,23).

A proposta fundamental da terapia gênica de células germinativas consiste na mudança definitiva da expressão gênica para fins terapêuticas e requer conhecimentos de princípios básicos de biologia, os quais estão sendo adquiridos com o próprio progresso das pesquisas. Modelos animais de doença humana vêm sendo usados da seguinte forma: ratos transgênicos, nos quais se insere o gene de certa doença genética humana, são produzidos e tenta-se por terapia gênica germinativa avaliar a eficácia do tratamento e compreender os princípios básicos de biologia envolvidos no mesmo. A experiência vem trazendo grandes lições: ratos engenheirados com o gene responsável pela síndrome de Lesch-Nyhan em humanos não apresentaram nenhuma característica da síndrome; a manifestação clínica da deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA) em ratos transgênicos difere fundamentalmente da verificada em humanos, isso é, os ratos morrem no período pré-natal devido à falência de múltiplos órgãos, à exceção da linfopoiese que, curiosamente, apresenta-se normal. Por outro lado, nos ratos transgênicos outras doenças genéticas apresentam-se de forma semelhante à observada em humanos, a exemplo da hipercolesterolemia familiar e da doença de Gaucher. Todavia, no dizer de Wilson, a lição mais importante consiste na identificação de efeitos do ambiente e do restante do genoma na expressão da doença em ratos engenheirados, conforme observações realizadas em ratos transgênicos para doença fibrocística. Ainda que de forma sumária, esses fatos traduzem, do ponto de vista eminentemente técnico, que a terapia gênica de células germinativas ainda está engatinhando, mesmo em modelos de animais experimentais (24).

Aspectos bioéticos da terapia gênica de células germinativas

Do ponto de vista ético, não existem diferenças entre a terapia gênica de células germinativas (TGCG) realizada na fase de pré-implantação, quando o zigoto apresenta apenas algumas células, ou antes da fertilização, isto é, nos próprios gametas ou nas células que lhes dão origem (20). Qualquer dessas técnicas tem o objetivo de mudar, em definitivo, o genoma da pessoa e descendentes, antes do nascimento. Esta mudança definitiva do genoma não é apenas um ato de experimentação científica para avanço do conhecimento da biologia humana, mas também um ato de manipulação da constituição biológica da humanidade. Para Reiter (1992), a intervenção técnico-genética sobre o óvulo fecundado, mesmo que realizada com propósitos médicos, não tem o significado de tratamento da pessoa mas de manipulação de sua identidade (25). É exatamente nessa diferença entre conhecimento/tratamento e manipulação que se centram as principais questões bioéticas da TGCG. Não é recente a discussão sobre aspectos éticos da manipulação do genoma humano. Muito antes da viabilidade técnica, o debate ético pertinente já ocupava espaço na literatura científica, inspirado, sobretudo, nas experiências genéticas (26). Em 1990, Fletcher estudou a própria evolução do debate ético em terapia gênica de células somáticas e identificou quatro estágios: primeiro, o estágio limiar a partir do apelo de Nuremberg, em 1967; segundo, a abertura dos conflitos desencadeada por dois casos iniciais e controversos de terapia gênica de células somáticas, os quais ficaram conhecidos como caso Rogers e caso Cline; terceiro, a ampliação dos debates ocorrida a partir de 1980; e, finalmente, o quarto estágio, denominado, pelo autor, de adaptação, no qual começam a surgir as políticas públicas para aplicação da técnica (27). Ao longo da evolução do debate ético, principalmente na TGCG, fortes cargas emocionais, provenientes de ambos os lados, estão, muitas vezes, dificultando uma visão racional do problema (28). Assim, sem a pretensão de exaurir a literatura sobre o tema, argumentos favoráveis e contrários à TGCG serão aqui relatados, preservando a imparcialidade nos relatos, bem como o direito à opinião pessoal.

Argumentos a favor da terapia gênica de células germinativas

Mesmo entre os autores que se manifestam favoráveis à TGCG, ao lado da argumentação sobre vantagens identificadas existem sempre palavras de cautela, derivadas das limitações técnicas e do não-conhecimento sobre complicações indesejadas (29,30,31,32,33).

Os argumentos favoráveis convergem para as seguintes questões: a) existe, entre os profissionais da área da saúde, a obrigação moral de por em prática os melhores métodos disponíveis para tratamento de doenças; b) os pais devem ter plena autonomia e direito de acesso à tecnologia disponível visando a obtenção de gerar filhos sadios; c) a TGCG é mais eficiente e tem menor custo efetivo que a TGCS (terapia gênica de células somáticas); d) deve-se preservar a liberdade de pesquisa e o valor intrínseco do conhecimento (20). Outros autores, ainda que sem apresentar uma sistematização de argumentos a favor, defendem a TGCG não apenas para tratamento de doenças mas também para melhoramento genético da espécie humana. Resnik sugere que esse melhoramento genético seja governado por regulamentação própria e acompanhado de educação adequada, não necessitando

violentar reconhecidos princípios de moralidade e justiça social (34). Frota-Pessoa, por sua vez, questiona àqueles que, em sua avaliação, têm medo da eugenia, e afirma que "adotar medidas que tendem a melhorar o patrimônio genético da humanidade é tarefa benéfica e admirável quando feita com total respeito aos direitos humanos e com base em conhecimentos científicos seguros" (35). Gardner (36) avança muito além, prevendo que o melhoramento genético das pessoas terá forte apelo para os pais que competem por filhos mais capazes e por nações que competem pelo acúmulo de capital humano de melhor qualidade (36). Gerar filhos competentes é desejo de todos os pais, do mesmo modo que possuir cidadãos competentes é desejo de todas as nações. Assim, havendo tecnologia disponível, é bem possível que sua aplicação comece de forma clandestina em serviços médicos. Finalmente, citando Harris (1992), Gardner afirma que se a melhoria das pessoas pudesse ser alcançada por uma inovadora técnica educacional poucas questões éticas seriam levantadas (36,37).

Argumentos contra a terapia gênica de células germinativas

No contexto da revolução biológica, a TGCG traduz com propriedade as reflexões de Jean Bernard, Presidente da Academia Francesa, de que não apenas o doente mas toda a sociedade humana são atingidos por graves problemas de ordem ética (38). Os principais conflitos éticos da TGCG resumem-se em duas perguntas fundamentais: quando começa a vida individual e a quem pertence o patrimônio genético de cada pessoa?

Para nenhuma dessas perguntas existem respostas científicas que subsidiem as pertinentes decisões legais e éticas. Ao contrário do fim da vida individual, que, neste século, a ciência decretou ser a morte encefálica, o início da vida contínua provocando discordâncias (39). Para alguns, a pessoa está presente a partir do momento da concepção; para outros, é necessário o cumprimento de etapas mais tardias para reconhecimento dessa presença. Todavia, as discordâncias no estabelecimento dessa etapa: alguns preferem o sexto dia, privilegiando a implantação a partir desta data; outros, destacam o aparecimento do sulco neural e decidem-se pelo 11º dia; outros, relacionam a presença da pessoa à fase de viabilidade e optam pela 24ª semana e outros, ainda, radicalizam no nascimento a presença da nova pessoa (38).

Em minha avaliação pessoal, ainda que estes diversos pontos de vista ganhem maior ênfase quando o tema em debate é o aborto, na TGCG a finalidade do ato implica no reconhecimento de uma vida em curso, a qual se oferta um tratamento. A oferta terapêutica seria sem sentido caso não existisse uma pessoa em potencial; a alteração genética praticada no conjunto de células denominado embrião tem a finalidade de alterar a pessoa nele existente, e não as células embrionárias em si. A intervenção terapêutica sobre um embrião, independentemente do número de células existentes, quatro, oito ou mais, é reconhecidamente uma intervenção sobre uma pessoa por vir a ser e seus descendentes. Assim, para os favoráveis à TGCG, a presença potencial da pessoa é o fundamento da prática. Por outro lado, para os defensores do aborto é exatamente a negação desta presença que respalda a prática. Retira-se o caráter delituoso do aborto admitindo-se que o embrião não contém, ou mesmo o feto, o potencial de pessoa com direito à vida, mas pretende-se ministrar esse tratamento ao embrião por reconhecer-se, nele, o direito à saúde física e mental da pessoa que potencialmente já existe. A lição que esta contradição ensina tem duas leituras: a primeira é que na ausência de firmes convicções morais e éticas o poder técnico converte-se em poder moral e fomenta decisões éticas variadas e até conflitantes. A segunda é que, invadindo o complicado cenário da reprodução e da genética, o avanço da ciência moderna conseguiu evidenciar ser possível manipular a hereditariedade de certa pessoa, e que essa possibilidade começa onde começa a vida pessoal de cada um, ou seja, no embrião. Assim, riscos e benefícios da TGCG ministrada às células do embrião são riscos e benefícios à pessoa potencial nele existente, do mesmo modo que a eliminação completa do embrião é considerada como uma eliminação radical desta mesma pessoa potencial.

A propriedade do genoma também é assunto com opiniões divergentes. O conjunto dos genes humanos é uma propriedade privada ou uma propriedade coletiva de todos os membros da espécie, ou, ainda, uma propriedade de Estado e governantes? (20) O direito sobre o corpo, que é mortal e temporal, também induz o direito sobre os genes que se perpetuam nas gerações futuras e transcendem à temporalidade do corpo? O fato de admitir-se morte genética apenas para aquelas pessoas que nunca tiveram filhos não implicaria que os genes dos reprodutivamente competentes transcendem a propriedade corpórea e faz-se prevalecer nos descendentes?

Se, por um lado, alterações genéticas promovidas por terapia de células somáticas têm efeitos limitados ao corpo do paciente tratado, não se discute aí a propriedade sobre genes e corpo. Na TGCG os efeitos do tratamento são restritos ao corpo da pessoa por nascer, e estarão absolutamente ausentes do corpo dos genitores. Os genes presentes no zigoto e que originam o embrião já deixaram de pertencer aos genitores dos quais provieram. Óvulo e espermatozóide, que transportaram esses genes, deixam de existir no momento da fertilização. O conjunto gênico que surge no embrião é único no mundo e dessa unicidade será formada uma pessoa também única. A quem compete a decisão de alterar essa unicidade genética? Quem responderá pelo insucesso de uma alteração irreversível e transmissível? Para Clotet, "cabe aos cientistas informar e promover a reflexão ética e social sobre as vantagens e desvantagens da manipulação genética e da terapia gênica" (40). Ainda que pesquisas de opinião nos Estados Unidos, Japão e Nova Zelândia indiquem que as pessoas percebem tanto os riscos como os benefícios da manipulação genética, a conclusão é no sentido da necessidade de estudos internacionais sobre a percepção que

as pessoas têm da terapia gênica, assim como propiciar a melhoria do nível educacional das mesmas, a fim de que melhor possam discutir e decidir sobre o assunto (41).

Abstract- Genic Therapy

Methods and techniques employed in genic therapy are reviewed in parallel to pertinent ethical conflicts. Genic therapy techniques of *ex vivo* and *in vivo* somatic cells, and the types of vectors preferentially used for the transportation of DNA are presented in a summarized manner, aimed at the better comprehension of the potential risks and damages to the patient. From a biological point of view, the genic therapy of somatic cells is considered comparable to the transplant of organs between humans. The genic therapy of germinal cells, nevertheless, implies in the definitive alteration of the patient's genome and that of his or her descendants. Arguments both in favor and against are then submitted, according to available literature, supplemented with comments from the author.

Referências Bibliográficas

1. Pellegrino ED. La relación entre la autonomía y la integridad en la ética médica. *Bol Of Sanit Panam* 1990;108:379-90.
2. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J Exptl Med* 1944;79:137-58.
3. Friedman T. A brief history of gene therapy. *Nat Genet* 1992;2: 93-8.
4. Friedman T. The evolving concept of gene therapy. *Hum Gene Ther* 1990;2:175-81.
5. Morsy MA, Mitani K, Clemens P, Caskey T. Progress toward human gene therapy. *JAMA* 1993;270:2338-45.
6. Weatherall DJ. Gene therapy in perspective. *Nature* 1991;349:275-6.
7. Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992;256:808-13.
8. Weatherall DJ. Scope and limitations of gene therapy. *Brit Med Bull* 1995;51:1-11.
9. Muller DWM. Gene therapy for cardiovascular disease. *Br Heart J* 1994;72:309-12.
10. Friedman T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989;244:1275-81.
11. Blau HM, Springer ML. Gene therapy: a novel form of drug delivery. *NEJM* 1995;333:1204-7.
12. Schofield JP, Caskey CT. Non-viral approaches to gene therapy. *Brit Med J* 1995;51:56-71.
13. Gavaghan H. NIH seek bids for vector centers for gene therapy. *Nature* 1994;372:306.
14. Vile RG, Russel SJ. Retrovirus as vector. *Brit Med Bull* 1995;51:12-30.
15. Brown KS. Hunt for viable vectors leads to jobs for gene therapy researchers. *Scientist* 1996; 10: 1-7.
16. Cornetta K. National gene vector laboratories. *NIH Guide* 1996;25(4).
17. Butler D. Call for risk/benefit study of gene therapy. *Nature* 1994;372:716.
18. Kremer EJ, Perricaudet M. Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *Brit Med J* 1995;51:31-44.
19. Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *NEJM* 1996;334: 1185-7.
20. Wivel NA, Walters LR. Germ-line gene modification and disease prevention: some medical and ethical perspectives. *Science* 1993;262:533-8.
21. Mullins LJ, Mullins JJ. Molecular medicine in genetically engineered animals. *J Clin Invest* 1996;97: 1557-60.
22. Pergament E, Bonnicksen A. Preimplantation genetics: a case for prospective action. *Am J Med Genet* 1994;52:151-7.
23. National Reference Center for Bioethics Literature. Human gene therapy: organizational statements and policies. Washington: National Reference Center for Bioethics Literature, 1994. Scope note, 24.
24. Wilson JM. Molecular medicine in genetically engineered animals. *J Clin Invest* 1996;97:1138-41.
25. Reiter J. Medicina predictiva: análisis del genoma, terapia genética. In: *Bioética: consideraciones filosófico-teológicas sobre un tema actual*. Madrid: Ed. Rialp, 1992:77-98.
26. Müller-Hill B. *Ciência assassina*. Rio de Janeiro: Xenon, 1993.
27. Fletcher JC. Evolution of ethical debate about human gene therapy. *Hum Gene Therap* 1990;1:55-68.
28. Hoose B. Gene therapy: where to draw the line. *Hum Gene Therap* 1990;1:299-309.
29. Warnock M. Ethical challenges in embryo manipulation. *Brit Med J* 1992;304: 1045-9.
30. Annas GJ, Elias S. Legal and ethical implications of fetal diagram and gene therapy. *Am J Hum Genet* 1990;35:215-8.
31. Botkin JR. Ethical issues in human genetic technology. *Pediatrician* 1990;17:100-7.
32. Porter J. What is morally distinctive about genetic engineering? *Hum Gene Therap* 1990;1:419-24.
33. Krinsky S. Human gene therapy: must we know when to stop before we start? *Hum Gene Therap*

- 1990;1:171-3.
34. Resnik D. Debunking the slippery slope argument against human germ line therapy. *J Med Philos* 1994;19:23-40.
 35. Frota-Pessoa O. Quem tem medo de eugenia? *Rev USP* 1994/95;24:38-45.
 36. Gardner W. Can human genetic enhancement be prohibited? *J Med Philos* 1995;20:65-84.
 37. Harris J. *Wonderwoman and superman: the ethics of human biotechnology*. New York: Oxford University Press, 1992.
 38. Bernord J. *Da biologia à ética bioética*. Campinas: Editorial Psy II, 1994.
 39. Gogliano D. Pacientes terminais: morte encefálica. *Bioética* 1993;1:145-56.
 40. Clotet J. Bioética como ética aplicada e genética. *Bioética* 1997;5:178.
 41. Macer DRJ. Public acceptance of human gene therapy and perceptions of human genetic manipulation. *Hum Gene Therap* 1992;3:511-8.

Endereço para correspondência:

Av. Euclides da Cunha, 16
Ed. Serra da Graça, ap.102
40150-121 Salvador - BA
E-mail: eliane@sunrnp.ufba.br