

MARTA BELLODI PRIVATO

**MECANISMOS PARA INDUÇÃO DA TOLERÂNCIA
IMUNOLÓGICA APÓS TRANSFERÊNCIA GÊNICA NO
FÍGADO DO RATO GUNN**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, área de concentração: Saúde Humana, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Dr. José Luiz de Godoy
Co-orientador: Dr. Nicolas Ferry

CURITIBA

2005

.....» *Le lecteur aurait d'ailleurs tort de croire que les recherches d'un laboratoire aboutissent toujours à des publications, plus ou moins importantes, plus ou moins fameuses. En fait, 90% des expériences n'aboutissent pas, un imprévu technique se produit ou bien l'idée de départ se révèle mauvaise.*

La vie quotidienne du chercher est ainsi faite de déceptions, avec de temps en temps des réussites qui lui permettent de conserver son enthousiasme. Il faut aussi avoir la mentalité du joueur ou du pêcheur. En ce qui me concerne, seuls les gros poissons m'intéressent.....mais ils sont plutôt rares. Mes armoires sont ainsi pleines de cahiers d'expériences, de débuts de manuscrits qui ne seront jamais publiés, à moins que je ne les envoie au « Journal des résultats irreproductibles » créé par un collègue israélien facétieux «.....

Luc Montagnier

« Des virus et des hommes »

Dedico,

À minha mãe, por saber sempre me ouvir nos momentos difíceis.

**À minha família,
Pelo incentivo, apesar da distância.**

À memória de meu pai, sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Dr. Júlio Cezar Uili Coelho, Dr. Paulo Roberto Reichert e Dr. Paulo Roberto Slud Brofman,
Pela disponibilidade e interesse em julgar este trabalho.

À Dra. Vanete Soccol e ao Dr. Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas,
Pela participação no exame de qualificação e na defesa de tese,
Pela contribuição valiosa na correção da tese.

Ao Dr. José Luiz de Godoy,
Por acreditar em mim e me proporcionar esta experiência enriquecedora, tanto profissional como pessoal.
Todo meu reconhecimento e gratidão.

Ao Dr. Nicolas Ferry,
Por sua disponibilidade e paciência inesgotáveis nas discussões científicas. Obrigada por tudo o que me ensinou.
Pelo seu apoio, bem como o de sua esposa Jocelyne durante toda minha permanência em Nantes.

Ao Dr. Carlos Ricardo Soccol,
Por permitir o meu ingresso no curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos e possibilitar o desenvolvimento dos experimentos em condições ideais.

Ao Dr. Philippe Moullier,
Por me aceitar em seu laboratório e permitir que a primeira etapa deste trabalho fosse realizada.

Ao Dominique Aubert,
Com quem tive o prazer de trabalhar lado a lado durante toda realização deste trabalho. Obrigada por seu dinamismo, criatividade e confiança, indispensáveis ao bom andamento dos experimentos. Pelo aprendizado de toda experimentação animal e laboratorial.

À Virginie Pichard,
Obrigada por toda disponibilidade e ajuda constante na padronização do transplante de medula óssea e das análises de citometria de fluxo. Pelo bom convívio de sempre.

À Audrey Avril,
Por sua simpatia e gentileza em me ajudar sempre que precisei.

Ao Laurent Tesson,
Obrigada pelo empenho em solucionar os nossos problemas de PCR Quantitativa.

À Veronique Blouin e Yann Tavel
Pela inestimável ajuda nos últimos três meses em Nantes. Muito obrigada pelo conforto que me proporcionaram, pela bela paisagem, pelos barcos no rio Erdre.

À Isabelle Raimbaud
Pela amizade sincera e ajuda constante que facilitaram muito minha vida em Nantes. Obrigada por contribuir para o enriquecimento de meu vocabulário francês.

À Sylvie Saleun,
Embora não fizesse parte do nosso grupo de pesquisa, sua presença constante entre nós foi sempre bem-vinda.

À Magalie e Yann,
Pelo interesse e disponibilidade em me ajudar no que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Terapia Gênica,
Nathalie Provost, Frédéric, Karine, Fatima, Eric, Mickael, Gilliane, Rafi, Knut, Achille, Marie-Claude, Johanne, Nathalie, Estelle, Pierre, Fabienne, Christophe, Françoise, Sandy, Nicole, Cecile, Delphine, Françoise, Katell e tantos outros.....Obrigada pelo acolhimento e amizade.

Aos colegas do Laboratório do Centro de Investigação Clínica (Nutrição Humana),
Julien, Emanuelle, Philippe, Tony, Carole e Michel.....Pela boa recepção e convivência.

Ao Dr. Tuan Nguyen,
Pelo trabalho em colaboração e discussão de resultados.

Aos amigos Edson e Cláudia,
Por tornar mais fácil minha adaptação em Nantes. Obrigada por toda ajuda dispensada na minha chegada e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

À minha prima Patrícia,
Pelo incentivo constante e por nossas conversas freqüentes que faziam com que a distância e a saudade se tornassem menores.

À Simone Wendt e Thalma Krieger,
Amigas de todas as horas.

Ao Dr. Paulo Homem,
Pelas palavras certas na hora certa.

À « *Association Française contre les Myopathies* »,
Pelo financiamento do projeto de tese.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos.

À CAPES,
Pela bolsa concedida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
GLOSSÁRIO.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUÇÃO.....	18
REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1. TERAPIA GÊNICA.....	20
1.1. GENE.....	22
1.2. CÉLULA ALVO.....	22
1.3. VETOR DE TRANSFERÊNCIA GÊNICA.....	22
1.3.1. Vetores não virais.....	23
1.3.2. Vetores virais.....	23
a) Os vetores adenovirais.....	23
b) Os vetores derivados dos vírus associado aos adenovírus.....	25
c) Os vetores retrovirais.....	26
c.1) Estrutura.....	26
c.2) Genoma do retrovírus.....	27
c.3) Ciclo replicativo dos retrovírus.....	29
c.4) Construção de vetores retrovirais.....	31
c.5) Produção de vetores retrovirais: linhagens transcomplementares.....	32
d) Os vetores lentivirais.....	36
d.1) Estrutura.....	36
d.2) Genoma do lentivírus.....	37
d.3) Ciclo replicativo do lentivírus.....	39
d.4) Construção de vetores lentivirais.....	39
d.5) Produção de vetores lentivirais.....	43
1.3.3. Regulação da expressão de vetores virais.....	46
a) Expressão induzida do vetor viral.....	46
b) Expressão tecido-específica.....	47
1.4. ESTRATÉGIAS DE TRANSFERÊNCIA GÊNICA.....	47
1.5. TRANSFERÊNCIA GÊNICA NO FÍGADO.....	48
1.5.1. Vetores adenovirais.....	48
1.5.2. Vetores AAV.....	49
1.5.3. Vetores retrovirais.....	49
1.5.4. Vetores lentivirais.....	52
2. DOENÇAS METABÓLICAS HEREDITÁRIAS DO FÍGADO.....	53
2.1. DOENÇAS METABÓLICAS LETAIS POR LESÃO DIRETA DO FÍGADO.....	54
2.2. DOENÇAS METABÓLICAS EXPONDO A COMPLICAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS.....	56

2.2.1. <i>Síndrome de Crigler-Najjar</i>	57
a) Descrição	57
b) Sinais clínicos e tratamento	58
2.2.2. <i>Síndrome de Gilbert</i>	60
2.3. METABOLISMO DA BILIRRUBINA	61
2.4. CAPTAÇÃO E CONJUGAÇÃO DA BILIRRUBINA	63
2.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA URIDINA-DIFOSFATO-GLUCURONIL TRANSFERASE (UDPGT)	64
2.6. RATO GUNN.....	65
2.7. TRANSFERÊNCIA GÊNICA NO RATO GUNN	68
3. REGENERAÇÃO HEPÁTICA	71
4. IMUNOLOGIA.....	75
4.1. MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE	76
4.1.1. <i>Reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos</i>	76
4.1.2. <i>A maturação linfocitária</i>	76
4.1.3. <i>Princípio da seleção tímica</i>	77
4.1.3.1. Seleção positiva	78
4.1.3.2. Seleção negativa	78
4.1.4. <i>Ativação dos linfócitos T CD4⁺</i>	79
4.1.5. <i>Ativação dos linfócitos T CD8⁺</i>	80
4.1.6. <i>Ativação dos linfócitos B</i>	80
5. TRANSPLANTE E TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA	82
5.1. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA REJEIÇÃO DO ENXERTO	82
5.1.1. <i>Fase de sensibilização</i>	82
a) A apresentação direta	83
b) A apresentação indireta	83
5.1.2. <i>Fase efetora</i>	83
5.2. MECANISMOS DE INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA	84
5.2.1. <i>Deleção clonal</i>	84
5.2.2. <i>Anergia clonal</i>	85
5.2.3. <i>Regulação/supressão</i>	85
5.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DE TOLERÂNCIA PERIFÉRICA	86
5.3.1. <i>Bloqueio de co-receptores</i>	86
5.3.2. <i>Bloqueio da co-estimulação</i>	86
5.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DE TOLERÂNCIA CENTRAL	87
6. INDUÇÃO DE QUIMERISMO MOLECULAR POR TRANSFERÊNCIA GÊNICA	89
7. TOLERÂNCIA NEONATAL	91
CAPÍTULO I – QUIMERISMO HEMATOPOIÉTICO E INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA NO RATO GUNN.....	93
1. INTRODUÇÃO	94
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	95
2.1. ANIMAIS	96
2.2. ISOLAMENTO E TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS.....	97

2.2.1 Triagem de células tronco hematopoiéticas: seleção negativa por triagem magnética	97
2.2.2. Transdução das células hematopoiéticas pelo vetor HIV-hBUDPGT1A1	98
2.2.2.1. Construção e produção do vetor lentiviral	99
2.3. TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS	100
2.4. HEPATECTOMIA PARCIAL E TRANSDUÇÃO DOS HEPATÓCITOS	101
2.4.1. Construção e produção do RV-hB-UDPGT1A1	102
2.5. PARÂMETROS ANALISADOS APÓS O TRANSPLANTE	103
2.5.1. Análise do quimerismo molecular	103
2.5.1.1. Extração do DNA	103
2.5.1.2. Dosagem do DNA	104
2.5.1.3. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativa	104
2.5.2. Dosagem da bilirrubina plasmática	105
2.5.3. Detecção de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1	105
2.6. PARÂMETROS ANALISADOS APÓS A TRANSDUÇÃO HEPÁTICA	106
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	106
3. RESULTADOS	107
4. DISCUSSÃO	109
CAPÍTULO II – TERAPIA GÊNICA NO RATO GUNN RECÉM-NASCIDO MEDIADA POR VETORES RETROVIRAIS	114
1. INTRODUÇÃO	115
2. MATERIAIS E MÉTODOS	116
2.1. ANIMAIS	116
2.2. ESQUEMA EXPERIMENTAL	116
2.3. ANÁLISE DA MUTAÇÃO POR PCR-RFLP (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION – RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM</i>)	117
2.4. CONSTRUÇÃO E PRODUÇÃO DOS VETORES RETROVIRAIS	117
2.4.1. Vetor RV-hB-UDPGT1A1	117
2.4.2. Vetor RV-nlsLacZ	118
a) Linhagem celular	118
b) Cultura celular	118
c) Titulação dos vetores retrovirais	118
2.5. ANÁLISE DA BILIRRUBINA SÉRICA	119
2.6. ANÁLISE DA BILE	119
2.7. BIÓPSIA HEPÁTICA	120
2.8. ANÁLISE DA TRANSDUÇÃO HEPÁTICA POR PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	120
2.8.1. Extração do DNA	120
2.8.2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) semi-quantitativa	121
2.8.3. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativa	121
2.9. ANÁLISE POR WESTERN BLOT EM LISADO HEPÁTICO	122
2.10. IMUNOHISTOQUÍMICA β -GALACTOSIDASE EM BIÓPSIA HEPÁTICA	123
2.11. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO TRANSGENE	123
a) Análise por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	124
b) Análise do RNA (<i>RT-PCR: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction</i>)	124
2.12. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-hB-UDPGT1A1	124
2.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	125

3. RESULTADOS	126
4. DISCUSSÃO	138
CAPÍTULO III – TERAPIA GÊNICA NO RATO GUNN RECÉM-NASCIDO MEDIADA POR VETORES LENTIVIRAIS	141
1. INTRODUÇÃO	142
2. MATERIAIS E MÉTODOS	143
2.1. ANIMAIS	143
2.2. ESQUEMA EXPERIMENTAL	143
2.3. ANÁLISE DA MUTAÇÃO POR PCR-RFLP (<i>RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM</i>)	144
2.4. CONSTRUÇÃO E PRODUÇÃO DOS VETORES LENTIVIRAIS.....	144
2.5. ANÁLISE DA BILIRRUBINA SÉRICA.....	144
2.6. ANÁLISE DA BILE	144
2.7. BIÓPSIA HEPÁTICA	145
2.8. ANÁLISE DA TRANSDUÇÃO HEPÁTICA POR PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>).....	145
2.9. IMUNOHISTOQUÍMICA GFP EM BIÓPSIA HEPÁTICA	145
2.10. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO TRANSGENE.....	146
2.11. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HB-UDPGT1A1	146
2.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	146
3. RESULTADOS	147
4. DISCUSSÃO	158
CONCLUSÕES	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura do retrovírus	27
FIGURA 2. Genoma do retrovírus	28
FIGURA 3. Ciclo replicativo do retrovírus	31
FIGURA 4. Estrutura genômica do retrovírus selvagem e do vetor retroviral.....	32
FIGURA 5. Produção de vetor retroviral defectivo pela célula de encapsulação	33
FIGURA 6. Transdução do hepatócito pelo vetor retroviral contendo o gene que codifica o fator IX da coagulação sangüínea.....	34
FIGURA 7. Estrutura do lentivírus.....	37
FIGURA 8. Genoma do lentivírus.....	38
FIGURA 9. Representação esquemática das construções lentivirais derivadas do HIV-1	42
FIGURA 10. Produção transitória de vetores lentivirais.....	45
FIGURA 11. Metabolismo da bilirrubina.....	62
FIGURA 12. Conjugação da bilirrubina.....	64
FIGURA 13. Estrutura genômica do complexo UDPGT1 humano	65
FIGURA 14. Ratos Gunn recém-nascidos com dois dias de idade	67
FIGURA 15. Esquema experimental do transplante de medula óssea no rato Gunn.....	96
FIGURA 16. Hepatectomia parcial no rato segundo a técnica de Higgins & Anderson	102
FIGURA 17. Análise genotípica da mutação no éxon 3 do gene UDPGT1 por PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição BstNI.....	126
FIGURA 18. Nível sérico de bilirrubina seis semanas após transferência gênica nos ratos..	127
FIGURA 19. Fotografia do soro de ratos Gunn com seis semanas de idade	128
FIGURA 20. Análise da bilirrubina sérica dos ratos a longo tempo.....	129
FIGURA 21. Perfil cromatográfico dos glucuronídeos de bilirrubina do rato 1 (grupo I), treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1	130

FIGURA 22. Análise da PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) semi-quantitativa no DNA extraído do fígado de ratos do grupo I, treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1	132
FIGURA 23. Detecção imunohistoquímica de hepatócitos expressando β -galactosidase em ratos do grupo II, duas semanas após a injeção do vetor RV- <i>nlsLacZ</i>	134
FIGURA 24. Análise por Western Blot da proteína hB-UDPGT1A1 no fígado dos ratos 1, 2 e 3, treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1	135
FIGURA 25. Distribuição do transgene <i>hB-UDPGT1A1</i> em vários órgãos dos ratos 4 e 5 por PCR e RT-PCR, trinta e quatro semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1	136
FIGURA 26. Análise genotípica da mutação no éxon 3 do gene <i>UDPGT1</i> por PCR-RFLP.	147
FIGURA 27. Nível sérico de bilirrubina seis semanas após transferência gênica nos ratos..	148
FIGURA 28. Fotografia do soro de ratos Gunn com seis semanas de idade	149
FIGURA 29. Análise da bilirrubina sérica a longo tempo	150
FIGURA 30. Perfil cromatográfico dos glucuronídeos de bilirrubina do rato E (grupo I), vinte e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1	151
FIGURA 31. Análise por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) semi-quantitativa do DNA extraído do tecido hepático após transferência gênica nos ratos E, F e G do grupo I....	153
FIGURA 32. Detecção imunohistoquímica da proteína GFP no fígado, vinte e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-GFP	155
FIGURA 33. Análise por Western Blot da proteína hB-UDPGT1A1 no fígado dos ratos E, F e G (grupo I), vinte e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1	156
FIGURA 34. Determinação da disseminação do transgene <i>mTTR- hB-UDPGT1A1</i> por PCR em vários órgãos dos ratos A e B (grupo I), quarenta e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1	157

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características dos vetores virais.....	46
TABELA 2. Indicações de transplante hepático para doença hepática metabólica hereditária.....	54
TABELA 3. Erros inatos da expressão da bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase	61
TABELA 4. Definição de vários tipos de quimerismo	88
TABELA 5. Receptores de medula óssea geneticamente modificada, número de células transplantadas e quantidade de partículas do vetor HIV-hB-UDPGT1A1/célula	100
TABELA 6. Quimerismo molecular no sangue periférico dos ratos G1-G10 transplantados com a medula óssea geneticamente modificada pelo vetor HIV-hB-UDPGT1A1, sete semanas após o transplante.....	107
TABELA 7. Análise da bilirrubinemia e título de anticorpos anti hB-UDPGT1A1 no soro dos ratos G1-G10, antes (D0) e após a transdução hepática pelo vetor RV-hB-UDPGT1A1 (D14, D28, D42).....	108
TABELA 8. Quantificação de glucuronídeos de bilirrubina na bile dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I), treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1	131
TABELA 9. Valores da PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativa na curva padrão e no DNA dos ratos tratados (grupo I), treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1	133
TABELA 10. Quantificação de glucuronídeos de bilirrubina na bile	152
TABELA 11. Valores da PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) quantitativa na curva padrão e no DNA dos ratos tratados (grupo I)	154

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAA:** célula apresentadora de antígeno
- CPH:** complexo principal de histocompatibilidade
- DNAc:** molécula de DNA produzida a partir de um RNA mensageiro e portanto sem os íntrons que estão presentes no DNA genômico
- GALV:** glicoproteína de envelope do vírus leucêmico de macaco
- GFP:** *green fluorescent protein*
- hB-UDPGT1A1:** bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase humana
- HeLa:** linhagem celular derivada de carcinoma ovariano humano
- IL-2, IL-4, IL-5, IL-10:** interleucina
- IFN- γ :** interferon gama
- LacZ:** gene que codifica a β -galactosidase de *E. coli*
- LTC:** linfócito T citotóxico
- LTR:** promotor do retrovírus (*Long Terminal Repeat*)
- MOI:** *multiplicity of infection*
- NIH 3T3:** linhagem celular derivada de fibroblasto embrionário murino
- nls:** sinal de localização nuclear
- Tet on/tet off:** construção que controla a regulação da expressão do gene VSV-G baseada no sistema indutor/repressor do operador tetraciclina bacteriano
- RD114:** glicoproteína de envelope de retrovírus felino
- RNA_m:** molécula de RNA transcrita a partir de um DNA e que especifica a seqüência de aminoácidos de uma proteína
- TCR:** receptor do linfócito T (*T Cell Receptor*)
- T_H:** linfócito T auxiliar (*T helper*)
- Te671:** linhagem celular derivada de fibrosarcoma humano
- WP1:** anticorpo anti-hB-UDPGT1A1
- 293:** linhagem celular derivada de célula epitelial embrionária de rim humano

GLOSSÁRIO

Autólogo: autotransplante

Encapsulação: processo de formação do capsídeo em torno do RNA viral

Expressão gênica: processo pelo qual a informação codificada por um gene é convertida em uma manifestação fenotípica

Integração: inserção de uma molécula de DNA em outra molécula de DNA

Proteína truncada: proteína deletada de uma parte da região carboxi terminal, originada pela presença de um códon *stop* prematuro

Provírus: genoma retroviral integrado sob a forma de um DNA fita dupla no DNA de uma célula hospedeira

Recombinante: sintético

Tradução: síntese de proteína a partir de um RNA mensageiro (RNAm)

Transcrição: síntese de RNA por uma RNA polimerase a partir de uma matriz de DNA

Transdução: transferência de material genético de uma célula à outra por intermédio de um vírus

Transfecção: introdução de material genético em uma célula utilizando-se métodos não-virais

Transgene: gene transferido

Virião: genoma retroviral sob a forma de dois RNA fita simples, não integrado

RESUMO

A síndrome de Crigler-Najjar tipo I (CN-1) é uma doença hepática hereditária recessiva rara caracterizada pela ausência completa da bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase (B-UDPGT1A1), resultando em níveis elevados de bilirrubina não conjugada. Terapia gênica para doenças hereditárias do fígado requer eficiente transferência e constante expressão do gene que codifica a proteína terapêutica nos hepatócitos. Na última década, a eficácia da transferência gênica no fígado no rato Gunn (modelo animal da CN-1) foi avaliada. Uma resposta imune contra a proteína terapêutica impediu a correção a longo prazo do fenótipo. A indução de tolerância à proteína codificada pelo transgene é fundamental para se alcançar cura completa e definitiva de uma doença genética. Para atingir este objetivo, foi explorado duas abordagens. No capítulo I, a geração de quimerismo molecular hematopoiético através do transplante de células tronco da medula óssea expressando hB-UDPGT1A1, no rato Gunn foi avaliado. Células transduzidas com vetor lentiviral contendo o transgene *hB-UDPGT1A1* foram injetadas em ratos receptores irradiados. Seis semanas após o transplante, o quimerismo molecular (<1%) no sangue total e avaliação da bilirrubinemia (>80 μM) foram realizados. Posteriormente, hepatócitos em regeneração foram transduzidos após hepatectomia parcial usando vetores retrovirais contendo o mesmo transgene. Os níveis de bilirrubina foram avaliados mensalmente. Tolerância à proteína terapêutica foi observada somente em 1 rato quimérico após transferência gênica *in vivo* no fígado. Nos capítulos II e III a transferência gênica em ratos recém-nascidos foi realizada. Ratos Gunn de 2 dias de idade receberam pela veia temporal, vetores retrovirais (capítulo II) ou lentivirais (capítulo III) contendo o gene *hB-UDPGT1A1*. A bilirrubinemia foi monitorada 6 semanas após e a seguir mensalmente. Em 6 semanas, a bilirrubinemia foi completamente normalizada (3 μM) e permaneceu com valores normais (<10 μM) por mais de 40 semanas. Grandes quantidades de diglucuronídeos de bilirrubina estavam presentes na bile. Análises por PCR and Western Blot confirmaram a presença e expressão da hB-UDPGT1A1 quase exclusivamente no fígado. Este trabalho representa a primeira demonstração de uma correção completa e permanente da hiperbilirrubinemia no rato Gunn, por intermédio de vetores retrovirais e lentivirais.

ABSTRACT

Crigler-Najjar syndrome (CN-1) is a rare recessive inherited liver disease characterized by complete absence of bilirubin-uridin-diphosphate-glucuronosyl transferase (B-UDPGT1A1) resulting in high levels of unconjugated bilirubin. Gene therapy for inherited liver diseases requires the efficient transfer and sustained expression of a gene encoding the therapeutic protein into hepatocytes. During the last decade, the efficiency of liver gene transfer in Gunn rat (animal model of CN-1) was evaluated. An immune response directed against the therapeutic protein precluded long term correction of the phenotype. Tolerization to the protein encoding by a transgene is mandatory to achieve complete and definitive cure of a genetic disease. To achieve this goal, it was explored two approaches. In the chapter I, the generation of hematopoietic molecular chimerism using transplantation of hB-UDPGT1A1-transduced bone marrow stem cells in Gunn rats was evaluated. Transduced cells by lentiviral vectors harbouring *hB-UDPGT1A1* transgene were injected into irradiated recipients rats. Six weeks after transplantation, the molecular chimerism (< 1%) on whole blood cells and an evaluation of bilirubinemia (> 80 μ M) were performed. Thereafter, regenerating hepatocytes were transduced after partial hepatectomy using retroviral vectors carrying the same transgene. The bilirubin levels were evaluated monthly. Tolerance to the therapeutic protein was observed only in one chimeric rat after retroviral-mediated *in vivo* delivery to the liver. In the chapter II and chapter III, the gene transfer to newborn rats was evaluated. Two-day old newborn Gunn rats were injected via temporal vein with *hB-UDPGT1A1*-retroviral (chapter II) or lentiviral vectors (chapter III). Bilirubinemia was monitored at 6 weeks and monthly thereafter. At 6 weeks, bilirubinemia was completely normalized (3 μ M) and remained in the normal range (< 10 μ M) for more than 40 weeks. Large amounts of bilirubin glucuronides were present in the bile. PCR and Western Blot analysis confirmed the presence and expression of hB-UDPGT1A1 almost exclusively in the liver. This work represents the first demonstration of a complete and permanent correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats using retroviral and lentiviral vectors.

INTRODUÇÃO

O fígado é um alvo importante para a terapia gênica pelo fato de ser o sítio de numerosas sínteses protéicas e pois de anomalias ou deficiências protéicas curáveis por terapia gênica. Assim, a terapia gênica em hepatologia poderia representar uma alternativa terapêutica ao transplante hepático no tratamento das doenças hepáticas metabólicas hereditárias.

Entretanto, após a transferência de um gene em uma célula alvo, como por exemplo o hepatócito, esta passa a produzir uma proteína “não própria”, produto da expressão do transgene. Uma resposta imune indesejada contra a proteína “não própria” elimina a célula transduzida, impedindo a expressão estável e a longo prazo do transgene. A resposta imune representa atualmente um obstáculo limitando toda futura aplicação clínica da terapia gênica no tratamento de crianças portadoras de doenças hepáticas metabólicas hereditárias.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de mecanismos para indução de tolerância imunológica após transferência gênica no fígado de ratos Gunn – modelo experimental da síndrome de Crigler-Najjar tipo I- para evitar a resposta imune responsável pelo caráter transitório da expressão do transgene no fígado e permitir sua expressão estável e a longo prazo.

Para isso, foram utilizadas duas abordagens diferentes:

a) No capítulo I, o estabelecimento de um quimerismo hematopoiético no rato Gunn foi avaliado após o transplante de células da medula óssea modificadas geneticamente por vetor lentiviral contendo o gene que codifica a proteína bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase humana (hB-UDPGT1A1). Posteriormente, transferência gênica no fígado mediada por vetor retroviral contendo o mesmo gene.

b) Nos capítulos II e III foi avaliada a administração de vetores retrovirais e lentivirais, respectivamente, no rato Gunn recém-nascido. Estes vetores contêm o gene que codifica a proteína bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase humana (hB-UDPGT1A1).

Este trabalho experimental foi desenvolvido no Laboratório de Terapia Gênica (INSERM 105) e no Laboratório de Bioterapias Hepáticas (CIC-INSERM 04) - Instituto de Doenças do Aparelho Digestivo, localizados no Centro Hospitalar Universitário de Nantes, França.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Terapia Gênica

Terapia gênica pode ser definida como uma abordagem terapêutica baseada na possibilidade de transferir e de expressar seqüências codificadoras de DNA no genoma da célula alvo, a fim de se obter efeito terapêutico (Ferry, 2003).

As primeiras tentativas aprovadas de terapia gênica começaram no início dos anos 90, quando ensaios clínicos *ex vivo* foram iniciados. O primeiro tipo de ensaio tratava da imunoterapia do melanoma. Linfócitos T, extraídos do tumor, eram em seguida geneticamente modificados para secretar a citocina TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Rosenberg, 1992). O segundo consistia em tratar o déficit em adenosina desaminase (ADA: *Adenosine Deaminase Deficiency*), causa de déficits imunitários combinados severos (SCID: *Severe Combined Immunodeficiency*) pela transferência de linfócitos T, provenientes do sangue periférico ou de precursores hematopoiéticos geneticamente modificados (Blaese et al., 1995; Bordignon et al., 1995; Hoogerbrugge et al., 1995). Embora resultados encorajadores fossem obtidos, nenhum dos ensaios permitiu tratar as doenças. As razões pelas quais uma cura definitiva do fenótipo não foi evidenciada são melhores compreendidas atualmente. Por exemplo, no caso da terapia gênica do déficit em ADA, a razão principal do fracasso poderia estar associada à fraca taxa de transdução obtida. Estes resultados já indicavam a necessidade de se melhorar os métodos de transferência gênica, bem como os vetores em si (Kohn et al., 1998).

A década de 90 foi de modo geral desencorajadora em razão do número considerável de ensaios clínicos efetuados sem um real sucesso. Finalmente, com a chegada do ano 2000, os primeiros sucessos começaram a se fazer presentes. Destes, o mais impressionante foi a cura completa de três pacientes portadores do déficit imunitário SCID ligado ao cromossomo X (SCID-X: *X-Linked Severe Combined*

Immunodeficiency) no Hospital Necker, França (Cavazzana-Calvo et al., 2000). A metodologia utilizada foi próxima àquela empregada nos primeiros ensaios de terapia gênica, realizada no déficit em ADA, e consistia em reinjetar as células tronco-hematopoiéticas CD34+ isoladas a partir das amostras de medula óssea dos pacientes. Estas células tronco eram modificadas geneticamente *ex vivo* através de um vetor retroviral que codificava a cadeia comum γc do receptor da interleucina-2, necessária ao desenvolvimento linfocitário T (Cavazana-Calvo et al., 2000). O sucesso do tratamento nos pacientes SCID-X foi alcançado graças ao aprimoramento das técnicas de transferência gênica *ex vivo* a partir de células tronco hematopoiéticas e, ao conhecimento da fisiopatologia da doença, em particular a vantagem seletiva dos progenitores linfóides expressando o transgene durante o seu desenvolvimento.

O sucesso do tratamento dos pacientes SCID-X constitui uma prova do princípio da eficácia da terapia gênica. No conjunto das aplicações, a eficácia da transferência de gene parece entretanto limitada pela vetorização do gene terapêutico em função de cada aplicação (Pfeifer & Verma, 2001). Por exemplo, certas patologias necessitam de uma expressão a níveis normais do gene terapêutico, mas a longo prazo (doenças genéticas), enquanto que outras necessitam de uma expressão forte e específica do gene, mas de modo transitório (expressão de um *killer-gene* em células neoplásicas e sua aplicação na terapia gênica do câncer). Progressos importantes foram realizados nos últimos dez anos, em relação *i*) à construção de novos vetores (os vetores lentivirais são o melhor exemplo), *ii*) aos métodos de produção em grande escala na ausência de contaminações pelo vírus selvagem, e enfim *iii*) sua validação em modelos animais. Além disso, as indicações terapêuticas são mais abrangentes, em particular em relação às doenças genéticas raras nas quais a ausência ou a insuficiência dos tratamentos convencionais fazem da transferência gênica uma alternativa terapêutica promissora (Cavazzana-Calvo et al. 2001; Vigna & Naldini, 2000; Pfeifer & Verma, 2001).

Existem três elementos essenciais para realizar a transferência de um gene: o gene, a célula alvo e o vetor.

1.1. Gene

O gene a ser transferido deve ser conhecido, seqüenciado e clonado para ser utilizado. Distinguem-se os genes marcadores e os genes de interesse terapêutico. Os genes marcadores permitem revelar a exequibilidade da transferência gênica, assim como avaliar a duração e a intensidade da expressão do transgene na célula alvo, como por exemplo, o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* (Lac Z)*(Ferry et al., 1991). O gene codificando para a GFP (*Green Fluorescent Protein*) é igualmente utilizado. Os genes de interesse terapêutico são aqueles que codificam uma proteína, cuja síntese anormal ou ausente é responsável por uma doença conhecida (por exemplo: o gene codificando para o fator IX da coagulação, sua mutação é a origem da hemofilia B) (Kay et al., 1993)

1.2. Célula alvo

A célula alvo, como por exemplo o hepatócito, permite a transcrição do transgene e sua expressão.

1.3. Vetor de transferência gênica

Terceiro elemento da transferência gênica, o vetor de transferência gênica serve como veículo do transgene. A introdução do gene sob a forma de DNA na circulação sistêmica, ou mesmo diretamente no órgão alvo, é pouco eficaz, devido a uma degradação rápida do DNA (Forbes & Hodgson, 1997).

* Gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* (gene Z): o operon da lactose nos colibacilos possui 3 genes estruturais: Lac Z, Lac Y e Lac A, os quais codificam, respectivamente, as enzimas β -galactosidase, permease e transacetilase. A enzima β -galactosidase catalisa a reação onde a lactose é degradada, pela bactéria, em glucose e galactose.

Diferentes tipos de vetores foram descritos, classificados em vetores não virais e vetores virais.

1.3.1. Vetores não virais

Os vetores não virais permitem a transferência de um gene na célula alvo, através de métodos físico-químicos como a precipitação fosfocálcica (Dubensky et al., 1984), o dextran (Gopal, 1985), o bombardeio de partículas (Yang et al., 1990), assim como os liposomas (Versland et al., 1992). A eficácia dos vetores não virais, apesar da tendência a melhorar, permanece inferior a dos vetores virais.

1.3.2. Vetores virais

Os vetores virais representam 70% dos vetores atualmente utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica (Anderson, 2002). A origem dos vetores virais são diversas: adenovírus, vírus associados a adenovírus, retrovírus e, lentivírus.

a) Os vetores adenovirais

Os adenovírus constituem uma família de vírus subdividida em sete sub-grupos (A-G) e com 47 tipos diferentes. Eles são muito freqüentes e são responsáveis por infecções das vias respiratórias superiores, gastro-enterites e conjuntivites. Os adenovírus são vírus não envelopados. Seu genoma é constituído por um DNA linear fita dupla de 30-38 kb, o qual codifica de 30 a 40 genes divididos em dois grupos: os genes de fase precoce (em particular *E1A* e *E1B*, *E2*, *E3* e *E4*) e os genes de fase tardia (essencialmente os genes de estrutura do virião) cuja transcrição está sob a dependência dos genes transcritos na fase precoce. O DNA genômico contém

igualmente seqüências repetidas invertidas nas duas extremidades – ITR (*Inverted Terminal Repeats*).

O adenovírus se replica unicamente no núcleo da célula onde a transcrição do genoma viral é regulada por transativadores virais, principalmente o gene *E1A*. A replicação do DNA adenoviral é dependente de proteínas celulares e virais (Volpers & Kochanek, 2004).

Esses vírus são capazes de infectar uma grande variedade de células, independentemente da fase do ciclo celular – quiescentes ou em divisão. Os primeiros vetores adenovirais foram derivados dos vírus tipo 2 e 5 (grupo C). Eles foram obtidos substituindo-se a seqüência do gene *E1A* pela seqüência do transgene. Na ausência do gene *E1A*, os genes de fase tardia não são traduzidos, o vetor é então defectivo para a replicação.

A utilização dos primeiros vetores permitiam unicamente a utilização de genes de tamanho limitado ($\leq 8\text{kb}$). O desenvolvimento de vetores com um genoma viral restrito permite hoje a inserção de seqüências de até 35 kb. Além disso, esses vetores podem ser produzidos com títulos elevados e podem ser facilmente concentrados.

O DNA adenoviral não se integra no genoma da célula alvo e permanece em posição extra-cromossômica. A expressão do transgene é transitória, o DNA recombinante se dilui ao longo das divisões celulares subseqüentes. Esta diluição é acompanhada igualmente de uma resposta imune causando a destruição das células transduzidas, e portanto, uma expressão limitada do transgene (Kay et al., 2001; Volpers & Kochanek, 2004). Efetivamente, um forte inconveniente dos vetores adenovirais é a resposta imune dirigida contra as proteínas virais, cuja expressão persiste nas células transduzidas e que acarretada a rejeição pelo organismo das células transduzidas. Vetores de segunda e terceira geração foram desenvolvidos (deleção dos genes *E1*, *E2*, *E3* e/ou *E4*) para tentar minimizar a imunogenicidade.

b) Os vetores derivados dos vírus associado aos adenovírus

O vírus associado ao adenovírus (*Adeno-Associated Virus-AAV*) é um vírus não patogênico pertencente à família dos parvovírus. A partícula viral não envelopada contém o genoma viral sob a forma de um DNA linear fita simples de aproximadamente 5 kb. Cada extremidade desse DNA linear é formado por uma seqüência de 145 nucleotídeos chamada ITR (*Inverted Terminal Repeats*) que formam um grampo, indispensável para o início da replicação do DNA viral pelas proteínas celulares. O genoma contém dois genes: *rep*, cujas proteínas controlam a replicação, a expressão e a integração do vírus e *cap*, que codifica as proteínas do capsídeo. O AAV é naturalmente defectivo para a replicação e tem necessidade para se multiplicar da presença de um vírus *helper*, adenoviral ou herpético. Esses vírus apresentam a vantagem de poder infectar uma grande variedade de tipos celulares, independentemente da fase do ciclo celular (Kay et al., 2001).

Contrariamente ao adenovírus, o genoma viral do AAV se integra no genoma da célula hospedeira. No homem, esta inserção não é aleatória, fazendo-se em um sítio específico situado no braço longo do cromossomo 19 (19p13-3qter) (Samulski et al., 1991). Entretanto, os AAV recombinantes obtidos a partir do vírus selvagem perdem a capacidade de se integrar em um sítio específico (Nakai et al., 2003). Essas diferentes características fazem do AAV um bom candidato para os vetores de transferência gênica. Somente as seqüências ITR são necessárias em *cis* para a replicação, encapsulação e inserção no genoma da célula transduzida.

Uma desvantagem ligada à utilização dos AAV recombinantes são o tamanho limitado da seqüência que pode ser inserida nesses vírus (≤ 9 kb).

Estes vetores, após um certo número de resultados encorajadores em modelos animais, foram utilizados em protocolos clínicos para pacientes portadores de hemofilia B (Snyder et al., 1999; Sarkar et al., 2004). Apesar da forte evidência da expressão da proteína terapêutica no músculo, os níveis circulantes do fator IX foram muito baixos (<2%) em todos os pacientes (Liu et al., 2004).

Estudos *in vivo* no camundongo, rato e cachorro utilizaram o vetor AAV para transduzir a retina desses animais. Resultados encorajadores foram obtidos, permitindo assim o planejamento da abordagem em futuros ensaios clínicos para doenças hereditárias comprometendo a retina, como por exemplo a retinite pigmentar (Rolling et al., 2004).

c) Os vetores retrovirais

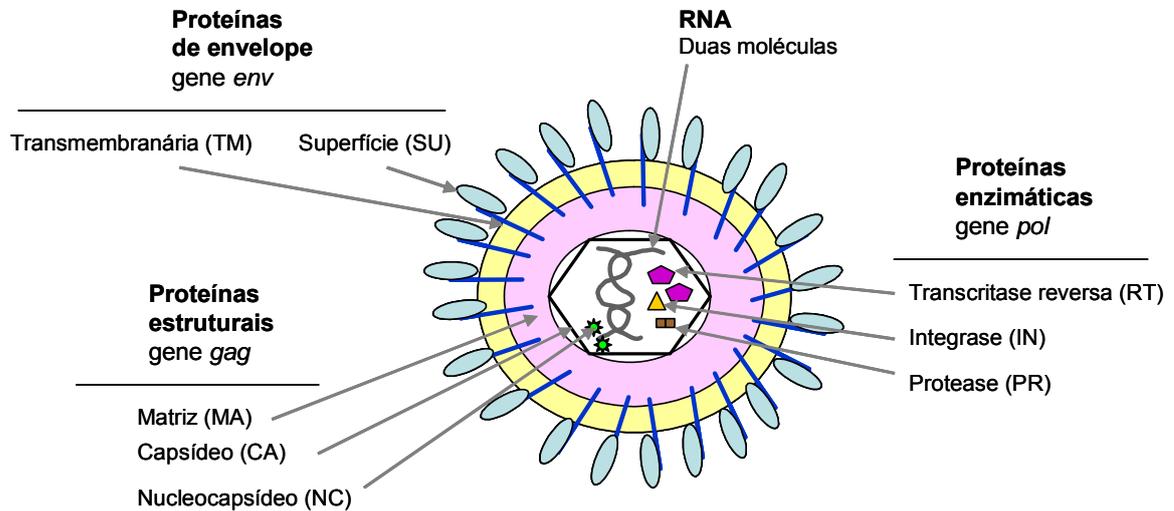
Os oncoretrovírus forneceram a base dos primeiros vetores virais de transferência gênica e são os mais utilizados. A grande maioria desses vetores é derivada dos retrovírus da leucemia murina do tipo C, o vírus de Moloney (MoMLV). A principal característica e vantagem desta família é a capacidade destes vírus de integrar seu material genético no genoma das células alvos, garantindo assim a transmissão do transgene às células filhas, caso ocorra divisão celular subsequente.

A fim de melhor compreender o princípio de utilização do vetor retroviral, nós faremos uma revisão sobre o retrovírus selvagem e seu ciclo.

c.1) Estrutura

A representação esquemática de um retrovírus selvagem é mostrada na figura 1. Ele é constituído de duas moléculas de RNA fita simples localizadas no capsídeo icosaédrico, onde estão também as enzimas virais necessárias ao ciclo replicativo: protease, transcriptase reversa e integrase. O capsídeo é envolvido por um envelope formado de glicoproteínas virais e de proteínas da membrana plasmática da célula hospedeira (Varmus, 1988).

FIGURA 1. Estrutura do retrovírus

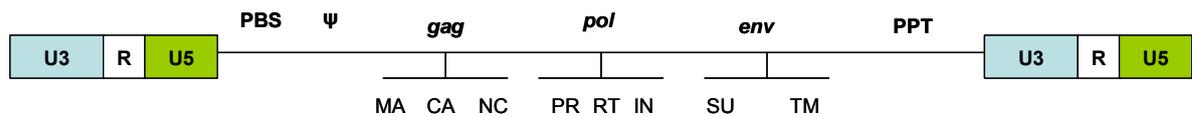


c.2) Genoma do retrovírus

O genoma do retrovírus contém seqüências codificadoras de três genes denominados *gag*, *pol* e *env* que são responsáveis pela síntese de proteínas do capsídeo viral (GAG), das enzimas virais (POL) e das proteínas do envelope (ENV). O genoma retroviral contém também outros elementos em *cis*, estes incluem: *Long Terminal Repeats* (LTR), localizados nas duas extremidades do genoma. Os LTR são constituídos de três regiões, U3, R e U5. Muitos dos elementos necessários à transcrição do provírus (promotores e intensificadores) estão localizados na região U3. A região R e U5 são necessárias para a transcrição, bem como a região PBS (*Primer-Binding Site*), localizada à jusante da região U5, que é perfeitamente complementar ao RNA transportador (RNAt), e a região PPT (*Poly-Purine Tract*) localizada à montante da seqüência *env*. Os LTR também contém seqüências curtas, chamadas sítios de ligação (*att*), os quais mediam a integração do DNA retroviral. O sinal de

encapsulação ψ está localizado entre PBS e *gag*. Ele permite a introdução do RNA genômico na partícula retroviral (Lois et al., 2001) (Figura 2).

FIGURA 2. Genoma do retrovírus



As proteínas de estrutura (gene *gag*)

O gene *gag* permite a tradução de um precursor protéico chamado GAG. Este precursor é encapsulado nas partículas virais, e depois clivado pela protease viral (PR). Esta clivagem origina a formação de três proteínas: as proteínas da matriz (MA), do capsídeo (CA) e do nucleocapsídeo (NC).

As enzimas virais (gene *pol*)

As enzimas virais são traduzidas a partir do RNAm graças à uma mudança no quadro de leitura do gene *gag*. Isto conduz à síntese de um precursor GAG-POL, o qual é clivado pela protease viral para liberar as diferentes proteínas GAG e as enzimas: uma protease (PR), a transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN). A protease é indispensável à clivagem dos precursores GAG-POL. A transcriptase reversa é uma DNA polimerase que catalisa a retrotranscrição (ou transcrição reversa) na qual o RNA fita simples é transcrito em um DNA fita dupla. A integrase, a qual é fixada nas duas extremidades do DNA retro-transcrito, catalisa a integração do DNA viral no genoma celular.

As proteínas do envelope (gene *env*)

Como para outras proteínas virais, as proteínas do envelope são primeiramente sintetizadas sob a forma de um precursor protéico posteriormente clivado. O precursor das proteínas do envelope é clivado por uma proteína celular do aparelho de Golgi. As duas proteínas resultantes são: a glicoproteína de superfície (SU), proteína fortemente glicosilada que contém os sítios de fixação aos receptores de membrana e, a proteína transmembranária (TM) que é responsável pela fusão da partícula viral com a célula, após a fixação no receptor celular.

Partículas virais

Os retrovírus são vírus envelopados com cerca de 100 nm de diâmetro. As partículas virais são formadas por brotamento a partir da membrana celular e devem sofrer uma etapa de maturação antes de se tornarem infecciosas. A maturação dos viriões é o resultado da clivagem dos precursores GAG e GAG-POL pela protease. A liberação das diferentes proteínas são acompanhadas de uma condensação das proteínas do capsídeo, que formam então a parede externa do coro, dentro do qual se encontram as enzimas virais, bem como o RNA associado ao nucleocapsídeo.

c.3) Ciclo replicativo dos retrovírus

O ciclo replicativo dos retrovírus caracteriza-se pela: entrada na célula, transcrição reversa do genoma viral, integração sob a forma de um provírus na célula hospedeira e formação de novas partículas virais.

A entrada do retrovírus na célula inicia-se pela fixação da glicoproteína de envelope SU a seu receptor celular específico. Após a fixação, as mudanças de conformação das glicoproteínas do envelope permitem a entrada do vírus por fusão

direta com a membrana plasmática da célula ou por endocitose, conduzindo à translocação do capsídeo viral ao citoplasma. Inicia-se então um processo extremamente complexo : a retrotranscrição ou transcrição reversa, onde o RNA fita simples é transformado em DNA fita dupla. A transcrição reversa é catalisada pela transcriptase reversa.

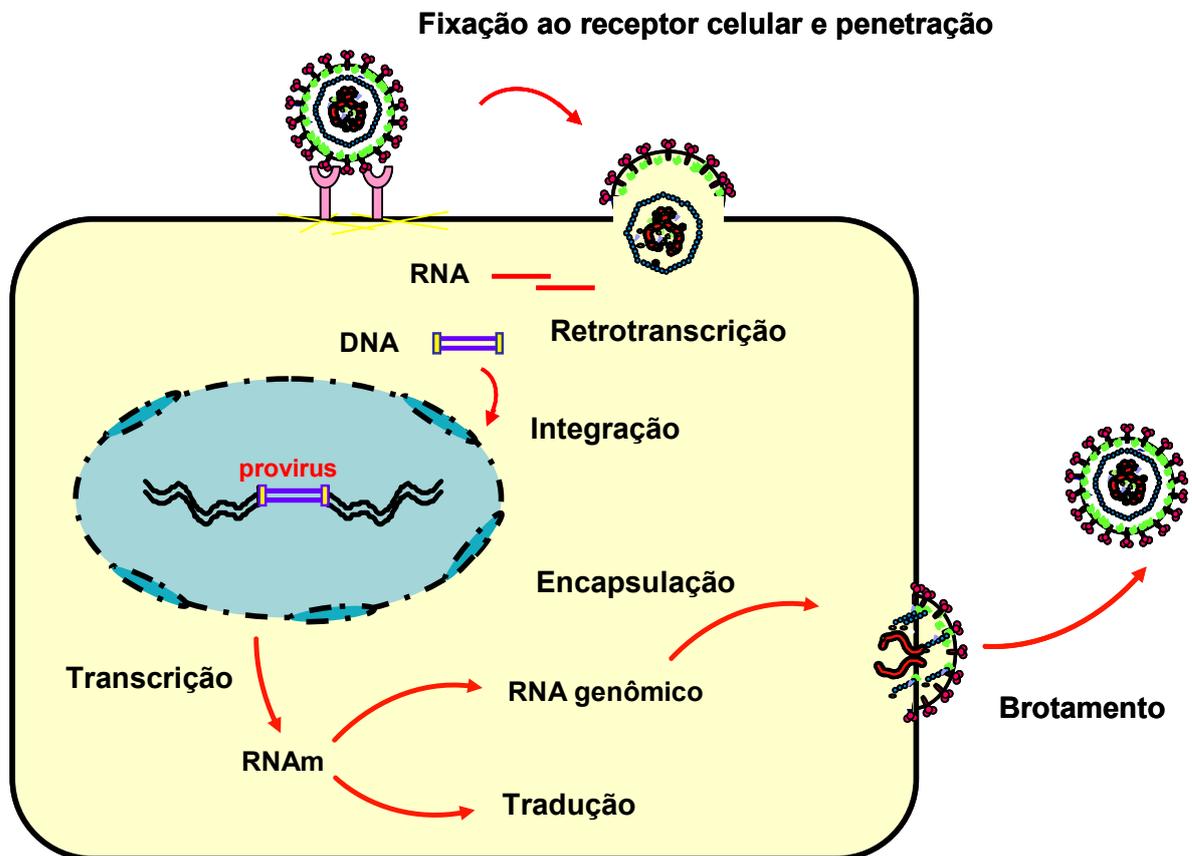
O DNA fita dupla e as proteínas virais formam um complexo nucleoproteico denominado PIC (*Pré Integration Complex*) (De Soultrait et al., 2002). A passagem do complexo retroviral DNA-proteínas, do citoplasma ao núcleo, é limitada pela membrana nuclear da célula-alvo – este complexo mede aproximadamente 100 nm enquanto que os poros da membrana nuclear medem 10 nm. É a desintegração da membrana nuclear durante a mitose que torna possível a passagem do complexo retroviral DNA-proteínas para o núcleo e a sua integração ao genoma da célula alvo sob a forma de um provírus (Miller et al., 1990; Lewis & Emermam, 1994).

A integração é mediada pela integrase viral. A integração é aleatória no genoma da célula alvo, com entretanto uma preferência para as regiões de fraca condensação da cromatina (Wu et al., 2003)

Os RNA mensageiros transcritos do genoma retroviral integrado constituirão os (i) RNA genômicos dos futuros retrovírus, enquanto que (ii) outros serão traduzidos em enzimas e proteínas virais (Coffin et al., 1996).

A encapsulação é em seguida iniciada pela interação entre as proteínas do capsídeo e a sequência ψ . A reunião dos diferentes constituintes é na face interna da membrana citoplasmática. O retrovírus é liberado por brotamento da membrana citoplasmática, onde são acopladas as proteínas do envelope (Coffin et al, 1996) (Figura 3).

FIGURA 3. Ciclo replicativo do retrovírus

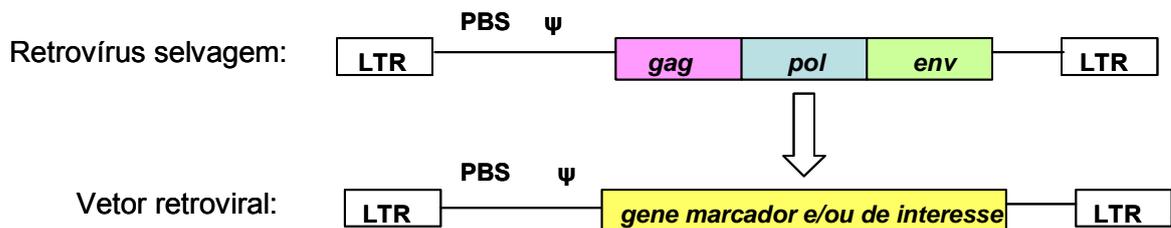


c.4) Construção de vetores retrovirais

Os vetores retrovirais são obtidos substituindo-se as seqüências *trans*, ou seja, os três genes virais (*gag*, *pol* e *env*) por um ou mais genes. O conjunto de seqüências *cis*, ou seja, as seqüências reguladoras necessárias para a encapsulação (seqüência ψ), a transcrição reversa (PBS, R, PPT) e a expressão dos genes (LTR) são conservadas (Figura 4). Quando somente um gene é clonado, ele é geralmente colocado sob o controle transcricional dos LTR retrovirais, os quais constituem promotores fortes na maioria das células. As vezes é interessante clonar dois genes no mesmo vetor: um gene de interesse e um gene marcador. O gene marcador (gene da β -galactosidase de

E. coli, por exemplo) é utilizado para seleccionar as células tendo integrado o provírus. Esta estratégia serve para enriquecer a população de células transduzidas, originando clones.

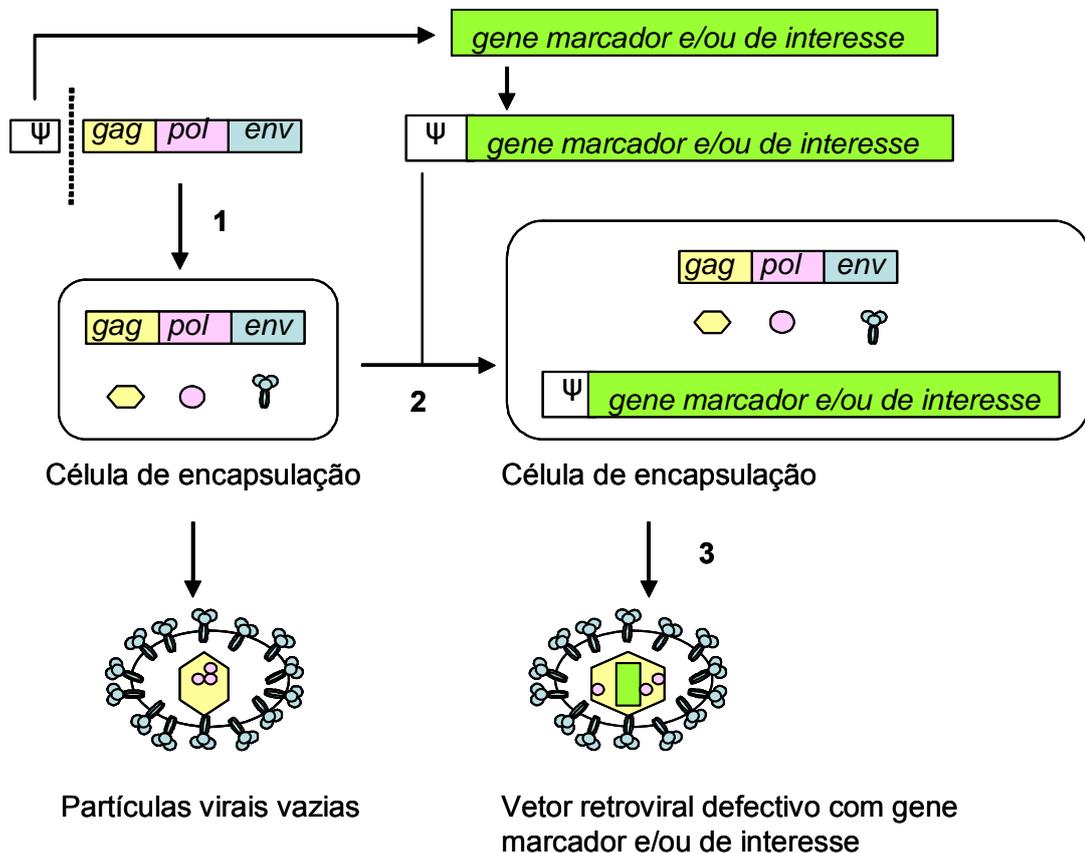
FIGURA 4. Estrutura genômica do retrovírus selvagem e do vetor retroviral



c.5) Produção de vetores retrovirais: linhagens transcomplementares

Os vetores retrovirais são produzidos por linhagens celulares de encapsulação. São linhagens celulares que sintetizam os produtos dos genes *gag*, *pol* e *env*, permitindo assim a encapsulação dos vetores retrovirais. A seleção de um clone expressando uma forte concentração de proteínas virais permitiu a obtenção da primeira linhagem transcomplementar. A linhagem utilizada foi a NIH3T3 (fibroblasto de camundongo). Para obter-se as partículas virais é necessário transfectar a linhagem de encapsulação com a construção retroviral e de seleccionar um clone transfectado de modo estável. Este clone de células selecionado passa a ser a linhagem produtora de retrovírus. Os vetores retrovirais são liberados no meio de cultura celular (Figura 5).

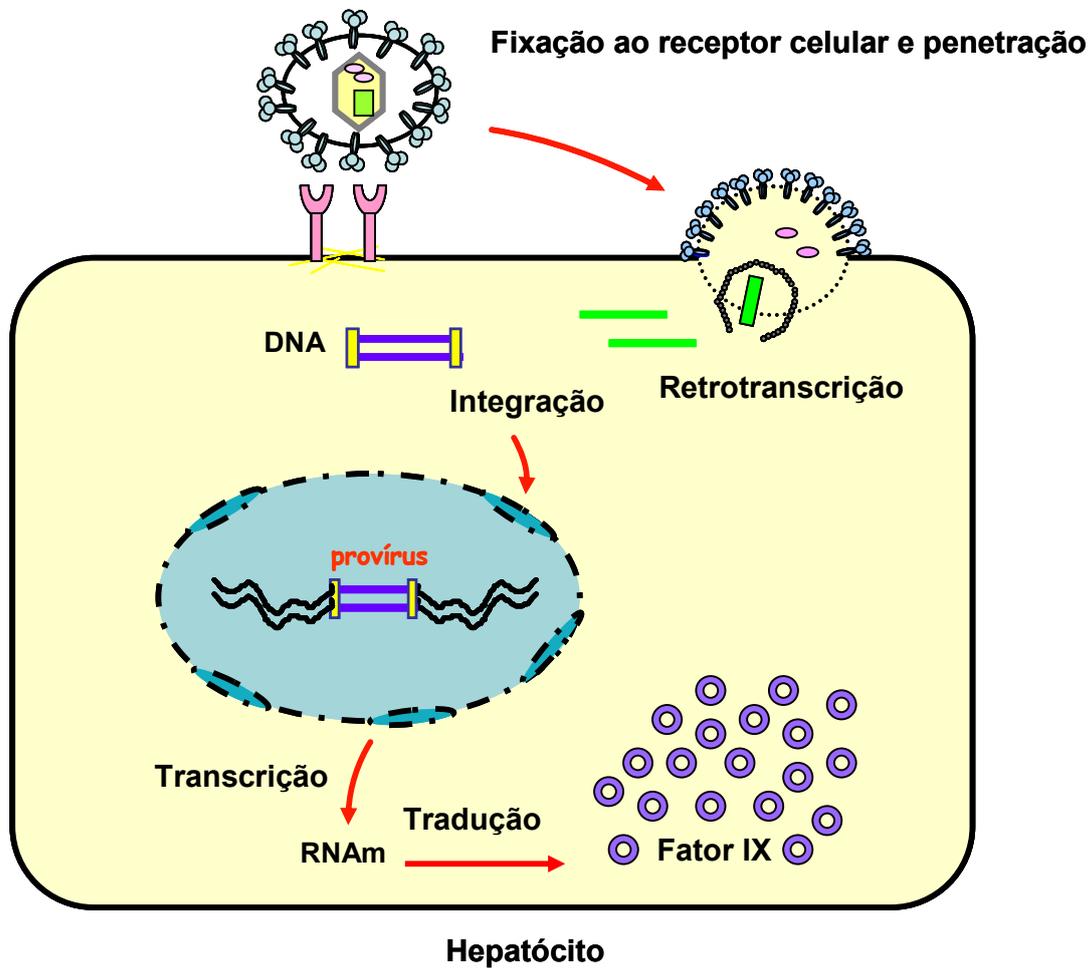
FIGURA 5. Produção de vetor retroviral defeutivo pela célula de encapsulação



(1) Os genes *gag*, *pol* e *env* (sem a sequência ψ) foram transfectados em uma linhagem celular de encapsulação. As células expressam de modo estável as proteínas virais que formam o capsídeo, as enzimas virais e o envelope. Na ausência do genoma viral, elas produzem somente partículas virais vazias. (2) A célula de encapsulação é transfectada com um plasmídeo retroviral contendo o gene (gene marcador ou de interesse), e as sequências *cis* necessárias à encapsulação, à transcrição reversa e à integração. (3) Produção das partículas retrovirais defeitivas encapsulando o RNA. Adaptado de Davern & Scharschmidt (Davern & Scharschmidt, 1998).

O sobrenadante de cultura celular recolhido e contendo os vetores retrovirais defeitivos para a replicação será utilizado para transduzir células alvos, como por exemplo o hepatócito. A transdução do hepatócito pelo vetor retroviral contendo o gene que codifica o fator IX da coagulação sanguínea é mostrado na figura 6.

FIGURA 6. Transdução do hepatócito pelo vetor retroviral contendo o gene que codifica o fator IX da coagulação sanguínea



Estas primeiras linhagens de encapsulação são entretanto pouco seguras. De fato, existe uma homologia entre a construção transcomplementar e a construção retroviral ao nível das seqüências reguladoras e, um único evento de recombinação pode ser suficiente para reintroduzir a seqüência ψ no genoma defeutivo e produzir partículas virais competentes para a replicação (RCR – *Replication Competent Retrovirus*). Para evitar este problema, novas linhagens de encapsulação foram desenvolvidas. A primeira etapa consistiu em separar os genes *gag* e *pol* e *env* em dois plasmídeos diferentes (Danos & Mulligan, 1988). Nas últimas gerações de linhagens de encapsulação (GP+env AM12, FLYA13AM, FLYRD18, GP+E86, TEL-CeB6AF7)

os genes *gag*, *pol* e *env* são colocados sob a dependência de promotores diferentes (Brenner & Malech, 2003). Nestas novas linhagens existe muito pouca homologia de seqüências e, o risco de recombinação homóloga é considerado quase inexistente (Merten, 2004).

A qualidade da linhagem produtora é medida pelo título viral. O título viral - número de partículas virais infecciosas/mililitro de sobrenadante - é avaliado em linhagem celular estabelecida (freqüentemente a linhagens NIH3T3, 293T, HeLa e Te671): o número de células transduzidas permite estabelecer a titulação do sobrenadante. A medida do título depende de vários fatores: *i)* a proteína do envelope utilizada pode pseudotipar os vetores virais, *ii)* a linhagem celular, *iii)* o protocolo de transdução, *iv)* a sensibilidade da detecção das células transduzidas, *v)* o transgene e seu nível de expressão. As linhagens de encapsulação que são amplamente utilizadas permitem a obtenção de clones de células produtoras de vetores retrovirais, com títulos de 10^7 a 10^8 partículas infecciosas por mililitro (pi/ml). O título viral permite definir a multiplicidade de infecção (MOI – *Multiplicity of Infection*). Ela corresponde ao número de partículas virais disponíveis para transduzir uma célula alvo.

As vantagens dos vetores retrovirais são as seguintes: *i)* a principal é que eles possuem a propriedade de integrar o seu genoma no genoma da célula alvo, o que permite visar uma expressão estável e a longo prazo do transgene, mesmo se a célula transduzida se divide; esta característica do vetor retroviral torna-o atrativo para utilizá-lo em protocolos de terapia gênica para doenças hepáticas metabólicas hereditárias em crianças; *ii)* sendo defectivos para a replicação, eles podem infectar uma única célula.

Os inconvenientes dos vetores retrovirais são os seguintes: *i)* a obtenção de títulos de partículas retrovirais mais baixos (10^8) em relação aos vetores adenovirais (10^{10} a 10^{12}), *ii)* uma integração não específica do vetor retroviral pode eventualmente acontecer em um gene supressor de tumor ou em um local suscetível de ativação de um oncogene, *iii)* para os vetores retrovirais, a etapa limitante da transdução, é a passagem do complexo retroviral DNA-proteína. É durante a mitose que ocorre a

desintegração da membrana nuclear e, conseqüentemente, a passagem do complexo retroviral no núcleo. É uma real limitação para a transdução *in vivo* no fígado, pois os hepatócitos são células tipicamente quiescentes. Para superar este obstáculo, os vetores retrovirais são administrados durante a regeneração hepática induzida mais freqüentemente por hepatectomia parcial, como veremos no item 3.

d) Os vetores lentivirais

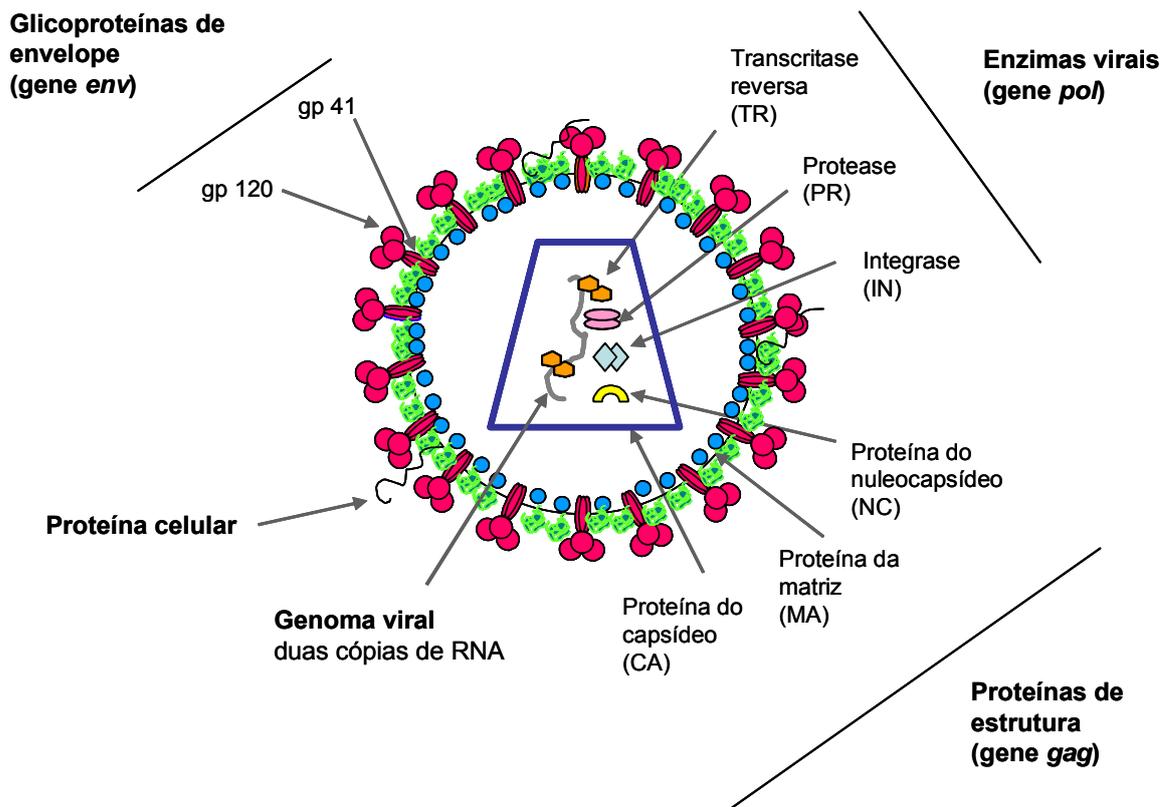
Os lentivírus constituem uma sub-família de retrovírus tendo várias características próprias. Esta família possui seu nome (lenti-) devido a sua longa incubação (vários meses, até anos) necessária antes do aparecimento da doença. O grupo dos lentivírus incluem o grupo dos primatas: vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e 2) e simiana (SIV); e o grupo de não primatas: vírus da imunodeficiência felina (FIV) e bovina (BIV), o grupo ovino-caprino (CAEV-*Caprine Arthritis Encephalitis Virus*) e o grupo eqüino EIAV (*Equine Infectious Anaemia Virus*) (Brenner & Malech, 2003).

d.1) Estrutura

Os lentivírus do tipo HIV-1 são constituídos de duas moléculas de RNA fita simples. Eles possuem um envelope, cuja bicamada lipídica é oriunda da membrana plasmática. A glicoproteína de envelope contém uma parte interna (gp 41) ou glicoproteína transmembranária TM, e uma parte externa (gp 120), ou glicoproteína de superfície SU. A face interna do envelope é preenchida com uma matriz protéica constituída pela p17 (MA). O capsídeo, em forma de cone, é constituído pela proteína p24 (CA). No interior se encontra o RNA viral envolvido pela proteína do nucleocapsídeo (NC). A transcriptase reversa ou RT, está localizada no interior do

capsídeo, associada à uma integrase (IN, enzima necessária à integração do DNA no genoma celular) e à uma protease (PR) (Figura 7).

FIGURA 7. Estrutura do lentivírus

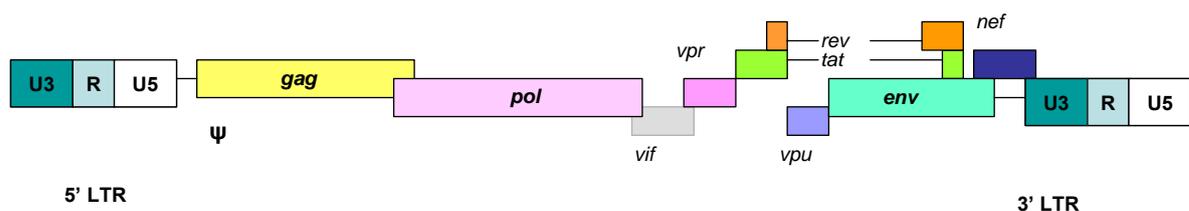


d.2) Genoma do lentivírus

Diferentemente dos oncoretrovírus, cujo genoma contém somente três genes (*gag*, *pol*, *env*), todos os lentivírus possuem três ou seis genes adicionais que são expressos a partir de RNAm multi-epissados. Uma única das proteínas adicionais é comum a todos os lentivírus: a proteína REV.

O genoma do HIV (1 e 2) é constituído por seis genes além de *gag*, *pol*, e *env*. Entre os seis genes, dois codificam proteínas indispensáveis à replicação do vírus *in vivo* e *in vitro* (proteínas reguladoras: TAT e REV) e quatro codificam proteínas que têm papel na patogenicidade *in vivo* do vírus (proteínas acessórias: VIF, VPR, VPU e NEF) (Figura 8). As proteínas reguladoras agem na transcrição viral e na exportação nuclear dos RNAm virais via TAT e REV. A proteína TAT (*Transcriptional Activator*) age como ativador da transcrição, favorecendo a manutenção do complexo de alongamento formado em torno da RNA polimerase II (Jeang et al., 1999). A proteína REV (*Nuclear RNA Export Factor*) está envolvida na exportação dos RNAm, fixando-os ao nível da seqüência RRE (*REV Responsive Element*) (Pollard & Malim, 1998). As proteínas VIF, VPR, VPU e NEF participam em diferentes processos virais. NEF (*Negative Factor*) tem um papel predominante na patogenicidade, controlando negativamente o CD4 e as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I, bem como a estimulação da replicação viral (Lundquist et al., 2002). VIF (*Virion Infectivity Factor*) está envolvido na infectividade viral e na formação dos viriões. VPU (*Viral Protein*) está presente no HIV-1, mas não no HIV-2 (que expressa outra proteína VPX). Sua expressão favorece o brotamento dos vírus na superfície das células infectadas e a degradação do CD4. VPR (*Viral Protein*) contém um sinal de localização nuclear. Esta proteína bloqueia a proliferação celular em fase G2. Este bloqueio no ciclo celular tem por consequência um aumento na transcrição a partir dos LTR, e então um aumento da replicação viral.

FIGURA 8. Genoma do lentivírus



d.3) Ciclo replicativo do lentivírus

A complexidade do genoma do HIV-1 se traduz por mecanismos virais originais, ausentes nos retrovírus. Ao nível da penetração do vírus na célula, o HIV-1 possui (como o MoMLV) um receptor celular, o CD4. Este, presente na superfície de certos linfócitos T, de macrófagos e de determinadas células apresentadoras de antígenos (CAA), não é suficiente para a entrada do vírus na célula. Os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 são igualmente necessários à fixação da gp 120 e à fusão das membranas. Em relação ao PIC (*Pre Integration Complex*), as proteínas da matriz, a integrase e a transcriptase reversa estão envolvidas tanto para o HIV-1 como para o MoMLV. Para o HIV-1, tem-se além destas, a VPR que possui, como a integrase e a proteína da matriz, um sinal de localização nuclear. Esta proteína permite a fixação do PIC ao complexo do poro nuclear. Esta fixação poderia assim permitir a passagem do PIC através da membrana nuclear, o que não acontece com o MoMLV (Le Rouzic et al., 2002)

d.4) Construção de vetores lentivirais

A grande maioria dos vetores lentivirais utilizados em protocolos de terapia gênica são derivados do HIV-1 devido a um melhor conhecimento da biologia deste lentivírus. Progressos foram realizados em terapia gênica graças ao desenvolvimento dos vetores lentivirais, visando principalmente o tratamento de doenças hematológicas, como por exemplo a hemofilia (Tsui et al., 2002). De fato, esses vetores têm a particularidade de poder transduzir eficazmente células quiescentes graças ao seu transporte nuclear ativo (Logan et al., 2002). Vários tipos celulares refratários à infecção retroviral puderam ser transduzidos de maneira satisfatória com os lentivírus (hepatócitos, neurônios, macrófagos, células tronco-hematopoiéticas altamente purificadas). A primeira geração de vetores lentivirais derivados do HIV-1 foi

desenvolvida em 1996 (Naldini et al., 1996). Os vetores eram obtidos por co-transfecção de três plasmídeos contendo os elementos em *trans* e em *cis* necessários à produção de partículas virais recombinantes nas células produtoras. Diferentes fatores determinam a probabilidade de eventos de recombinação entre as construções utilizadas para produzir os vetores. Entre eles, o grau de homologia de seqüências entre o vetor e o plasmídeo de empacotamento, bem como a capacidade de encapsulação dos diferentes RNA. Na realidade, a recombinação se produz preferencialmente durante a etapa de transcrição reversa, e necessita que os diferentes tipos de RNA sejam co-encapsulados nas partículas virais. Para reduzir o número de seqüências virais e com isso o risco de recombinações homólogas, vários elementos lentivirais foram omitidos e substituídos por seqüências heterólogas. Estas incluem modificações de seqüências em *cis* tais como a substituição do LTR (*Long Terminal Repeat*) por um promotor heterólogo e a deleção do sinal de encapsulação (ψ). O envelope é também deletado em todas as construções virais e substituídos por glicoproteínas virais exógenas (vetor pseudotipado) (Delenda, 2004).

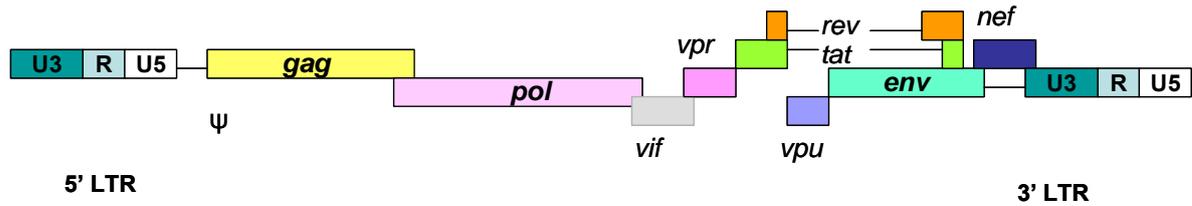
Uma estratégia importante para melhorar a segurança é eliminar do plasmídeo de empacotamento todos os genes virais não essenciais. O genoma do HIV é complexo, pois além das proteínas de estrutura, ele contém dois genes reguladores (*tat* e *rev*), cujos produtos são necessários à expressão, e quatro genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) não essenciais à replicação, mas importantes na patogenicidade (Cullen, 1998). Estas seqüências, no início mantidas nos plasmídeos de empacotamento de primeira geração (Naldini et al., 1996), foram em seguida inativadas ou deletadas, gerando sistemas de empacotamento de segunda geração. Esses vetores de segunda geração, produzidos a partir desses sistemas multi atenuados, mostraram uma eficácia similar aos de primeira geração na transdução de células *in vitro* e *in vivo* (Zufferey et al., 1997). Um novo passo foi dado em relação à segurança, eliminando-se as seqüências da proteína TAT. Graças à sua propriedade de ativador transcricional, TAT tem um papel crucial na replicação do HIV. A substituição do promotor HIV endógeno situado na região LTR 5' do vetor por promotores constitutivos fortes (SV40, CMV)

permite a produção de uma quantidade suficiente de RNA, mesmo na ausência de TAT (Kim et al., 1998). Por outro lado, Dull e colaboradores desenvolveram um sistema de terceira geração, no qual a proteína REV era produzida por um quarto plasmídeo, o que diminui ainda mais a probabilidade de formação de *Replication Competent Lentivirus* (LCR) por recombinação (Dull et al., 1998).

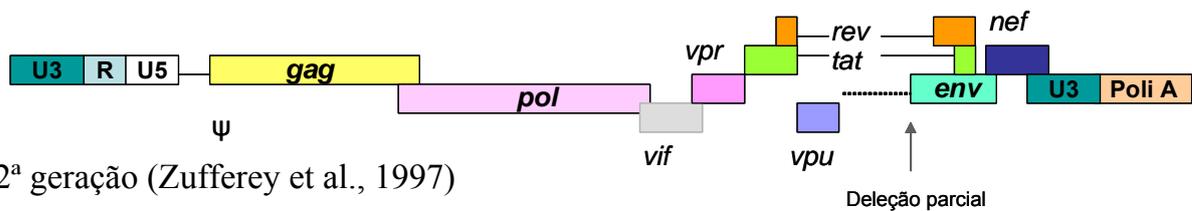
A segurança dos vetores lentivirais foi ainda aumentada pela geração dos vetores SIN (*Self-Inactivating*). Essas construções, caracterizadas pela deleção de uma parte da região U3 do promotor endógeno, inativam a expressão do LTR em 5' (Miyoshi et al., 1998). Os vetores lentivirais SIN podem ser produzidos sem perda do título infeccioso, e permitem níveis de expressão elevados dos transgenes por intermédio de promotores internos, os quais podem ser de natureza constitutiva ou tecido-específico. Entretanto, o risco de recombinação com um retrovírus endógeno ou outras seqüências gênicas do hospedeiro deve ser considerada (Naldini et al., 1996). Foi demonstrado que a infectividade dos vetores HIV pseudotipados com o envelope selvagem era claramente inferior ao do vírus endógeno (Aiken, 1997). A inserção da seqüência cPPT (*Central Purine Tract*) do HIV nos vetores lentivirais restaura a infectividade das partículas (Zennou et al., 2000). No contexto dos vetores virais, a introdução da seqüência cPPT aumenta fortemente o nível de DNA proviral integrado no genoma do hospedeiro, aumentando a translocação nuclear (Charneau et al., 1994; Van Maele et al., 2003). Esta construção pode transduzir eficazmente hepatócitos, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T, mostrando assim o seu potencial na utilização em doenças hepáticas e hematológicas (VandenDriessche et al., 2002) (Figura 9).

FIGURA 9. Representação esquemática das construções lentivirais derivadas do HIV-1

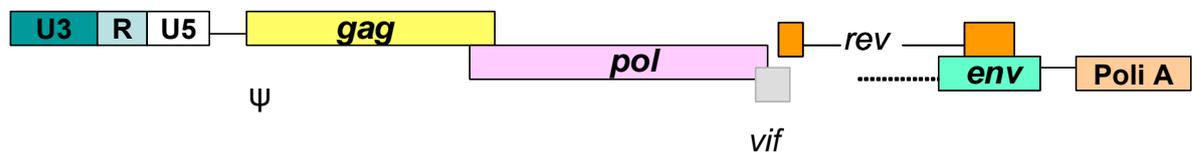
HIV-1 provírus



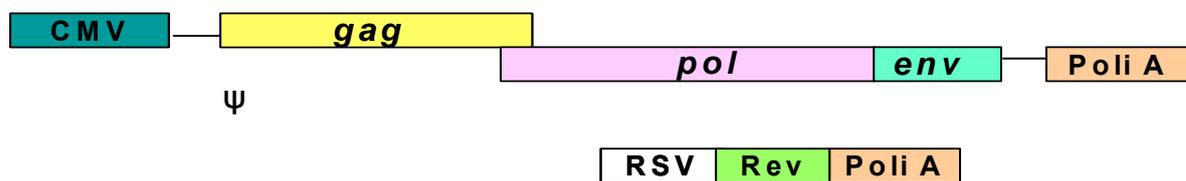
1ª geração (Naldini et al., 1996)



2ª geração (Zufferey et al., 1997)



3ª geração (Dull et al., 1998)



CMV, promotor do citomegalovírus; RSV, promotor do vírus do sarcoma de Rous; Poli A, sítio de poliadenilação; ψ , sítio de encapsulação.

d.5) Produção de vetores lentivirais

A transfecção transitória é o método atualmente mais empregado para a produção de vetores lentivirais. Ela baseia-se na co-transfecção de plasmídeos que codificam os elementos necessários em *cis* e em *trans* para a produção dos vetores (proteínas de estrutura, RNA viral e proteínas do envelope). Esses elementos são fisicamente separados, a fim de diminuir os riscos de recombinação e produção de *Replication Competent Lentivirus* (LCR).

A linhagem celular mais empregada é a 293T. Estas células possuem o poder de ser transfectadas facilmente (Figura 10).

Como para os vetores retrovirais, várias equipes tentaram desenvolver linhagens produtoras estáveis de vetores lentivirais HIV-1. A vantagem de tais linhagens é a praticidade (reprodutibilidade, caracterização precisa) e a economia (em termos de produção de plasmídeo). A utilização da glicoproteína de envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G), classicamente utilizada para pseudotipar os lentivírus, é citotóxica (Burns et al., 1993). Somente as linhagens nas quais a expressão da proteína VSV-G está sob a dependência de um promotor induzido (por exemplo o sistema *tet on/tet off* da tetraciclina ou doxíciclina) podem ser mantidas em cultura (Corbeau et al., 1996; Klages et al., 2000).

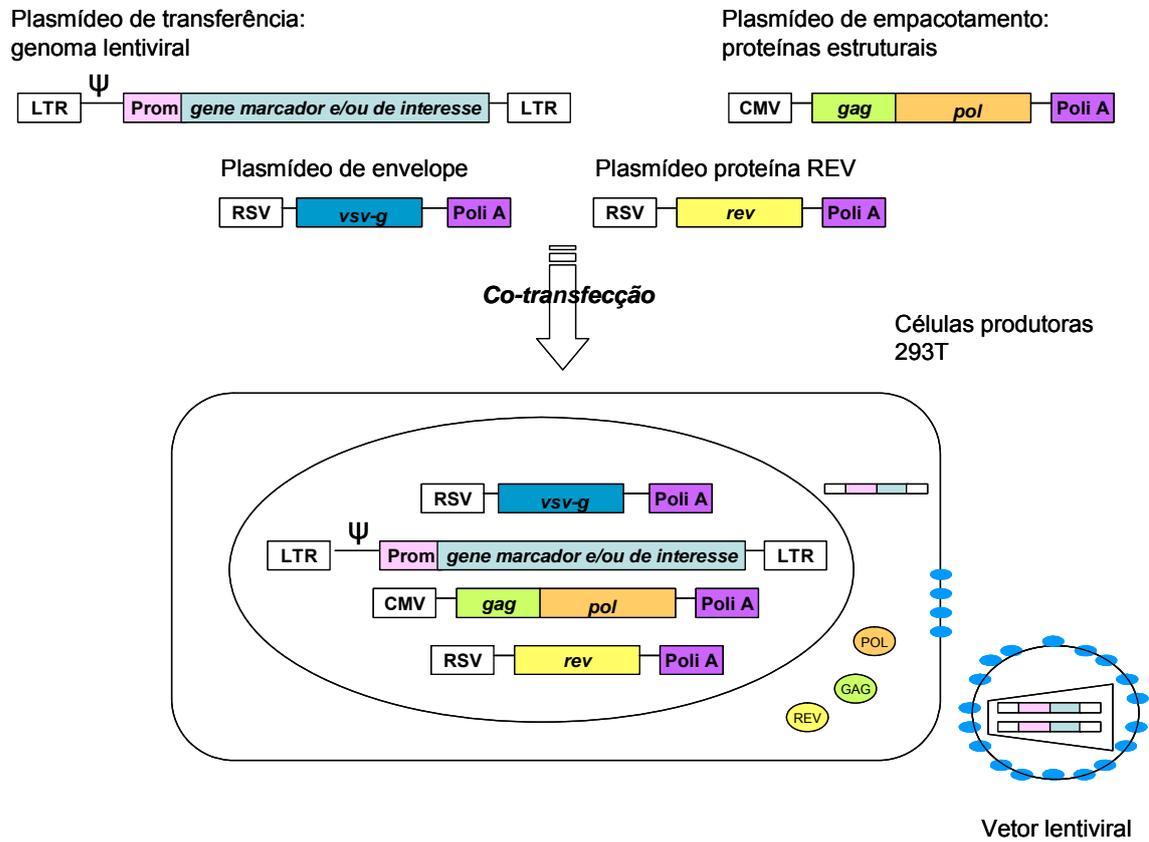
A utilização de proteínas de envelope estáveis (VSV-G, RD114, GALV) permite aumentar o título das preparações lentivirais por ultracentrifugação (Burns et al., 1993; Verhoeyen & Cosset, 2004). Técnicas de purificação das preparações virais por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) permitem a obtenção de uma melhor eficácia de transdução, provavelmente por eliminar as substâncias citotóxicas (Yamada et al., 2003).

A utilização de vetores virais em protocolos clínicos necessita de uma caracterização baseada essencialmente na determinação do título viral e ausência de partículas infecciosas (vírus competente para a replicação, micoplasmas, bactérias). A

titulação das partículas virais contidas em uma preparação baseia-se na determinação do número de partículas virais físicas (totais) e infecciosas. A quantificação das partículas totais se faz através da dosagem da proteína p24 do capsídeo viral pelo método ELISA. Esta técnica possui a vantagem de ser altamente padronizada, e validada em clínica para a pesquisa do HIV. Diferentes técnicas permitem determinar o título infeccioso, todas baseadas na detecção do vetor dentro das células infectadas. Se o vetor expressa um gene marcador ou um gene de seleção (resistência à uma droga, por exemplo), a detecção das células transduzidas torna-se fácil. As células são infectadas por diluições seriadas do sobrenadante viral. Posteriormente, o transgene é pesquisado: (i) degradação do substrato X-gal para o gene que codifica β -galactosidase de *E. coli* ou, (ii) por citometria de fluxo (detecção da proteína GFP, *Green Fluorescent Protein*, para o gene que codifica esta proteína). Em compensação, se o vetor não expressa um gene marcador, a quantificação das partículas infecciosas é realizada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa ou Southern Blot (Sastry et al., 2002).

A utilização clínica destes vetores deve sofrer um controle da ausência de lentivírus competente para a replicação. O teste principal utilizado para este fim consiste em cultivar células mononucleadas do sangue periférico infectadas pelas preparações virais. O decréscimo ao longo do tempo, da quantidade de p24, indica a ausência de vírus competentes para a replicação (Escarpe et al., 2003).

FIGURA 10. Produção transitória de vetores lentivirais



As principais características dos vetores virais estão resumidas na tabela 1.

TABELA 1. Características dos vetores virais

Vetor	Tropismo, integração, expressão	Desvantagens	Transgene
AV (DNA)	Células em divisão ou não Posição episomal Expressão transitória	Reações inflamatórias e imunes	< 35 kb
AAV (DNA)	Células em divisão ou não Posição episomal ou integração aleatória Expressão estável se integrado	Possível mutagênese insercional	< 9 kb
RV (RNA)	Células em divisão Integração aleatória Expressão estável	Possível mutagênese insercional	< 8 kb
LV (RNA)	Células em divisão ou não Integração aleatória Expressão estável	Possível mutagênese insercional Risco de recombinação com o HIV	< 10 kb

AV: adenovírus; AAV: vírus associado ao adenovírus; RV: retrovírus; LV: lentivírus

1.3.3. Regulação da expressão de vetores virais

a) Expressão induzida do vetor viral

A regulação da expressão de um transgene nas células alvos deve ser considerada quando a proteína expressa pode ser tóxica (exemplo do envelope VSV-G, descrito anteriormente). Sistemas de vetores com expressão induzida foram construídos utilizando a mesma estratégia desenvolvida para as linhagens transcomplementares, ou seja, a incorporação do promotor induzido (*tet on / tet off*) pela tetraciclina (Ogueta et al, 2001; Vigna et al., 2002). Estes promotores permitem a regulação temporal da expressão do transgene *in vitro* e *in vivo*.

b) Expressão tecido-específica

A restrição da expressão de um transgene em um determinado tecido ou tipo celular é um fator primordial para determinados estudos envolvendo proteínas que, expressas de modo não controlado, podem ser tóxicas ou desregular os mecanismos celulares. Existem duas abordagens para restringir a expressão do transgene em um tecido específico: *i)* restringir a infecção celular, modificando o tropismo da partícula viral, principalmente as proteínas do envelope, no caso dos retrovírus e lentivírus. Esta abordagem é interessante, no caso da injeção *in vivo* dos vetores; *ii)* limitar a expressão do vetor em um dado tecido (alvo transcricional) graças ao emprego de promotores especificamente ativados em um tipo celular diferenciado. Esta última possibilidade impede a ativação *in cis* de genes situados na proximidade do sítio de integração por um promotor ubiquitário forte (principalmente um promotor de origem viral). A expressão a partir de um promotor interno, sem interferência com os LTR, acarretou o desenvolvimento de vários vetores lentivirais tecido-específicos.

Assim, uma expressão específica em células apresentadoras de antígenos, em linfócitos T CD4+, em eritrócitos, em células prostáticas, em hepatócitos, puderam ser obtidas graças aos promotores respectivos dos genes: HLA-DR, CD4, β -globina, PSA (*Prostate Specific Antigen*) e albumina (Yu et al., 2001; Cui et al., 2002; Follenzi et al., 2002; Logan et al., 2002; Marodon et al., 2003).

1.4. Estratégias de transferência gênica

Dois abordagens são utilizadas para a transferência gênica no fígado: *(i) in vivo*, na qual a administração dos vetores virais é feita diretamente no parênquima hepático (Dubensky et al., 1984); no fluxo sanguíneo da veia porta (Ferry et al., 1991) e/ou da artéria hepática (Gerolami et al., 1998) ou; na via biliar (De Godoy et al., 1999); sendo que a etapa de transferência gênica se produz *in vivo*; *(ii) ex vivo*, onde

os hepatócitos são isolados de um lobo hepático, geneticamente modificados em cultura celular e então transplantados no próprio doador (transplante autólogo) ou em outro receptor (transplante alogênico). O autotransplante de hepatócitos geneticamente modificados foi realizado em modelos experimentais, tal como o coelho Watanabe, modelo animal da hipercolesterolemia familiar (Wilson et al., 1990). Posteriormente, estes resultados conduziram à realização de um protocolo clínico no homem (Grossman et al., 1995)

1.5. Transferência gênica no fígado

A revisão abaixo será dedicada aos vetores virais administrados *in vivo*: adenovírus, AAV, retrovírus e lentivírus.

1.5.1. Vetores adenovirais

Os vetores adenovirais ganharam considerável interesse pela capacidade em infectar hepatócitos quiescentes, em níveis elevados (Li et al., 1993). Entretanto a expressão do transgene é transitória, devido à eliminação dos hepatócitos transduzidos pela resposta imune citotóxica. A resposta imune foi principalmente dirigida contra proteínas adenovirais embora a resposta contra a proteína codificada pelo transgene também estava presente (Jooss et al., 1998). A resposta humoral não é observada após a transferência gênica de vetores hépato-específicos (Apolipoproteína A-1) (De Geest et al., 2003). Protocolos experimentais foram desenvolvidos para superar a rejeição imune. A modulação do sistema imune do receptor foi estudada, testando-se vários tratamentos imunoreguladores, tais como a ciclofosfamida, FK506, CTLA4Ig (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*; CD152), etc. Estes imunossuppressores são capazes de impedir a resposta imune transitoriamente (Yang et al., 1996; Kay et al.,

1997). Uma outra estratégia para reduzir a resposta imune foi a modificação do próprio vetor através da deleção de vários genes virais (Schiedner et al., 1998), ou administração subsequente de vetores de diferentes sorotipos (Morrall et al., 1999). Estas estratégias forneceram resultados encorajadores em termos de duração da expressão do transgene.

1.5.2. Vetores AAV

Estes vetores são desprovidos de todos genes virais, e conseqüentemente não induzem resposta imune viral. Um estudo recente em hemofilia B, demonstrou que esses vetores podem induzir tolerância a proteínas estrangeiras após transdução hepática (Mingozzi et al., 2003). Entretanto, após a transdução, a apresentação dos epítomos do transgene pelas moléculas do CPH de classe I pode ocorrer, resultando em resposta imune (Sarukhan et al., 2001). A administração intravenosa de vetor AAV2, o qual codifica a proteína humana α -galactosidase A sob o controle transcricional de um promotor hépato-específico, permitiu um nível significativo da expressão da proteína em camundongos Fabry. Além disso, a expressão hepática da proteína manteve-se estável por um período de doze meses, e a mesma foi associada com a redução da resposta imune (Ziegler et al., 2004).

1.5.3. Vetores retrovirais

Em 1991, foi demonstrado que, 24 horas após hepatectomia parcial no rato, vetores retrovirais administrados na veia porta transduziram 5% dos hepatócitos (Ferry et al., 1991). Posteriormente, a mesma técnica aplicada em cachorros permitiu a transdução de 1% dos hepatócitos (Cardoso et al., 1993). Visando-se uma futura aplicação clínica, era necessário aumentar a taxa de transdução hepatocitária para poder mudar a expressão fenotípica de um déficit enzimático. A transdução eficiente

dos hepatócitos foi então demonstrada por De Godoy et al. perfundindo o fígado de rato com vetores retrovirais administrados através do trato biliar, obtendo taxa de transdução hepatocitária de $58,7 \pm 23,6\%$ (De Godoy et al., 1999).

A seguir, um outro obstáculo também superado foi evitar toda e qualquer disseminação extra hepática dos vetores retrovirais durante sua administração *in vivo*, o risco constante sendo o de transduzir células da linha germinal e mudar o patrimônio genético constitucional do indivíduo, quando da futura aplicação clínica. O modelo pré clínico desenvolvido por De Godoy et al de exclusão completa da circulação vascular esplâncnica e sistêmica do fígado de rato perfundido *in vivo-in situ* permitiu obter taxa de transdução hepatocitária de 35% demonstrando que (i) a captação total do vetor retroviral não se realiza em uma única passagem pelo parênquima hepático e (ii) a taxa de transdução hepatocitária esta relacionada com a titulação viral e ela é limitada pela atividade mitótica dos hepatócitos (De Godoy et al., 2000). Outros métodos para induzir a regeneração hepática (tais como a administração de fatores de crescimento, substâncias tóxicas e tri-iodotironina) foram também utilizados com sucesso, para permitir a transdução de hepatócitos, usando vetores retrovirais (Forbes et al., 2000; Pichard et al., 2001).

Entretanto, a expressão do transgene a longo prazo, quando da utilização de vetores retrovirais concentrados, é impedida por uma resposta imune dirigida contra a proteína codificada pelo transgene (Izembart et al., 1999; Aubert et al., 2002). A expressão do transgene desaparece do fígado em menos de três semanas. O decréscimo da expressão do transgene não é devida à perda da atividade do promotor, uma vez que análises (por *Polymerase Chain Reaction* -PCR) do DNA hepático revelam o desaparecimento do transgene. Entretanto, uma inflamação do parênquima hepático estava presente e correlacionada com o aparecimento de linfócitos T citotóxicos dirigidos contra a proteína codificada pelo transgene. A eliminação dos hepatócitos transduzidos não ocorre quando os ratos foram tratados com anticorpos anti-CD8 (Aubert et al., 2002). Posteriormente, a eliminação dos hepatócitos β -galactosidase positivos não acontece em ratos transgênicos para a β -galactosidase. Uma vez que

estes ratos são tolerantes em relação à β -galactosidase, mas não para qualquer outra proteína viral, esta observação demonstrou que o alvo da resposta imune era a proteína codificada pelo transgene. Observou-se também que a resposta imune citotóxica foi acompanhada de anticorpos, indicando uma resposta imune humoral nesses ratos. A mesma constatação foi observada em camundongos transgênicos para a proteína GFP, cujo fígado foi previamente transduzido por um vetor retroviral GFP (Follenzi et al., 2004). Uma tolerância permanente à β -galactosidase pode ser alcançada usando unicamente o CTLA-4Ig (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*; CD152), quando a secreção permanente da molécula é obtida via transferência gênica mediada por um vetor adenoviral (Puppi et al., 2004).

A resposta imune pode ser causada pela infecção das células apresentadoras de antígenos após a administração do vetor (Song et al., 1997), bem como a apresentação cruzada (“*cross presentation*”) da proteína codificada pelo transgene, contaminando o sobrenadante viral. A fim de esclarecer ambos problemas, a purificação do sobrenadante viral, através da passagem em coluna de afinidade foi realizada, diminuindo assim a quantidade de proteína suscetível de induzir resposta imune via “*cross presentation*”. Ainda no mesmo trabalho, a injeção viral foi feita após completa exclusão vascular do fígado a fim de eliminar a infecção das células apresentadoras de antígenos, localizadas fora do fígado. Ambas purificação da preparação viral e exclusão vascular do fígado foram necessárias para impedir parcialmente a resposta imune (Podevin et al., 2004).

Analisados juntos, todos esses resultados indicam que a resposta imune contra a proteína codificada pelo transgene prejudica a eficiência da transferência gênica *in vivo* no fígado (Nguyen & Ferry, 2004)

1.5.4. Vetores lentivirais

Recentemente, a eficácia dos vetores virais em transduzir hepatócitos *in vivo* foi avaliada. Esse vetor é capaz de transduzir células quiescentes, incluindo hepatócitos. Uma barreira espécie-específica na fase precoce da infecção pelo HIV-1, em hepatócitos de roedores, podem explicar a baixa infecciosidade dos vetores lentivirais nesta espécie (Nguyen et al., 2002). A estimulação dos hepatócitos para entrarem em ciclo celular, e a inclusão da seqüência “*Central Poly Purine Tract*” (cPPT) melhoram a transdução no fígado (Park et al., 2000). Entretanto, a resposta imune contra a proteína codificada pelo transgene é observada quando grandes quantidades do vetor são administradas nos modelos animais, impedindo a expressão do transgene a longo prazo. Fez-se necessário então a utilização de promotores hepato-específicos com o intuito de impedir a resposta imune após a administração *in vivo* dos vetores lentivirais em camundongos deficientes para o fator IX da coagulação (Follenzi et al., 2004).

2. Doenças metabólicas hereditárias do fígado

O fígado é o local de numerosas sínteses protéicas, e conseqüentemente de anomalias ou deficiências enzimáticas. Assim, a transferência gênica no fígado poderia representar uma alternativa terapêutica ao transplante hepático, para tratar geneticamente as manifestações clínicas de determinadas doenças metabólicas, principalmente as (i) causadas por um déficit monogênico, (ii) aquelas cuja base molecular é bem conhecida e (iii) cuja correção, mesmo que parcial da deficiência enzimática poderia melhorar a expressão clínica da doença (Davern IJ & Scharschmidt, 1998). De fato, para a maioria das deficiências enzimáticas, as manifestações clínicas acontecem somente quando a atividade enzimática é gravemente reduzida, uma vez que 5 a 25% de uma atividade enzimática normal protege freqüentemente das manifestações clínicas. Um exemplo é representado pela hemofilia B, a qual resulta de um déficit do fator IX da coagulação. Os indivíduos que possuem menos de 1% da atividade normal do fator IX correm um risco importante de hemorragia espontânea; os que possuem de 1 a 10%, correm um risco menor ou moderado, e os que têm entre 10 e 20% podem não ter nenhuma manifestação clínica (Kay & Woo, 1994).

A transferência gênica no fígado, no homem parece possível por duas razões: (i) por um lado, a cultura de hepatócitos permite estudar *in vitro* a transferência gênica no hepatócito e (ii) a cirurgia hepática permite, com um risco limitado, de planejar procedimentos que podem facilitar a transferência gênica no fígado. Antes da aplicação clínica, a transferência gênica deve provar sua eficácia e sua inocuidade em modelos experimentais.

As doenças hepáticas metabólicas hereditárias, cujas deficiências enzimáticas e/ou o comprometimento do fígado secundário à doença, e que são indicações potenciais de transplante hepático são mostradas na tabela 2.

TABELA 2. Indicações de transplante hepático para doença hepática metabólica hereditária

Doenças metabólicas por lesão direta do fígado	
<u>Doença</u>	<u>Proteína Deficiente</u>
Déficit em α 1-antitripsina	α 1-antitripsina
Tirosinemia hereditária	Fumaril aceto-acetato hidrolase
Doença de Wilson	Ceruloplasmina
Galactosemia	Galactose-1-fosfato-uridil transferase
Glicogenose tipo I	Glucose-6-fosfatase
Glicogenose tipo IV	α 1,4 glican-6-glicosil transferase
Protoporfíria	Porfobilinogênio desaminase
Mucoviscidose	CFTR
Mucopolissacaridose tipo IV	β -glucuronidase

Doenças metabólicas causando complicações extra-hepáticas graves	
<u>Doença</u>	<u>Proteína Deficiente</u>
Hiperoxalúria tipo I	Alanina-glioxilato-amino-transferase peroxisomal
Hipercolesterolemia familiar	Receptor do LDL-colesterol
Crigler-Najjar tipo I	Bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase
Hemofilia A	Fator VIII
Hemofilia B	Fator IX
Déficit em proteína C	Proteína C
Doenças do ciclo da uréia	Ornitina transcarbamilase
	Arginosuccinato sintetase

Adaptado de Bernard et al., 1988, Esquivel et al., 1988, Panis et al., 1996.

2.1. Doenças metabólicas letais por lesão direta do fígado

Entre as doenças hepáticas metabólicas hereditárias, existe um primeiro grupo em que a anomalia enzimática acarreta precocemente uma hepatopatia grave, evoluindo para cirrose e expondo ao risco de carcinoma hepático.

Nas doenças metabólicas por lesão direta do fígado, no estado de cirrose, somente o transplante hepático parece hoje possível para seu tratamento. O transplante hepático permite restaurar a atividade enzimática ausente e substituir o fígado doente, cuja cirrose é responsável pela sintomatologia. De fato, não é racional esperar um

efeito terapêutico importante da transferência gênica, em presença de lesões constituídas de cirrose. Somente um diagnóstico precoce da doença poderia permitir a eficácia de tal tratamento, como demonstrado no modelo da tirosinemia hereditária humana do tipo I.

O camundongo, cujo gene que codifica a fumaril-aceto-acetato-hidrolase foi inativado, é o modelo animal da tirosinemia hereditária humana do tipo I. Esta doença de transmissão recessiva autossômica se caracteriza nos recém-nascidos de duas maneiras: por uma insuficiência hepatocelular aguda rapidamente mortal durante os primeiros meses de vida, ou por uma cirrose freqüentemente associada a um raquitismo, na segunda metade do primeiro ano de vida, a qual expõe a um risco elevado de carcinoma hepatocelular. A enzima deficiente, a fumaril-aceto-acetato hidrolase, está presente principalmente no fígado e nos rins (Bernard et al., 1988). Utilizando o modelo do camundongo mutado para o gene da fumaril-aceto-acetato hidrolase, Overturf et al. (Overturf et al., 1996) demonstraram uma vantagem seletiva *in vivo* dos hepatócitos que expressavam a fumaril-aceto-acetato hidrolase (hepatócitos normais) em relação aos hepatócitos deficientes. De fato, a ausência da atividade da fumaril-aceto-acetato hidrolase acarreta o acúmulo de metabólitos tóxicos para os hepatócitos, o que explica a estimulação permanente da regeneração hepatocitária. Durante esta estimulação, os hepatócitos normais têm uma vantagem seletiva em relação aos hepatócitos deficientes em fumaril-aceto-acetato hidrolase. Após o transplante no baço do camundongo mutado, os hepatócitos normais foram capazes de repovoar mais de 80% do fígado de origem. O número mínimo de hepatócitos normais necessários para repovoar mais de 50% do fígado mutado foi de somente 1000. Neste mesmo trabalho, Overturf et al. também mostraram que os hepatócitos deficientes transduzidos *in situ* por vetores retrovirais codificando o gene da fumaril-aceto-acetato hidrolase humana tinham uma vantagem seletiva em relação aos hepatócitos deficientes não transduzidos. Dois meses após a injeção dos vetores retrovirais na veia porta, a seleção *in vivo* tinha induzido uma repopulação de mais de 90% do fígado, com expressão da fumaril-aceto-acetato hidrolase normal (Overturf et al., 1996).

O princípio da seleção *in vivo* no modelo experimental da tirosinemia hereditária do tipo I foi baseada na (i) vantagem de crescimento dos hepatócitos normais em relação aos hepatócitos deficientes da enzima, (ii) regeneração hepática permanente ligada ao acúmulo de metabólitos tóxicos para os hepatócitos deficientes da enzima, mas não para os hepatócitos normais.

A mesma equipe (Overturf et al., 1998) também mostrou que os hepatócitos isolados do fígado do camundongo mutado para o gene da fumaril-aceto-acetato hidrolase podiam ser transduzidos por vetores retrovirais contendo o gene da fumaril-aceto-acetato hidrolase, em cultura celular. Após injeção no baço, os hepatócitos transduzidos migravam para o fígado e possuíam também uma vantagem seletiva em relação aos hepatócitos deficitários da enzima, sendo capazes de repovoar mais de 85% do fígado. O princípio da repopulação do fígado pela vantagem seletiva pode ser aplicado a outros modelos animais de doenças metabólicas e, pelo menos em teoria, em uma possível aplicação clínica nas doenças metabólicas letais por lesão direta do fígado.

2.2. Doenças metabólicas expondo a complicações extra-hepáticas

Um segundo grupo é caracterizado por manifestações extra-hepáticas graves, ameaçando por vezes o prognóstico vital, porém sem manifestações hepáticas associadas (Tabela 2). Nesse segundo grupo de doenças metabólicas, devido a um déficit monogênico, cuja base molecular é bem conhecida e uma correção, mesmo que parcial do déficit enzimático, poderia melhorar a expressão fenotípica da doença, a transferência de um gene no fígado poderia representar uma alternativa terapêutica, em particular ao transplante hepático, para tratar geneticamente as manifestações clínicas destas doenças metabólicas (Ledley, 1990; Horwich, 1991; Ledley, 1993; Davern & Scharschmidt, 1998). Dentre estas doenças, existem as formas hereditárias de hiperbilirrubinemias: são as síndromes de Crigler-Najjar tipo I e II, e a síndrome de

Gilbert. Especialmente a síndrome de Crigler-Najjar tipo I possui modelo experimental: o rato Gunn (Gunn, 1938).

2.2.1. Síndrome de Crigler-Najjar

a) Descrição

A síndrome de Crigler-Najjar (CNS) é caracterizada por hiperbilirrubinemia não conjugada desde o nascimento (Crigler & Najjar, 1952). A síndrome de Crigler Najjar do tipo I resulta de deficiência completa da enzima bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase (B-UDPGT1A1). Por outro lado, a síndrome de Crigler-Najjar do tipo II, caracteriza-se por uma deficiência parcial da enzima (Seppen et al., 1994). Essas síndromes são causadas por lesões genéticas em qualquer um dos 5 éxons ou em outras regiões do gene. A frequência gênica para a síndrome de Crigler-Najjar do tipo I é estimada em 1:1000. A real incidência da síndrome de Crigler-Najjar no mundo é desconhecida. (Kadacol et al., 2001).

O defeito genético que causou a síndrome de Crigler-Najjar tipo I foi identificado em 1992 (Bosma et al., 1992; Ritter et al., 1992). Posteriormente, as mutações para a síndrome de Crigler-Najjar tipo II foram também identificadas (Bosma et al., 1993). Desde então, mais de 35 mutações diferentes têm sido identificadas na síndrome de Crigler-Najjar tipo I e 18 na tipo II (Kadacol et al., 2001). A herança da síndrome de Crigler-Najjar tipo I e II é do tipo autossômica recessiva. A análise genética dos pacientes portadores da síndrome de Crigler-Najjar tipo I mostra a presença de um códon *stop* ou uma deleção em seqüências codificadoras do gene UDPGT1.

b) Sinais clínicos e tratamento

Anteriormente ao uso da fototerapia, a síndrome de Crigler-Najjar tipo I era letal, e a mortalidade acontecia entre um e dois anos de idade. Em pacientes portadores da síndrome de Crigler-Najjar tipo I, os valores séricos de bilirrubina excedem 350 μM e na bile pode-se encontrar apenas traços de bilirrubina conjugada (Sinaasappel & Jansen, 1991).

A toxicidade da bilirrubina ao sistema nervoso central depende da interação complexa de vários fatores: níveis séricos de bilirrubina e albumina, capacidade de ligação da bilirrubina à albumina, capacidade de penetração da bilirrubina no cérebro e vulnerabilidade das células cerebrais aos efeitos tóxicos da bilirrubina. A hiperbilirrubinemia pode causar um amplo espectro de disfunção neurológica, desde a encefalopatia transitória até a instalação do *kernicterus*, com seqüelas clínicas permanentes, sendo estas, uma séria complicação da síndrome de Crigler-Najjar tipo I e II. O *kernicterus* caracteriza-se por necrose dos núcleos do tronco encefálico, que se manifesta clinicamente por alterações sensoriais, do tônus muscular (com hipo e hipertonia), alterações visuais e auditivas. Em sua forma mais séria, a encefalopatia conduz a retardo mental, oculomotor, e ataxia. Anormalidades cerebelares podem aparecer como sintomas clínicos iniciais do *kernicterus* em crianças (Labrune et al., 1992). Em pacientes com síndrome de Crigler-Najjar tipo I, o *kernicterus* não está confinado a pacientes muito jovens. Normalmente, o *kernicterus* surge na idade adulta, quando a fototerapia é descontinuada (Tabarki et al., 2002).

A discriminação entre os pacientes portadores da síndrome de Crigler-Najjar tipo I e tipo II, pode ser observada pela medida dos pigmentos biliares após o tratamento com fenobarbital. Após a administração de fenobarbital em pacientes com síndrome de Crigler-Najjar tipo I, o nível de bilirrubina sérica não diminui e a bilirrubina não conjugada predomina na bile. Em pacientes com a síndrome de Crigler-Najjar tipo II, a bilirrubina sérica não ultrapassa 350 μM , e pode ser diminuída com tratamento utilizando o fenobarbital, atingindo uma diminuição de até 25% da

bilirrubina sérica. A bile desses pacientes contém monoconjugados de bilirrubina e traços de diconjugados. O tratamento com fenobarbital em pacientes com síndrome de Crigler-Najjar tipo II pode aumentar a atividade residual da enzima B-UDPGT1A1 resultando no aumento da produção de glucuronídeos. O mecanismo através do qual o fenobarbital regula a expressão da B-UDPGT1A1 ainda não é completamente conhecido. Foi sugerido que a diminuição do nível de bilirrubina sérica após o tratamento com fenobarbital é causada pela mobilização da bilirrubina para o fígado. Isto é provavelmente causado pela indução de uma proteína citosólica, a ligandina, que resulta no aumento do transporte da bilirrubina na bile (Iyanagi et al., 1998).

O tratamento para a síndrome de Crigler-Najjar tipo I consiste em transfusões sanguíneas logo após o nascimento seguido de fototerapia diária por 10-12 horas. A bilirrubina absorve luz de comprimentos de onda entre 400 e 500 nanômetros predominantes no espectro azul. A luz contida pela fototerapia penetra na epiderme e atinge o tecido subcutâneo, possibilitando a transformação da bilirrubina. Durante a fototerapia, a bilirrubina não conjugada é convertida em fotoisômeros de bilirrubina, transformando-a em produtos hidrossolúveis, os quais podem ser secretados na bile. Uma vez no intestino, alguns destes fotoisômeros podem se transformar novamente em bilirrubina, sendo necessária a administração de fosfato de cálcio, o qual provoca a precipitação da bilirrubina, evitando sua reabsorção pela parede intestinal (Van der Veere et al., 1997). As metaloporfirinas, tais como a tin-protoporfirina ou zinco-mesoporfirina, que atuam como inibidores da heme-oxigenase, impedindo ou limitando a produção de bilirrubina, podem também ser administradas quando os níveis de bilirrubina permanecem elevados. Entretanto, a tin-protoporfirina aumenta a sensibilidade cutânea à fototerapia (Jansen, 1999).

Embora a fototerapia reduza com sucesso os níveis de bilirrubina, os pacientes correm o risco de desenvolver o *kernicterus* na puberdade, quando a fototerapia torna-se menos eficaz. Nestes casos, a necessidade diária de fototerapia frequentemente atinge 14 a 16 horas. O transplante de fígado continua sendo o único tratamento que pode levar à cura da doença (Fox et al., 1998; Lake, 1998; Jansen, 1999; Schauer et al.,

2003). Entretanto, com a *(i)* descoberta das bases moleculares da icterícia hereditária e, *(ii)* dos avanços nas técnicas de transplante de hepatócitos e de *(iii)* transferência gênica no fígado, a terapia gênica para a doença de Crigler-Najjar tipo I pode se tornar realidade.

2.2.2. Síndrome de Gilbert

A síndrome de Gilbert é caracterizada por hiperbilirrubinemia não conjugada que se apresenta de forma branda, crônica e não ocasiona hemólise. A atividade da enzima B-UDPGT1A1 está reduzida a aproximadamente 50% do normal. A síndrome de Gilbert afeta entre 3-10% da população. Homens são mais afetados que mulheres (12,4 e 4,8% respectivamente). A síndrome de Gilbert é freqüentemente diagnosticada na faixa etária de 15-30 anos, sendo uma síndrome benigna, sem necessidade de tratamento (Radu & Atsmon, 2001).

Para efeito recapitulativo, as características das síndromes de Crigler-Najjar tipo I e II e da síndrome de Gilbert estão apresentadas na tabela 3 (Watcho et al., 2002).

TABELA 3. Erros inatos da expressão da bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase

Característica	Síndrome de Crigler-Najjar tipo I	Síndrome de Crigler-Najjar tipo II	Síndrome de Gilbert
Herança	AR	AR	AD ou AR
Atividade B-UDPGT1A1	Ausente	< 10 %	50 %
Mutação Genética	<i>Nonsense</i> ou <i>codon stop</i>	<i>Missense</i>	Variável
Hiperbilirrubinemia	> 340 μ M	85-255 μ M	30-40 μ M
<i>Kernicterus</i>	Alto risco	Baixo risco	Risco ausente

AR: autossômica recessiva; AD: autossômica dominante

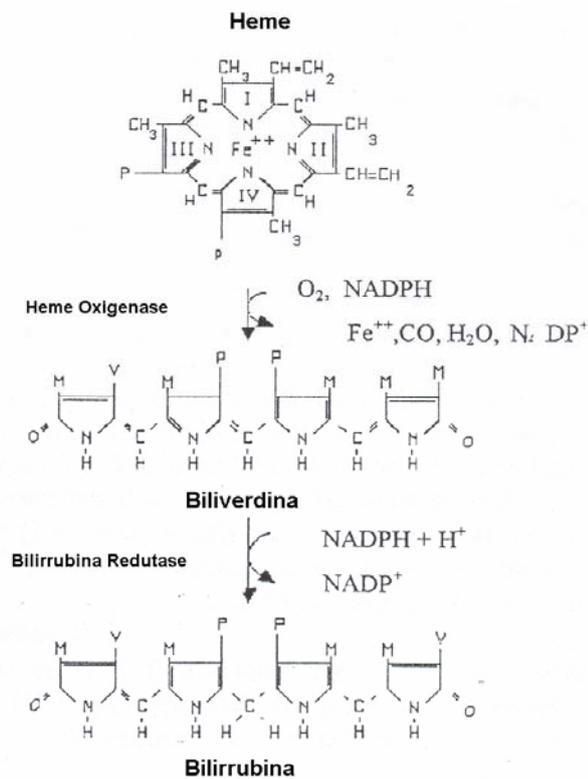
2.3. Metabolismo da bilirrubina

A bilirrubina ($C_{33}H_{36}NaO_6$) é o produto oxidativo da porção protoporfirina do grupamento heme de proteínas, tais como a hemoglobina, mioglobina e citocromo P-450. Um indivíduo com metabolismo normal produz cerca de 250-400 mg/dia de bilirrubina, através da degradação dessas hemoproteínas no sistema reticuloendotelial, principalmente no baço e medula óssea.

O primeiro passo na degradação do grupo heme é a clivagem da ponte α -metano para formar a biliverdina IX $_{\alpha}$. Esta reação é catalisada pela enzima microsomal heme oxigenase I. A ponte do metano central da biliverdina é reduzida pela NADPH-biliverdina redutase, enzima citosólica, para então formar a bilirrubina. A introdução do CH₂ no C-10 da molécula de bilirrubina induz uma mudança conformacional. Esta conformação da bilirrubina é hidrofóbica e possui uma alta afinidade pelos tecidos do sistema nervoso central (Iyanagi et al., 1998) (Figura 11).

A bilirrubina é ânion orgânico com baixa solubilidade em água, que não pode ser excretado em sua forma nativa. A bilirrubina liberada para a corrente sanguínea liga-se principalmente à albumina, pela qual tem alta afinidade. A bilirrubina assim formada é chamada bilirrubina não conjugada ou indireta. Existe também em proporção muito menor, em forma não ligada à albumina, a chamada bilirrubina-livre (Radu & Atsmon, 2001).

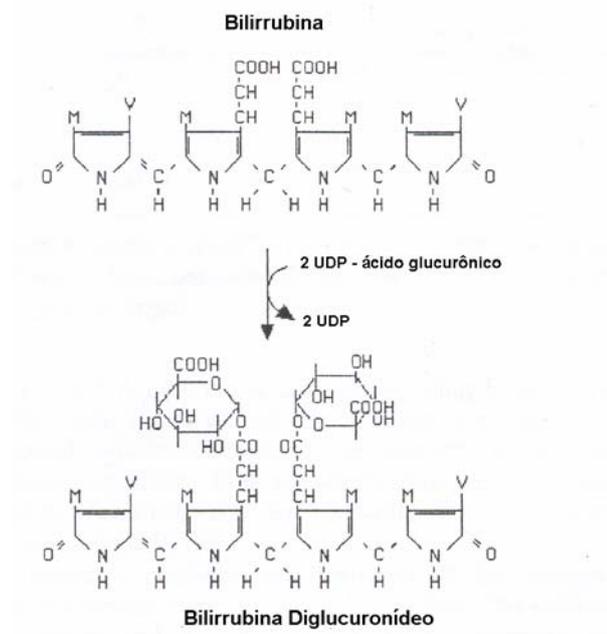
FIGURA 11. Metabolismo da bilirrubina



2.4. Captação e conjugação da bilirrubina

Ligada à albumina, a bilirrubina não conjugada é transportada ao fígado onde é conjugada no hepatócito. A captação é regida principalmente pela proteína ligandina que transportará a bilirrubina até o retículo endoplasmático do hepatócito, onde se dará a conjugação. Este processo é catalizado pela enzima bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase (B-UDPGT1A1). No fígado, o ácido glucurônico se liga à bilirrubina, promovendo a esterificação do grupo carboxil do ácido propiônico da molécula. Esta reação é estabilizada através da ligação com o sítio ativo da B-UDPGT1A1. Os glucuronídeos de bilirrubina (mono e diglucuronídeos de bilirrubina) assim formados tornam-se solúveis em água (conjugados polares) e são então excretados na bile via transportador ATP-dependente. Este tipo de bilirrubina é denominado bilirrubina conjugada ou direta (Radu & Atsmon, 2001) (Figura 12). Ela é excretada para dentro do intestino através dos canais biliares e reduzida pela ação de bactérias intestinais em urobilinogênio. Cerca de 80% do urobilinogênio é excretado nas fezes, onde é oxidado, dando origem a um pigmento corado, a urobilina. Os restantes 20% são reabsorvidos no intestino (circulação entero-hepática) e levados ao fígado, onde parte é novamente excretada e parte é transformada em bilirrubina. Uma pequena quantidade de urobilinogênio reabsorvida escapa do processo hepático, sendo excretada pela urina (Kalil et al., 2001).

FIGURA 12. Conjugação da bilirrubina



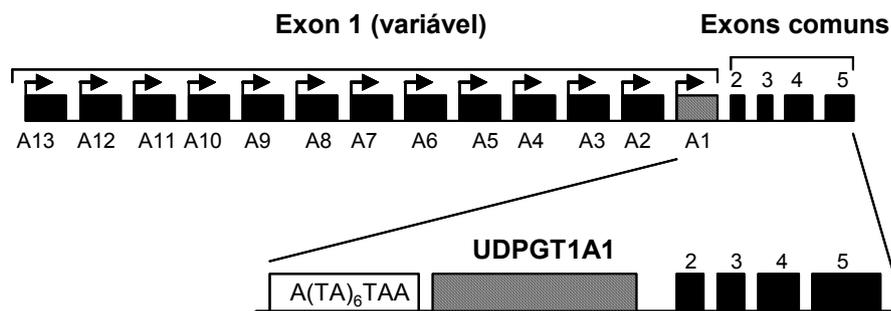
Radu & Atsmon, 2001

2.5. Caracterização molecular da enzima uridina-difosfato-glucuronil transferase (UDPGT)

A conjugação com o ácido glucurônico é responsável pela eliminação de xenobióticos e componentes endógenos em humanos e outras espécies de mamíferos (Miners et al., 2002). A enzima uridina-difosfato-glucuronil transferase constitui duas famílias separadas: UDPGT1 e UDPGT2. A família UDPGT1 cataliza a glucuronidação da bilirrubina, xenobióticos (fenóis, antraquinonas e flavonas), estrióis e estradióis. A família UDPGT2 participa da glucuronidação de esteróides como drogas, incluindo a morfina. O gene que codifica a enzima UDPGT1 está localizado no cromossomo 2, em 2q37, e é composto de quatro éxons comuns e 13 éxons variáveis. A isoforma 1A1 é codificada pelo éxon 1A1 e os éxons 2 a 5 (Bosma et al., 1994) (Figura 13). Embora a família UDPGT1 contenha várias isoformas,

somente a isoforma B-UDPGT1A1 (bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase) participa da conjugação da bilirrubina. O DNAc da isoforma B-UDPGT1A1 codifica uma proteína de 52 kDa (Bosma et al., 1994).

FIGURA 13. Estrutura genômica do complexo UDPGT1 humano



Kaplan et al., 2003

2.6. Rato Gunn

Em 1938 Gunn descreveu uma linhagem mutante de ratos Wistar com hiperbilirrubinemia hereditária (Gunn, 1938). O rato Gunn é o modelo animal da síndrome de Crigler-Najjar tipo I, e tem fornecido valiosa informação sobre o metabolismo da bilirrubina e sua toxicidade, tratamento da hiperbilirrubinemia e mecanismos moleculares da icterícia hereditária. A UDPGT do rato Gunn não possui atividade hepática para a bilirrubina, substratos fenólicos induzidos pela 3-metilcolantreno, e digitoxigenina-monodigitoxídeo; enquanto que a atividade da UDPGT é normal para outros substratos incluindo esteróides, cloranfenicol e morfina (Roy-Chowdhury et al., 1991). Estes dados sugeriram que várias isoformas específicas de UDPGT estão deficientes no rato Gunn. O DNAc da isoforma UDPGT designada 4-nitrofenol UDPGT (4NP-UDPGT) foi isolado e seqüenciado de ratos Wistar e ratos Gunn homocigotos (Iyanagi et al., 1989). Análises da seqüência do DNAc do rato

Gunn revelou uma deleção de um único nucleotídeo na região codificadora, resultando na síntese de uma proteína truncada. Posteriormente, usando a seqüência do mutante 4NP-UDPGT como sonda, três novos DNAs foram isolados (Iyanagi et al., 1989; Iyanagi, 1991). Estas seqüências compartilham uma seqüência RNA na posição 3'-terminal, e possuem uma deleção de um único nucleotídeo na mesma posição do DNA do mutante 4NP-UDPGT. Entre as isoenzimas hepáticas UDPGT1 no rato, a enzima codificada pela UDPGT1A1 é a responsável pelo metabolismo da bilirrubina (Iyanagi et al., 1998). O DNA que codifica a enzima UDPGT1A1 possui uma extensão de 1763 bp, sendo que 913 bp (correspondendo à região carboxi-terminal de 247 aminoácidos) são compartilhados com as regiões do DNA 4NP-UDPGT e 3-metilcolantreno (Sato et al., 1990). A deleção responsável pela região carboxi-terminal truncada de todos os membros da família de genes UDPGT1 do rato Gunn foi identificada no éxon 3 (posição 1239) (Roy-Chowdhury et al., 1991). O loco UDPGT1 está localizado na região cromossômica 9q35→q36 (Nagai et al., 1995).

Estes resultados confirmaram que essas isoformas originam-se de um mutante UDPGT comum, o qual possui a região carboxi terminal truncada de 116 aminoácidos (Iyanagi, 1991; Roy-Chowdhury et al., 1991). Essa mutação origina uma proteína truncada de 43 kDa encontrada no fígado do rato Gunn. A proteína truncada nos hepatócitos do rato Gunn homozigoto é sintetizada da mesma maneira que a proteína B-UDPGT1A1 nos ratos Wistar normais. Entretanto, a proteína B-UDPGT1A1 truncada é degradada rapidamente com uma meia vida de 50 minutos, enquanto que a proteína selvagem tem uma meia vida de aproximadamente dez horas (Emi et al., 2002).

A icterícia neonatal no rato Gunn homozigoto já começa a ser observada nas primeiras seis horas após o nascimento e permanece durante a vida toda. A coloração amarelada da pele de ratos Gunn homozigotos recém-nascidos com dois dias de idade é mostrada na figura 14. A bilirrubinemia no rato adulto é superior à 60 µM, podendo atingir valores de 150 µM.

A hipoplasia cerebelar é a mais proeminente anormalidade observada no rato Gunn homozigoto e as células de Purkinje são as mais afetadas. A degeneração neural no rato Gunn é primeiramente caracterizada pela formação de vacúolos e inclusões citoplasmáticas nas células de Purkinje (Conlee & Shapiro, 1997). As regiões mais gravemente afetadas do cerebello são os lobos anteriores, sendo que os lobos posteriores são mais resistentes à toxicidade causada pela bilirrubina. Estas diferenças na susceptibilidade estão relacionadas aos vários graus de maturação das células de Purkinje durante a exposição à bilirrubina (Keino et al., 1985).

FIGURA 14. Ratos Gunn recém-nascidos com dois dias de idade



Homozigoto

Heterozigoto

Homozigoto

2.7. Transferência gênica no rato Gunn

Os primeiros experimentos realizados no rato Gunn utilizaram vetores retrovirais contendo o gene que codifica a proteína B-UDPGT1A1 humana (RV-hB-UDPGT1A1). Os vetores retrovirais eram perfundidos no fígado através da técnica de fígado isolado-perfundido 24 horas após hepatectomia parcial. A correção da hiperbilirrubinemia foi parcial (em torno de 40-50%) e somente em um pequeno número de ratos houve expressão da B-UDPGT1A1 humana por mais de um ano (Branchereau et al., 1993; Tada et al., 1998). Hepatócitos transduzidos *in vivo* pela circulação sistêmica expressaram a proteína B-UDPGT1A1 humana por um curto período de tempo: após três semanas, anticorpos anti-hB-UDPGT1A1 foram detectados no soro dos ratos, indicando uma resposta imune específica. (Aubert et al., 2002).

Vetores adenovirais co-expressando a B-UDPGT1A1 humana e CTLA-4Ig (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; CD152*) (Ad-hB-UDPGT1A1-CTLA4-Ig) também foram utilizados, a fim de evitar a resposta imune contra as proteínas adenovirais. Uma vez que os vetores adenovirais não se integram no genoma celular, fazem-se necessárias administrações repetidas do vetor. Somente os ratos que receberam o vetor Ad-hB-UGT1A1-CTLA4-Ig puderam manter seus níveis de bilirrubina sérica normalizados (Thummala et al., 2002).

Vetores AAV também foram testados no rato Gunn, embora sendo possível transduzir somente 5% dos hepatócitos por infusão intraportal (Nakai et al., 2001).

Outras estratégias foram utilizadas para corrigir a bilirrubinemia no rato Gunn. A transdução de outras células não-hepáticas (os fibroblastos) com RV-hB-UDPGT1A1 foi capaz de conjugar a bilirrubina no meio de cultura. Posteriormente esses fibroblastos foram transplantados no peritônio de ratos Gunn. A hiperbilirrubinemia foi corrigida, em função do número de fibroblastos transplantados. Entretanto, devido ao tempo prolongado de cultura celular, os fibroblastos

transplantados foram transformados, e os ratos desenvolveram tumores após o transplante (Seppen et al., 1997).

O transplante de hepatócitos singênicos geneticamente modificados *in vitro*, por RV-hB-UDPGT1A1 no rato Gunn, foi capaz de reduzir a hiperbilirrubinemia entre 27 e 52%, 42 após o transplante, permanecendo estável até o final do estudo (120 dias) (Tada et al., 1998a).

Dentro do contexto, hepatócitos normais foram transplantados no fígado deficiente, previamente hepatectomizado e irradiado (50 Grays). Esses hepatócitos poderiam proliferar preferencialmente em resposta ao estímulo mitótico desencadeado pela hepatectomia parcial. A vantagem desta abordagem foi a repopulação massiva do fígado pelos hepatócitos transplantados (vantagem seletiva), resultando em uma correção completa da deficiência metabólica por um período de 28 semanas (Guha et al., 2002).

A correção da alteração genética no fígado do rato Gunn foi realizada pela substituição do resíduo guanina, usando um oligonucleotídeo quimérico RNA/DNA, o qual se alinha à seqüência alvo no genoma. Após a administração intravenosa do oligonucleotídeo quimérico, as lesões genéticas foram corrigidas entre 1 a 10% dos alelos, resultando no aparecimento da atividade enzimática no fígado. A redução dos níveis plasmáticos de bilirrubina foi de 35 a 40% (Kren et al., 1999).

Uma correção parcial da hiperbilirrubinemia no rato Gunn foi obtida através da transferência gênica *in utero*, mediada por vetor lentiviral (HIV-1), contendo o gene *hB-UDPGT1A1*. Os fetos foram transduzidos 19 dias após a fecundação. A bilirrubina sérica diminuiu em 45%, quando comparada com controles; glucuronídeos de bilirrubina estavam presentes na bile e a proteína hB-UDPGT1A1 detectada nos tecidos. A bilirrubina sérica se manteve estável por um período de um ano (Seppen et al., 2003).

O experimento mais recente realizado no rato Gunn utilizou vetor adenoviral do tipo “*gutless*”. Esse vetor adenoviral é desprovido de todas as seqüências

codificadoras virais, não induzindo resposta imune. Neste trabalho houve correção completa do fenótipo durante um período superior à 12 meses. É importante notar que a expressão a longo prazo do transgene pode ser explicada pelo fato de que os hepatócitos se dividem raramente (vida média de 200-400 dias) fazendo com que o transgene permaneça no hepatócito em caráter episomal (Toietta et al., 2005).

3. Regeneração hepática

O fígado adulto normal é um órgão que possui uma atividade replicativa mínima. O hepatócito adulto é uma célula tipicamente quiescente em um fígado normal, com uma duração de vida de 200 a 400 dias (MacDonald, 1961). Em um fígado normal existe 0,2 a 0,5% de hepatócitos em fase de síntese de DNA (Jezequel et al., 1991), ou seja, 1 mitose para 20.000 hepatócitos (Steer, 1995).

Entretanto, o fígado é um órgão que pode, quase que imediatamente, iniciar o processo de regeneração em resposta a uma perda celular causada por lesão tóxica, física ou infecciosa. A regeneração sendo definida como a capacidade de um órgão substituir a massa tissular perdida após ressecção, por exemplo. Outros órgãos podem ser sítio de um crescimento compensatório após uma lesão, mas trata-se mais de uma hipertrofia do que de um aumento do número de células. O fígado é o único órgão a poder desenvolver uma hiperplasia compensatória seguido a uma perda de massa celular de maneira a reconstituir o número de células hepáticas e restabelecer a massa ideal em relação ao peso do corpo (Columbano & Shinozuka, 1996). Por definição estrita, não se trata de uma verdadeira regeneração tal qual possuem alguns anfíbios, cuja cauda perdida pode se reconstituir *ad integrum* (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Após uma hepatectomia parcial, os lobos ressecados não crescem de novo mas constata-se uma hiperplasia dos lobos residuais para se restabelecer a massa celular ideal em relação ao peso do corpo.

O modelo experimental mais utilizado para estudar a regeneração hepática no rato é a hepatectomia parcial descrita em 1931 por Higgins e Anderson (Higgins & Anderson, 1931). Neste modelo clássico, uma hepatectomia parcial de 2/3 é realizada. Os pedículos vasculares dos lobos médio e lateral esquerdo são ligados, e estes dois lobos são ressecados, sem traumatismo para os lobos residuais. Não existe interferência com a vascularização dos lobos residuais nem reação inflamatória necrótica significativa, como nos modelos tóxicos empregando, por exemplo, o

tetracloro de carbono. O início da indução da regeneração hepática é precisamente definido, isto é, na ressecção dos lobos. É o modelo da indução da regeneração hepática mais utilizado. A regeneração após hepatectomia parcial é devido à proliferação da população de células que compõem o órgão. As células que proliferam são: (i) hepatócitos, (ii) células epiteliais biliares, (iii) células endoteliais, (iv) células de Kupffer e (v) células de Ito ou células estelares perissinusoidais situadas no espaço de Disse. Aproximadamente 7 a 10 dias após a hepatectomia parcial no rato, o fígado recupera sua massa normal.

Vários estudos procuraram compreender o mecanismo de restauração da massa hepática após lesão parcial, assim como a renovação hepatocitária em um fígado quiescente normal. Estes estudos foram realizados com a ajuda de marcadores de atividade replicativa nas células hepáticas, mais precisamente da fase S do ciclo celular (fase de síntese de DNA). Os marcadores da fase S mais utilizados são os análogos da timidina: a timidina triciada (3^*H -timidina) (Bucher et al., 1964) e bromodeoxiuridina (BrdU) (Gratzner et al., 1975; Gratzner, 1982; Gonchoroff et al., 1985; Gonchoroff et al., 1986; Dolbeare, 1995; Dolbeare, 1995a; Dolbeare, 1996).

Durante a fase S do ciclo celular do hepatócito, estes produtos são incorporados por competição ao DNA da célula no lugar da timidina. Utilizando-se a auto-radiografia ou anticorpos anti-BrdU, métodos radiológicos ou imunohistoquímicos permitem a detecção da 3^*H -timidina ou do BrdU incorporados ao DNA da célula, respectivamente.

O número de células em fase S em um fígado quiescente normal de rato foi previamente estudado utilizando-se como marcadores a 3^*H -timidina e o BrdU incorporado pelas células hepáticas. Os dados quantitativos mostraram que a taxa de renovação hepatocitária do fígado normal em ausência de toda estimulação é fraca, com uma porcentagem em torno de $0,45 \pm 0,05\%$ de núcleos de hepatócitos marcados. O estudo da distribuição lobular destes hepatócitos marcados mostrou que 82,7% estavam localizados na zona 1. A zona 2 continha 15,4% e a zona 3 somente 1,9% de hepatócitos marcados (Jezequel et al., 1991). As zonas 1, 2 e 3 correspondem

respectivamente às regiões periportal, mediolobular e centrolobular do ácino descrito por Rappaport. A porcentagem de marcação de células ductulares foi de $0,08 \pm 0,12\%$ e das células endoteliais sinusoidais foi de $0,76 \pm 0,53\%$. Os hepatócitos em mitose eram extremamente raros: $0,06 \pm 0,06\%$ (Grisham, 1962).

Após indução da regeneração hepática por hepatectomia parcial, existem poucos hepatócitos sintetizando DNA até 12 horas. A porcentagem da marcação aumenta então rapidamente até atingir o pico da fase S do ciclo celular do hepatócito, 24 horas após a hepatectomia parcial, momento em que 35% dos hepatócitos estão ativamente sintetizando o seu DNA (Grisham, 1962; Fabrikant, 1968; Rabes et al., 1976). As figuras de mitose nos hepatócitos aumentam rapidamente até 5% 33 horas após a hepatectomia parcial. Durante o pico de síntese de DNA, 75% dos hepatócitos localizam-se na região periportal, 20% na região mediolobular e 5% na região centrolobular. Estes dados sugerem que durante a regeneração hepática induzida por hepatectomia parcial, a maioria dos hepatócitos localizados nas regiões periportal e mediolobular entram em fase S e se dividem mais de uma vez. Entretanto, existem hepatócitos na região centrolobular que não se dividem.

A proliferação hepatocelular induzida por hepatectomia parcial não é um processo sincrônico no rato (Rabes et al., 1976). A proliferação começa na região periportal e progride em seguida em direção à região centrolobular. O pico de síntese de DNA pelo hepatócito se situa 24 horas após a hepatectomia parcial e um segundo pico menos intenso se situa entre 36 e 48 horas após hepatectomia parcial.

Como somente 2/3 da massa hepática são ressecados, a restauração do número original de hepatócitos é, em teoria, obtido com 1,66 ciclos celulares por hepatócito residual. A maioria dos hepatócitos (95% no rato jovem e 75% no rato velho) nos lobos residuais participam em um ou dois ciclos de proliferação celular (Michalopoulos & DeFrances, 1997). A duração da fase de síntese de DNA é de aproximadamente 8 horas e a mitose de aproximadamente 1 hora.

Vinte e quatro horas após o pico da fase S do ciclo celular do hepatócito, as outras células hepáticas sintetizam o seu DNA. Segundo a cinética de síntese de DNA

por estas diferentes células, elas também poderiam ser transduzidas por vetores retrovirais. Como exemplo, citemos a célula epitelial biliar, a qual sintetiza o seu DNA 48 horas após a hepatectomia parcial. A célula epitelial biliar poderia ser transduzida com um vetor retroviral portando o gene *cfr* (*cystic fibrosis conductance transmembrane regulator*) em pacientes portadores de mucoviscidose (Yang et al., 1993; Cabrera et al., 1996).

Por outro lado, em um fígado deficitário, a hepatectomia poderá ser, ao menos em teoria, um real limite para a transferência de gene. A ressecção da massa hepática poderá desequilibrar a homeostasia precariamente mantida por este fígado deficitário. A exploração das propriedades mitogênicas dos fatores de crescimento no fígado poderia oferecer uma alternativa para induzir a proliferação celular hepática *in vivo*, sem ter que recorrer à realização de uma hepatectomia parcial prévia. Assim, este método poderia ser utilizado para melhorar a transferência de gene *in vivo* no fígado por vetores retrovirais.

Um número importante de fatores de crescimento podem estimular a síntese de DNA dos hepatócitos em cultura primária. Entre eles: o HGF (*hepatocyte growth factor*), o TGF- α (*transforming growth factor- α*) e, o EGF (*epidermal growth factor*) possuem um papel importante na regeneração *in vivo*. Estes fatores são considerados como mitógenos hepatocitários completos (Michalopoulos et al., 1990), o que significa que eles podem estimular a síntese de DNA nos hepatócitos mantidos em cultura, na ausência de todo outro fator de crescimento.

4. Imunologia

Existem três tipos celulares principais envolvidos ativamente no sistema imunitário: os linfócitos T, os linfócitos B e os fagócitos. Os linfócitos têm um papel predominante na defesa imune específica, enquanto que os fagócitos estão envolvidos na defesas inata. Todas as células do sistema imune originam-se das células tronco-hematopoiéticas. A maturação dos linfócitos T acontece no timo, enquanto a dos linfócitos B se realiza na medula óssea. Distingue-se dois tipos de linfócitos T: os $CD4^+$ e os $CD8^+$. Os $CD4^+$ possuem a função de ativar os outros linfócitos, secretando proteínas solúveis chamadas citocinas, e são chamados T_H (linfócitos T $CD4^+$ “*helper*”). Os $CD8^+$ têm uma atividade citolítica (resposta citotóxica) e eliminam as células estrangeiras ou células infectadas por um vírus ou um parasita intracelular. Os linfócitos B secretam anticorpos, também chamadas de imunoglobulinas (resposta humoral), os quais são específicos aos antígenos presentes no indivíduo, podendo também captar proteínas solúveis circulantes para ativar uma resposta imune.

Dentro da linhagem mielóide, os macrófagos e as células dendríticas possuem uma função acessória à resposta imune. Essas células, chamadas fagócitos ou células apresentadoras de antígenos (CAA), ingerem os antígenos para apresentá-los aos linfócitos, para posteriormente, a resposta imune ser gerada.

O sistema imune possui, assim, várias características que aumentam sua eficácia. A especificidade de reconhecimento dos antígenos discriminam entre os antígenos “próprios” e os “não-próprios”. Os linfócitos estimulados possuem uma “memória” que permite a eles, responder rapidamente ao encontro do mesmo antígeno (Delves & Roitt, 2000).

4.1. Mecanismos da resposta imune

4.1.1. Reconhecimento dos antígenos pelos linfócitos

A apresentação dos antígenos pelas CAA fornece as moléculas de ativação necessárias aos linfócitos. As proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) apresentam os peptídeos, e todo esse complexo é reconhecido pelo receptor de células T (TCR). As proteínas do CPH são diferentes de um indivíduo a outro, com exceção dos indivíduos geneticamente idênticos. Os linfócitos circulantes são tolerantes a seus próprios CPH apresentando um peptídeo próprio, graças a um princípio de seleção. Um linfócito pode se ativar e acarretar uma resposta imune se uma proteína do CPH apresentar um peptídeo estranho, ou quando essa CAA possuir proteínas do CPH estrangeiras. Em compensação, os linfócitos B reconhecem antígenos diretamente através do receptor das células B.

As proteínas do CPH de classe I são expressas em todas as células somáticas, e o seu reconhecimento é restrito aos linfócitos $CD8^+$. Os peptídeos apresentados pelo CPH de classe I são endógenos, os quais são geralmente sintetizados no interior da célula, por exemplo, os antígenos virais. A distribuição das moléculas do CPH de classe II é mais limitada, estando restrita aos linfócitos B, às células dendríticas e às células do epitélio tímico. A função fagocitária das CAA, expressando o CPH de classe II, permite a apresentação de peptídeos exógenos (Côté et al., 2001).

4.1.2. A maturação linfocitária

Os órgãos linfóides são tecidos organizados contendo um grande número de linfócitos dentro de um contexto de células não-linfóides. Eles são divididos em:

órgãos linfóides primários ou centrais (timo e medula óssea) e secundários ou periféricos (baço, gânglios linfáticos, etc.). A maturação dos linfócitos é feita nos órgãos linfóides primários, enquanto que as respostas imunes específicas são iniciadas nos órgãos secundários. Uma vez terminada, os linfócitos entram na circulação sanguínea, e vão se alojar nos órgãos linfóides secundários (Delves & Roitt, 2000).

4.1.3. Princípio da seleção tímica

A grande diversidade de reconhecimento dos antígenos pelos TCR e anticorpos, permitem aos linfócitos T e B reagir contra a maioria dos patógenos encontrados ao longo da vida de um indivíduo. Em compensação essa grande diversidade de reconhecimento engloba a possibilidade de reagir também com os antígenos “próprios”. Conseqüentemente, o sistema imune elimina, por um princípio de seleção, os linfócitos que reagem contra os antígenos “próprios”. Os linfócitos selecionados positivamente asseguram a defesa contra os antígenos estranhos reconhecidos no contexto CPH, enquanto que a seleção negativa evita as reações auto-imunes.

Os linfócitos T imaturos migram da medula óssea para o timo. O timo é composto por vários lóbulos, divididos em uma região cortical externa (córtex tímico) e uma região interna (medula). Eles vão interagir com uma rede de células epiteliais no córtex tímico, o que permitirá a eles, a aquisição das diferentes moléculas de superfície específicas dos linfócitos T (CD25, CD44, c-kit, CD3, TCR, CD4, CD8). Em seguida, esses linfócitos sofrem um processo de seleção positiva, antes de migrar para a medula (Starr et al., 2003).

4.1.3.1. Seleção positiva

A seleção positiva permite a sobrevivência dos linfócitos T que possuem uma boa afinidade com os CPH de classe I e II expressos (apresentado por um peptídeo “próprio”) nas células epiteliais do córtex tímico. Assim, os linfócitos T interagem com os CPH I e II, pelo TCR e as moléculas CD8 e CD4, respectivamente. Os linfócitos que não se ligarão aos CPH, morrerão por apoptose. Uma melhor afinidade com o CPH I produzirá linfócitos T CD8⁺, enquanto uma melhor afinidade com o CPH II produzirá linfócitos CD4⁺. A grande maioria dos linfócitos (> 95%) não sobreviverá a esse processo de seleção positiva. Os linfócitos T assim selecionados positivamente, passarão em seguida para a medula, onde eles sofrerão o processo de seleção negativa.

4.1.3.2. Seleção negativa

As afinidades entre os TCR e os CPH podem variar de fraca à forte. A seleção negativa permite a discriminação entre as diferentes afinidades e, deste modo, elimina os timócitos que reagem fortemente às interações entre o CPH, os quais apresentam um peptídeo “próprio”. Esta seleção é importante para desenvolver uma tolerância ao “próprio”. A medula é composta de diferentes células, sendo as mais importantes, as células dendríticas e macrófagos derivados da medula óssea. Estas células expõem seus CPH de classe I e II e interagem com os timócitos. Os mecanismos precisos da seleção negativa não são ainda conhecidos, mas as células morrem por apoptose.

Uma vez essas duas seleções terminadas, os linfócitos T são de tamanho pequeno e em estado de repouso. Eles se encontrarão no sistema imune periférico e migrarão para os órgãos linfóides secundários, onde poderão efetuar seu papel de reconhecimento dos antígenos estranhos.

4.1.4. Ativação dos linfócitos T CD4⁺

A cooperação entre as células do sistema imune é essencial para o desenvolvimento de uma resposta adequada contra um antígeno. A ativação dos linfócitos T necessita da apresentação dos antígenos estranhos por uma CAA (macrófago, célula dendrítica ou linfócito B). O envolvimento de um TCR com CPH de classe II, apresentando um peptídeo imunogênico, consiste no primeiro sinal de ativação do linfócito CD4⁺. Este complexo formado CPH-CD4-TCR-CD3 gera um fraco sinal de ativação do linfócito. Esta ligação deve ser solidificada pela interação de moléculas de adesão: LFA-1, CD2 e ICAM-3 no linfócito T e ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 na CAA (Janeway et al., 2001). A ativação completa dos linfócitos necessita de um segundo sinal, denominado co-estimulação. As moléculas de co-estimulação melhores caracterizadas são: B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86). Os homodímeros B7 são encontrados na superfície das CAA. Seu receptor no linfócito T é o CD28. Quando um linfócito T em repouso se ativa, ele expressa então várias proteínas, as quais contribuem à manutenção do sinal de co-estimulação e permite a expansão e diferenciação desses linfócitos (Reiser & Staderker, 1996).

Uma molécula importante na homeostase linfocitária é o CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, CD152). O CTLA-4 se expressa tardiamente após a ativação, e se liga com uma atividade 20 vezes mais forte ao B7, que a ligação entre B7 e CD28. Esta ligação CTLA-4-B7 induz um sinal negativo ao linfócito, diminuindo sua proliferação.

Os linfócitos ativados sintetizam citocinas (α , IL-4 e IL-5) e entram em divisão celular. A liberação de IL-2 pelos linfócitos CD4⁺ pode também ativar os linfócitos CD8⁺. A liberação de IL-4 e IL-5 estimulam a ativação de linfócitos B, os quais reconhecem o antígeno estrangeiro, produzindo anticorpos.

A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ pode se produzir em duas direções: T_H1 e T_H2. A produção de células T_H1 conduz à imunidade celular, enquanto que a

produção de células T_H2 leva à imunidade humoral. As T_H1 secretam principalmente IFN- γ , IL-2, TNF- α e TNF- β ; enquanto que as células T_H2 liberam principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β .

4.1.5. Ativação dos linfócitos T $CD8^+$

Os linfócitos T $CD8^+$ são também chamados citotóxicos (linfócito T citotóxico, LTC), atribuído à sua função citolítica. A estimulação dos linfócitos $CD8^+$ requer, um sinal gerado pela ligação do CPH de classe I apresentando um peptídeo estranho, sinais de co-estimulação e um sinal gerado pela ligação da IL-2 a seu receptor. Quando um LTC ativado encontra uma célula apresentando um peptídeo estranho reconhecido por seu TCR, ele libera substâncias (perforinas e granzimas), para lisar e matar esta célula. Os LTC são eficazes para eliminar as células infectadas por vírus ou parasitas. Os LTC são também importantes na rejeição de transplantes alogênicos. A liberação de grânulos citolíticos pelos LTC é o meio mais empregado pelos LTC, mas dois outros mecanismos apoptóticos podem ser utilizados. Os LTC expressam Faz ligante (FasL), e o envolvimento Faz-FasL provoca a ativação de caspases, induzindo a apoptose da célula alvo. Um LTC secreta também determinadas citocinas: IFN- γ , TNF- α e TNF- β . O IFN- γ inibe diretamente a replicação viral, e ativa macrófagos.

4.1.6. Ativação dos linfócitos B

Os linfócitos B reconhecem os antígenos pelo seu receptor (RCB), o qual é constituído, entre outros, de uma imunoglobulina. As células B captam os antígenos circulantes, e não tem necessidade de apresentação de antígeno pelo CPH. A ativação dos linfócitos B pelos antígenos protéicos necessita da cooperação das células $CD4^+$.

Após a captação das proteínas solúveis pelo RCB, os linfócitos B internalizam esse complexo onde o antígeno será degradado e apresentado pelos CPH de classe II. As células T CD4⁺ reconhecem o peptídeo estranho, pelo seu TCR, recebem sinais de co-estimulação e secretam IL-4 e IL-5, que são necessárias à ativação completa dos linfócitos B. Os linfócitos B ativados se dividem rapidamente e se diferenciam em plasmócitos, células produtoras de anticorpos.

5. Transplante e tolerância imunológica

A tolerância é definida como a ausência de reatividade imune em relação a determinados antígenos estranhos, com a permanência da imunocompetência do indivíduo. A indução de tolerância permite o transplante de órgãos ou de células proveniente de um indivíduo diferente, sem o emprego de imunossupressores. Os imunossupressores permitem a sobrevida dos órgãos transplantados mas provocam efeitos indesejáveis importantes, os quais seriam evitados pela tolerância (Arnold, 2002)

5.1. Mecanismos envolvidos na rejeição do enxerto

No contexto do transplante de órgãos, a rejeição do enxerto é mediada principalmente por uma resposta imune celular (citotóxica) contra os antígenos alogênicos (CPH principalmente) expressos nas células do enxerto. A rejeição pode ser dividida em duas fases: sensibilização, na qual os linfócitos reagem contra os antígenos do doador, se ativam e proliferam e, efetora, na qual a destruição do tecido transplantado acontece.

5.1.1. Fase de sensibilização

Durante a fase de sensibilização, os linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ se ativam e proliferam após a apresentação dos antígenos alogênicos. Os antígenos de histocompatibilidade estão envolvidos. A apresentação dos aloantígenos pode se efetuar por células do doador e/ou por células do hospedeiro, determinando uma apresentação direta ou indireta, respectivamente.

a) A apresentação direta

A maioria dos tecidos transplantados contém leucócitos passageiros. Esses leucócitos são células apresentadoras de antígenos, as quais expressam os CPH do doador. Após o transplante, as CAA migram para os nódulos linfáticos ou outros órgãos linfóides secundários, onde elas ativarão as células $CD4^+$ “helper” (T_H). Como mencionado anteriormente, as T_H têm um papel predominante na orquestração e amplificação da resposta imune. As células T_H reconhecerão os CPH do doador, como sendo estranhos, bem como o peptídeo apresentado por estes CPH. As células dendríticas se encontram na maioria dos tecidos, e são reconhecidas como sendo CAA (expressam de maneira constitutiva o CPH de classe II e fornecem os sinais de co-estimulação).

b) A apresentação indireta

Durante o transplante de tecidos ou células, é necessária a fagocitose das proteínas alogênicas pela CAA do receptor. Estas CAA vão em seguida, migrar para os órgãos linfóides secundários para apresentar essa proteínas às células T_H

5.1.2. Fase efetora

Uma variedade de mecanismos está envolvida na fase efetora da rejeição. As reações celulares mais comuns compreendem as reações de hipersensibilidade tardia (*delayed-type hypersensitivity*) e a citotoxicidade induzida pelos LTC (linfócitos T citotóxicos). As reações de hipersensibilidade tardia são causadas pela secreção de certas citocinas pelas T_H , as quais induzem uma forte reação inflamatória localizada.

Essa reação é caracterizada por um influxo massivo de células inflamatórias, entre elas os macrófagos, que provocam um dano ao tecido transplantado. Os LTC são

principalmente as células T CD8⁺, restritos ao CPH de classe I. Após sua ativação específica pelas CAA do doador ou do receptor, bem como pelas T_H, os LTC proliferam e migram na circulação para encontrar seu alvo. Quando um LTC reconhece seu alvo, ligando seu TCR com o CPH de classe I das células do enxerto, ele destrói essas células, induzindo a apoptose. Mecanismos menos comuns da fase efetora da rejeição são a lise pelo complexo anticorpo-complemento e ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Sayegh & Turka, 1998).

5.2. Mecanismos de indução de tolerância

A resposta imune mediada por células T é a peça central na aloreatividade, sendo que a tolerância envolvendo essas células é a chave para a prevenção da rejeição do enxerto. A ignorância imune é uma situação especial, na qual a rejeição não ocorre porque o sistema imune não pode iniciar uma resposta imune efetiva contra aloantígenos, como por exemplo no caso da ausência de órgãos linfóides secundários (Wekerle, 2001).

5.2.1. Deleção clonal

A deleção clonal envolve a eliminação dos linfócitos que reagem contra os antígenos do doador. Este mecanismo é considerado como um meio muito eficaz para obter-se um estado de tolerância durável. Esta deleção pode acontecer no timo (tolerância central), após um transplante de medula óssea, ou nos tecidos linfóides secundários periféricos (tolerância periférica).

Após um transplante de medula óssea, as células tronco hematopoiéticas se diferenciam em várias linhagens celulares, entre elas as CAA. Estas CAA migram para o timo e servirão ao processo de seleção tímica dos linfócitos T oriundos do

transplante de medula óssea. Os linfócitos neo-formados serão então tolerantes ao CPH do doador e do receptor, uma vez que os linfócitos que reagiram fortemente contra o CPH serão deletados pela seleção negativa. A deleção tímica foi também observada com injeções intratímicas de peptídeos do CPH do doador (Jones et al., 1998).

A deleção dos linfócitos alo-reativos na periferia é um fenômeno importante para o desenvolvimento de tolerância. Este fenômeno foi observado no caso de injeção intravenosa ou oral de uma quantidade massiva de antígenos definidos (Weiner, 1997), ou no caso de agentes moduladores dos linfócitos T, como a inibição das funções acessórias ou das moléculas de co-estimulação necessárias à sua ativação.

5.2.2. Anergia clonal

A anergia é caracterizada pela inativação funcional de linfócitos T, podendo ser observada bloqueando-se a co-estimulação envolvendo as moléculas CD28 ou CD40 (Schwartz, 1990).

5.2.3. Regulação/supressão

Apesar da deleção dos clones dos linfócitos T alo-reativos durante um transplante, este mecanismo não poderia explicar a sobrevivência a longo prazo com um protocolo de indução de tolerância uma vez que essa deleção não é completa. Uma contribuição importante ao fenômeno de tolerância, foi demonstrado pela participação dos linfócitos T reguladores (Treg). A imunoregulação pelos linfócitos T é um dos mecanismos principais responsáveis pela manutenção da homeostasia dos linfócitos T e da tolerância a antígenos específicos. Este mecanismo é utilizado não somente para controlar as respostas imunes aos antígenos “próprios” (reações auto-imunes), mas

também para controlar as respostas imunes aos antígenos estranhos, como no caso dos transplantes. A maioria dos estudos efetuados em humanos e em roedores demonstraram uma atividade imunoreguladora dos linfócitos CD4⁺ (Wood et al., 2003). O mecanismo exato pelo qual os Treg agem está ainda sob investigação.

5.3. Protocolos experimentais de tolerância periférica

Os protocolos de indução de tolerância consistem geralmente, em um tratamento curto no momento do transplante, permitindo a aceitação do enxerto a longo prazo pelo seu receptor.

5.3.1. Bloqueio de co-receptores

Esta abordagem foi inicialmente investigada pela utilização de anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, os quais demonstraram a sobrevida a longo-prazo de alo-enxertos de coração e de pele. O estado de tolerância é adquirido somente após várias semanas de tratamento (Waldmann et al., 2001).

5.3.2. Bloqueio da co-estimulação

O desenvolvimento de anticorpos ou de moléculas que permitem o bloqueio dos sinais de co-estimulação dos linfócitos T aparece como a via mais promissora. O bloqueio da interação CD28:B7 pode se efetuar com o CTLA4-Ig. O CTLA4-Ig é uma proteína recombinante resultante da fusão entre o domínio extracelular do CTLA-4 e a parte constante (Fc) de uma IgG. O CTLA4-Ig bloqueia a interação CTLA4-B7, que normalmente induz um sinal negativo aos linfócitos T. O anticorpo mais eficaz que bloqueia os sinais de co-estimulação é o anti-CD154. A molécula CD154 se expressa

nos linfócitos T ativados e, após sua interação com o CD40, induz a expressão de B7 na CAA. É postulado que o bloqueio de CD154:CD40 previne a co-estimulação CD28:B7, inibindo assim a ativação dos linfócitos (Sayegh & Turka, 1998).

5.4. Protocolos experimentais de tolerância central

Apesar dos progressos obtidos nos últimos anos na terapia imunossupressora, esforços têm sido feitos no campo da indução de tolerância doador-específica (Cosimi & Sachs, 2004).

Há vários anos, foi relatado que a indução de um quimerismo hematopoiético completo com terapia mielossupressora e transplante de medula óssea em humanos induzia tolerância a um subsequente transplante renal (Dey et al., 1998). O quimerismo é definido como a co-existência de populações hematopoiéticas de ambas origens, ou seja, células do doador e receptor (Tabela 4). Um estado de quimerismo misto, onde a presença de elementos oriundos do doador induz tolerância, enquanto as CAA do hospedeiro mantém a competência imunológica normal, é desejável (Wekerle, 2001).

A validação de tal estratégia, iniciou-se com relatos de Sharabi & Sachs (Sharabi & Sachs, 1989), quando camundongos reconstituídos com uma mistura de células da medula óssea do doador e receptor, após condicionamento com irradiação não letal, tornaram-se tolerantes a enxertos de pele provenientes do doador de medula óssea. A produção de células T é essencial na indução de tolerância e na manutenção do quimerismo (Xu et al., 2004). O desenvolvimento de células derivadas da medula óssea do doador conduz à seleção negativa dos linfócitos reativos do doador, principalmente estabelecendo as células do doador como próprias. Posteriormente, experimentos semelhantes de tolerância em enxertos renais foram realizados em primatas. Esses animais, durante dez anos, mantiveram a função renal normal, sem

evidência de rejeição, sem terapia imunossupressora (Huang et al., 2000). A estratégia foi avaliada em receptores humanos de alotransplante em 1998 (Spitzer et al., 1999).

A função do aloenxerto renal foi preservada cinco anos após a interrupção do tratamento imunossupressor.

TABELA 4. Definição de vários tipos de quimerismo

	Definição
Quimerismo	Presença de células estrangeiras (doador) em um indivíduo
Microquimerismo	Existência de células do doador (hematopoiéticas): < 1 %
Macroquimerismo	
(a) quimerismo completo	Todas as células hematopoiéticas (100%) são de origem do doador:
(b) quimerismo misto	Co-existência de células hematopoiéticas de origem do doador e receptor: > 1% doador < 100 %

Wekerle, 2001

6. Indução de quimerismo molecular por transferência gênica

O quimerismo misto induzido pelo TMO demonstra que a expressão de aloantígenos em células derivadas da medula óssea é suficiente para induzir tolerância. Assim, a engenharia genética de células tronco-hematopoéticas permite a expressão de antígenos alogênicos em células derivadas da medula óssea, estabelecendo assim um quimerismo molecular. A indução de tolerância em quimeras moleculares requer a expressão dos antígenos CPH na superfície dos linfócitos T maduros (Tian et al., 2002).

Esta abordagem possui um baixo risco, comparado com TMO alogênico, pois as células geneticamente modificadas são autólogas (Bagley et al., 2002). A realização desta estratégia foi demonstrada em modelo murino, a qual utilizou a transferência gênica (por intermédio de vetor retroviral) de genes alogênicos do CPH. Este modelo utilizou duas linhagens congênicas de camundongos para a região do CPH de classe I: B10.AKM (H-2K^k, I^k, D^q) e B10.MBR (H-2K^b, I^k, D^q). Por causa da disparidade do CPH de classe I, enxertos de pele seriam rejeitados pelo receptor. A introdução do gene K^b na medula do receptor B10.AKM (previamente condicionada com regime mielossupressor), induziu a expressão dessas moléculas nas células hematopoiéticas, e aceitação do aloenxerto de pele (na ausência de imunossupressores) quando comparado com animais que receberam a medula óssea não modificada geneticamente (Sykes et al., 1993; Bagley et al., 2002a). A capacidade do quimerismo molecular de antígenos do CPH de classe I e II) em induzir tolerância foi observada também em outros modelos animais (Emery et al., 1997; Ierino et al., 1999; Heim et al., 2000; Sonntag et al., 2001).

Posteriormente, outros autores demonstraram a indução de tolerância, através do quimerismo molecular, através da expressão do gene marcador GFP (*Green Fluorescence Protein*) também em células da medula óssea. Camundongos C57BL/6J (B6) foram submetidos à mielossupressão através de Busulfex®, seguido de

transplante de medula óssea oriunda de camundongos transgênicos (B6-GFP.Tg) que expressam a proteína GFP. Dez semanas após o transplante, enxertos de pele dos camundongos B6-EGFP.Tg foram realizados. Tolerância a longo-prazo desses enxertos foram confirmados pela ausência de linfócitos e anticorpos reativos anti-GFP. Em compensação, os camundongos controles que não expressavam a proteína GFP em células hematopoiéticas rejeitaram o enxerto de pele em 20 dias (Andersson et al., 2003). Outro experimento similar utilizando a irradiação (10 Grays) como mielossupressão obteve resultados equivalentes à indução de tolerância à proteína GFP (Andersson et al., 2003a). Em primatas, células CD34⁺ autólogas foram transduzidas por um vetor lentiviral expressando GFP e transplantadas em macacos rhesus previamente irradiados. A expressão a longo prazo da proteína GFP foi constatada nas várias linhagens hematopoiéticas (monócitos, granulócitos, linfócitos) destes macacos durante um período de aproximadamente cinco anos sem indução de resposta imune transgene-específica (Kung et al., 2003).

O processo de regeneração do sistema hematopoiético envolve o restabelecimento de parâmetros de identidade dos antígenos “próprios” e “não-próprios”. O mecanismo pelo qual os enxertos de medula óssea induzem tolerância à um determinado antígeno não são ainda totalmente esclarecidos.

Pelo fato de que as células T controlam as respostas antígeno-específicas, o mecanismo que conduz à regeneração dos linfócitos T periféricos é central na reconstituição imune. O desenvolvimento das células T após o transplante de medula óssea é suposto ocorrer da mesma maneira que o mecanismo da ontogenia de células T normais que inicia-se com a migração das células tronco-hematopoéticas no timo. No timo, sob a influência do ambiente estromal especializado, as células progenitoras T se expandem, se diferenciam e sofrem processos de seleção positiva e negativa (Shizuru et al., 2000)

7. Tolerância Neonatal

O mecanismo de tolerância neonatal ainda permanece incerto. Os primeiros trabalhos nesta área demonstraram que camundongos recém-nascidos podiam ser tolerantes a aloantígenos, podendo posteriormente aceitar aloenxertos. Possibilidades para explicar tal mecanismo incluem: deleção clonal de células T antígeno-específicas, supressão de células reguladoras (células T *helper*) e a secreção de moléculas que suprimem a geração de células efectoras antígeno-específicas (Forsthuber et al., 1996)

Alguns estudos descrevem a relação dose-efeito entre a resposta neonatal e a quantidade de antígeno administrada. Entretanto, estudos adicionais debatem a hipótese de que a tolerância neonatal é gerada pelo baixo número de linfócitos maduros (Bot & Bona, 2002).

Alguns estudos indicam que as CAA neonatais possuem uma capacidade limitada em promover as respostas de células T. Reduzida expressão de moléculas CPH de classe II e moléculas co-estimulatórias tem sido relatadas em células dendríticas, células B e monócitos murinos neonatais. A produção diminuída da citocina IL-12 (que estimula as células T_{H1}) pelos monócitos neonatais também tem sido descrita. Em contraste, células dendríticas fenotipicamente maduras isoladas de baço neonatal são capazes de promover respostas T citotóxicas, embora em menor quantidade. Em estudos *in vitro*, quando IL-12 é adicionada no meio de cultura, ambas células T neonatais (humana e murina) dramaticamente aumentam a produção de IFN- γ a níveis comparáveis a células adultas (Wu et al., 1993; Adkins, 1999).

Imunização de neonatos com vacinas de DNA resulta em uma resposta T_{H1}, quando analisadas na vida adulta. Estes resultados são importantes, pois eles demonstram que é possível induzir respostas T_{H1} em neonatos (Bot & Bona, 2002).

Em relação a células T CD4⁺, células neonatais e adultas respondem diferentemente dentro do mesmo ambiente, sugerindo que este tipo celular possui

características intrínsecas distintas. As células T CD4⁺ neonatais são altamente deficientes no desenvolvimento das respostas primárias e secundárias T_H1 específicas.

Provavelmente, a molécula de superfície mais importante nas células T CD4⁺, para a sinalização das CAA, seja do ligante CD40 (CD40L). Em células T CD4⁺ neonatais, CD40L é deficiente, quando comparado com células adultas. A produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ resulta da maturação deficiente das CAA no período neonatal (Adkins et al., 2002).

O balanço entre tolerância e sensibilização é dependente de vários fatores, tais como a) *background* genético, b) natureza e dose do antígeno, c) frequência de administração, d) idade da primeira exposição ao antígeno, e) condições imunológicas do hospedeiro, entre outros (Strobel, 2001). Em relação à administração oral do antígeno, estes rapidamente atingem os tecidos linfóides sistêmicos e da mucosa. Células reguladoras foram evidenciadas na placa de Peyer e nos linfonodos mesentéricos nas primeiras 24 h após uma única ingestão do antígeno e, no baço após 4-7 dias (Marth & Strober, 1997). Posteriormente, a tolerância permaneceu a longo prazo, com supressão da hipersensibilidade tardia, tendo sido demonstrada por mais de 17 meses após uma única administração do antígeno (Strobel & Ferguson, 1987). No mesmo contexto, a tolerância aos glóbulos vermelhos de carneiro foi obtida em camundongos jovens (4 meses de idade) quando comparada com camundongos com 12 meses de vida, os quais desenvolveram a produção de anticorpos (IgG). A idade crítica que determinou tanto a supressão como a presença de anticorpos após a administração oral do antígeno foi de 6,5 e 10,5 meses de idade, respectivamente. A análise *in vitro* da resposta imune usando células T e B obtidas de camundongos jovens e velhos demonstrou que a alteração das células T e B estavam relacionadas com a idade, conduzindo à supressão e a produção de anticorpos após a administração oral de glóbulos vermelhos de carneiro, respectivamente (Wakabayashi et al., 1999).

Capítulo I – Quimerismo hematopoiético e indução de tolerância no rato Gunn

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de um quimerismo hematopoiético molecular pode induzir tolerância à uma proteína. O quimerismo molecular, ou seja, a co-existência em um organismo de células que expressam ou não um transgene, pode ser obtido por transplante de células tronco hematopoiéticas autólogas geneticamente modificadas. O sistema imune se reconstitui com expressão permanente da proteína expressa pelo transgene (Evans & Morgan, 1998; Tian et al., 2003; Andersson et al., 2003).

O objetivo desta abordagem é criar um quimerismo hematopoiético no rato Gunn através do transplante de células tronco hematopoiéticas singênicas previamente transduzidas *in vitro* com vetor lentiviral contendo o gene que codifica a proteína humana B-UDPGT1A1 (bilirrubina-uridina-difosfato-glucuronil transferase), a fim de induzir tolerância à essa proteína.

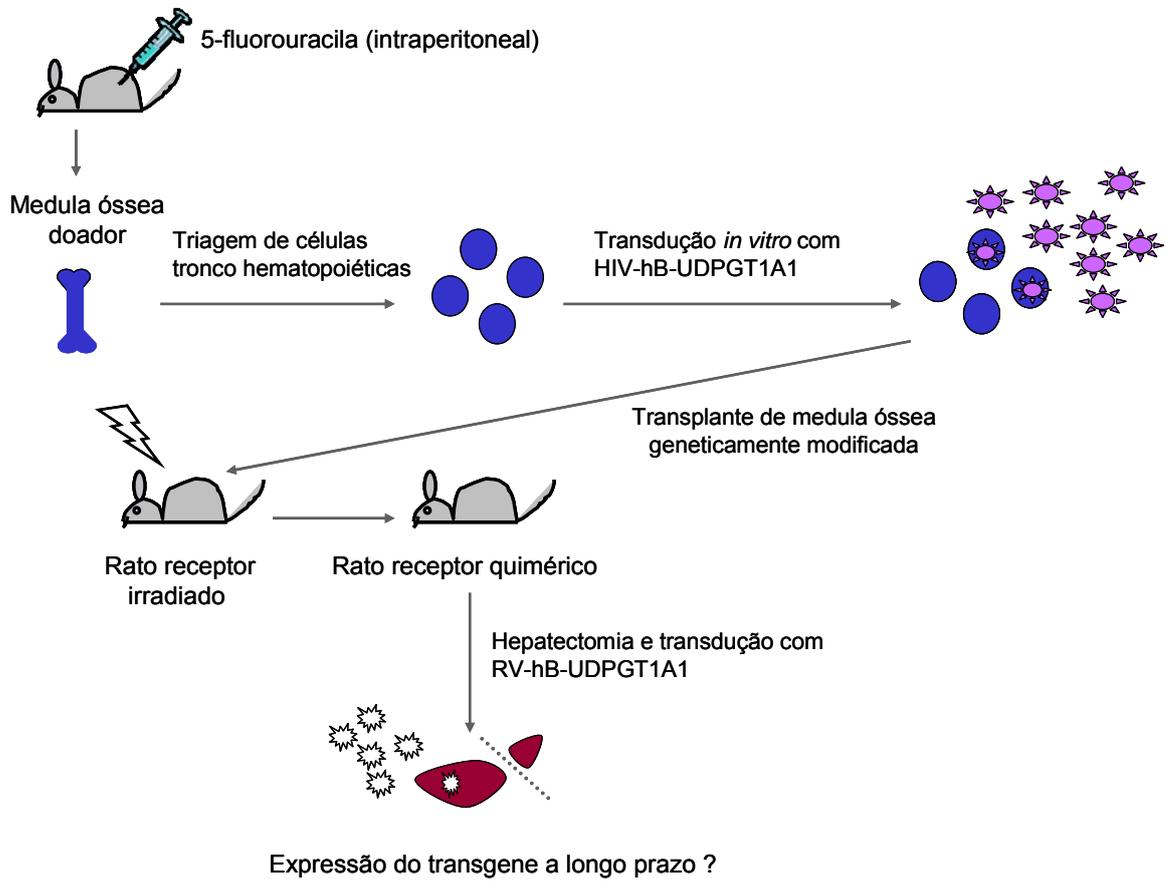
2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado como mostrado na figura 15.

A medula óssea foi obtida cinco dias após a administração por via intraperitoneal de 5-fluorouracila (5-FU) nos ratos doadores. As células tronco hematopoiéticas foram selecionadas com anticorpos acoplados a *microbeads* magnéticas e posteriormente modificadas geneticamente *in vitro* com vetor lentiviral contendo o gene *hB-UDPGT1A1*. Os receptores de medula óssea foram irradiados previamente ao transplante com dose sub-letal. O quimerismo molecular nos ratos receptores foi avaliado por PCR no DNA das células sanguíneas. A seguir, a fim de verificar se os ratos receptores se tornaram tolerantes à essa proteína, os ratos quiméricos foram submetidos a uma hepatectomia parcial de 2/3. Posteriormente, realizamos a transdução dos hepatócitos com vetor retroviral contendo o mesmo gene 24 h após a hepatectomia parcial.

Para realização do experimento foram necessárias a construção e produção dos vetores retroviral hB-UDPGT1A1 e lentiviral hB-UDPGT1A1.

FIGURA 15. Esquema experimental do transplante de medula óssea no rato Gunn



2.1. Animais

Foram utilizados como doadores 5 ratos Gunn e como receptores de medula óssea 14 ratos Gunn homozygotos (G1-G14), com 7-8 semanas de idade.

2.2. Isolamento e transdução das células hematopoiéticas

2.2.1 Triagem de células tronco hematopoiéticas: seleção negativa por triagem magnética

No camundongo, as células tronco hematopoiéticas são isoladas da medula óssea através da utilização do anticorpo específico que reconhece o antígeno Sca1⁺ nessas células. Entretanto, no rato não existem ainda marcadores disponíveis que permitam isolar de maneira específica as células tronco hematopoiéticas da medula óssea. Utiliza-se então uma seleção negativa por triagem magnética, ou seja, as células da medula óssea que já estejam envolvidas em alguma via de diferenciação são eliminadas por anticorpos acoplados a *microbeads* magnéticas. As células tronco hematopoiéticas serão aquelas que não se ligaram aos anticorpos específicos das células maduras.

Cinco dias antes da coleta da medula óssea injetou-se nas doadoras o 5-FU (5-Fluorouracila) na dose de 150 mg/kg pela via intraperitoneal. As duas extremidades dos ossos (fêmures e tíbias) foram quebradas, e a medula foi recuperada por intermédio de uma seringa e uma agulha 36 *gauge*. As células foram lavadas com uma solução de PBS contendo 2mM de EDTA e 10% de SBF (soro bovino fetal, *Sigma*), depois incubadas durante 10 min no gelo com uma solução de lise de hemácias contendo: 250 mM Na₂ EDTA, 10mM KHCO₃, e 155mMNH₄Cl. As células foram então lavadas em um grande volume de PBS, filtradas em filtro de nylon (100 µm), e posteriormente ajustadas à uma concentração de 20 milhões de células/ml.

Uma primeira incubação (30 min, 4°C) visando marcar os monócitos/macrófagos, os linfócitos e os eritrócitos foi realizada com três anticorpos: OX42 biotilado, diluído 1:100 (*Purified anti-rat CD 11b/c, BD Pharmigen*), CD3LT biotilado, 2 µl/milhão (*Biotin anti-rat CD3, BD Pharmigen*) e HIS49, 2 µl/milhão (*Biotinylated anti-rat erythroid cells, BD Pharmigen*). As células foram lavadas e

ajustadas à uma concentração de 100 milhões/ml. *Microbeads* magnéticas (2µl/milhão) acopladas à estreptavidina (*Streptavidin Microbeads, Miltenyi Biotec.*), ao anticorpo anti-imunoglobulina G (*Goat anti-mouse IgG microbeads, Miltenyi Biotec.*), e diretamente acopladas ao CD45RA (antígeno leucocitário comum às células imaturas) (*CD45 RA Microbeads, Miltenyi Biotec.*) foram incubadas com a suspensão celular (15 min., 4°C). As células foram lavadas em PBS contendo 2mM d'EDTA e 10% de SBF, filtradas em filtro de nylon (37 µm), e ressuspendidas em 1 ml de PBS. Uma coluna para separação de células (*MACS separation columns 25LD, Miltenyi Biotec*) foi pré-condicionada com 2 ml de PBS. A suspensão celular (100 milhões/ml) foi então passada na coluna imantada. A mesma foi lavada três vezes com 1 ml de PBS. A fração celular negativa (células que não se ligaram aos anticorpos) foi contada em câmara de Malassez e colocada em cultura à uma concentração de 1 milhão/ml em placa de 96 poços, sendo 1×10^5 células/poço. O número de células recuperadas na fração negativa foi de 5,5 milhões. As células foram então deixadas à 37°C durante toda a noite. O meio de cultura utilizado foi o X-VIVO (*Cambrex*) contendo 10% de SBF, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, 10 ng/ml de rrIL-6, 100 ng/ml de rmSCF (*Stem Cell Factor*), 100 ng/ml de rmFLT3 (*FMS-like tyrosine kinase*), 100 ng/ml de rmIL-3 e 100 ng/ml de rmTPO (*Thrombopoietin*).

2.2.2. Transdução das células hematopoiéticas pelo vetor HIV-hBUDPGT1A1

Para transduzir as células hematopoiéticas, foi utilizado o vetor recombinante HIV-1, portador do gene que codifica a proteína humana UDPGT1A1. Após uma noite em cultura, as células foram infectadas por um período de 3 h cada um. A MOI utilizada em cada infecção/poço foi de 150 e 300 divididas em três infecções. Foi adicionado ao sobrenadante viral 8 µg/ml de polibreno em cada infecção.

2.2.2.1. Construção e produção do vetor lentiviral

Os vetores lentivirais foram produzidos por transfecção transitória, utilizando três plasmídeos: o plasmídeo contendo o transgene, o plasmídeo de empacotamento pCMV Δ R8.91 e o plasmídeo pMD.G que codifica a proteína de envelope VSV-G (Bovia F et al., 2003). Estes vetores do tipo SIN (*self-inactivating*) contêm o transgene que codifica a hUDPGT1A1, sob controle transcricional do promotor EF1- α humano (*Elongation Factor-1-alpha*). Eles também possuem a seqüência em cis cPPT do HIV-1, a qual facilita a translocação nuclear do Complexo de Pré-Integração (PIC) (Follenzi et al., 2000; Zennou et al., 2000), e o elemento regulatório pós-transcricional (*WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*), o qual aumenta a expressão do transgene (Zufferey et al., 1999). O título das preparações virais foram determinados em células Hela (células de carcinoma ovariano) por PCR quantitativa usando oligonucleotídeos e sondas específicas para a região 5' não transcrita dos vetores lentivirais: GAG-F, 5'-GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA-3', GAG-R, 5'-GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC-3' e 5'-(FAM)ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCAGG-(*Eclipse Dark Quencher*)-3'. A quantidade do DNA genômico foi normalizada, utilizando oligonucleotídeos e sonda específicos para o gene α -actina: HB2-F, 5'-TCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA-3', HB2-R, 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3' e 5'-(Yakima Yellow)CCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCA-(*Eclipse Dark Quencher*)-3'.

As reações foram analisadas com o sistema de detecção ABI Prism 7700 (RE-Applied Biosystem). O título dos vetores foi de 3×10^9 p.i./ml.

2.3. Transplante de células hematopoiéticas

Na véspera do transplante, os receptores, foram irradiados com uma fonte de cobalto, recebendo a dose única de 9 *Grays*. O transplante foi realizado através da veia dorsal do pênis, utilizando uma agulha 30 *gauge*, sob anestesia geral, usando como anestésico o isoflurano (Forene®) em uma concentração de 3% v/v. Após a infusão das células na corrente sanguínea, os ratos foram colocados em gaiolas com alimentação e água estéreis. Uma cobertura protetora (filtro de ar) (Isocap) foi também colocado sobre a gaiola.

Antibioticoterapia com marbofloxacina (Marboxyl®) (10 mg/kg/dia) foi administrada via intraperitoneal durante 10 dias.

Os parâmetros do transplante são mostrados na tabela 5.

TABELA 5. Receptores de medula óssea geneticamente modificada, número de células transplantadas e quantidade de partículas do vetor HIV-hB-UDPGT1A1/célula

Receptores	Número de células transplantadas	MOI
G1	$1,87 \times 10^5$	150
G2	$1,87 \times 10^5$	150
G3	$1,87 \times 10^5$	150
G4	$1,87 \times 10^5$	150
G5	$1,87 \times 10^5$	150
G6	$1,87 \times 10^5$	150
G7	$1,87 \times 10^5$	150
G8	$1,87 \times 10^5$	150
G9	$5,25 \times 10^5$	300
G10	$5,25 \times 10^5$	300
G11	$5,25 \times 10^5$	300
G12	$5,25 \times 10^5$	300
G13	$5,25 \times 10^5$	300
G14	$5,25 \times 10^5$	300

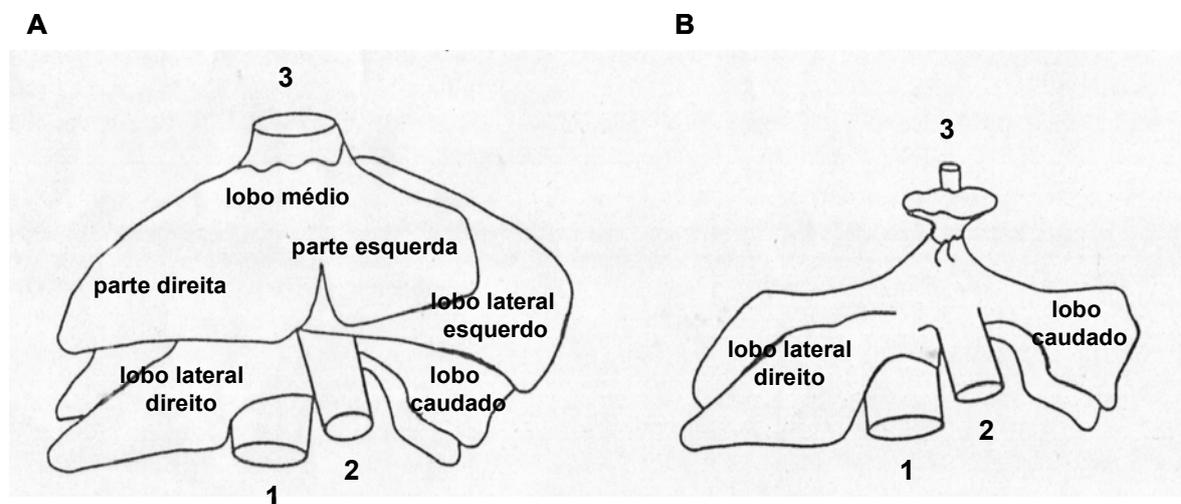
MOI: *Multiplicity of Infection*

2.4. Hepatectomia parcial e transdução dos hepatócitos

Sete semanas após o transplante, os ratos (G1-G10) foram submetidos à uma hepatectomia parcial. Os ratos G11-G14 faleceram alguns dias após o transplante.

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral, usando como anestésico o isoflurano (Forene®) em concentração de 3% v/v. Uma hepatectomia de 2/3 foi realizada segundo a técnica de Higgins e Anderson (Higgins & Anderson, 1931). Após laparotomia mediana os lobos médio e lateral esquerdo são mobilizados, e um fio de seda 6/0 é colocado em torno do pedículo vascular destes dois lobos, o mais perto possível da veia cava retro-hepática. O pedículo portal e as veias supra-hepáticas que drenam os lobos médios e lateral esquerdo são ligados em bloco, tomando o cuidado de não estenotar a veia hepática do lobo lateral direito. O parênquima hepático é seccionado à 2-3 mm da ligação, de modo à deixar um coto do parênquima hepático suficiente para evitar o desligamento da ligadura. Após esta intervenção, somente persistem o lobo lateral direito, o lobo caudado e o parênquima peri-cava (Figura 16).

FIGURA 16. Hepatectomia parcial no rato segundo a técnica de Higgins & Anderson



(A) Fígado normal. (B) Aspecto do fígado após retirada do lobo médio e do lobo lateral esquerdo. 1. veia cava sub-hepática; 2. veia porta; 3. veia cava supra-hepática.

Vinte e quatro horas após, os ratos receberam 2 ml (1×10^9 partículas totais) de uma suspensão contendo o vetor retroviral portador do transgene *hB-UDPGT1A1* (RV-hB-UDPGT1A1) através da veia dorsal do pênis.

2.4.1. Construção e produção do RV-hB-UDPGT1A1

O DNAc codificando a B-UDPGT1A1 humana (1,8 kb) foi isolado do plasmídeo pSVK3 através das enzimas de restrição EcoR1/Xba1 (Seppen et al., 1996). Após uma sub-clonagem no plasmídeo pBS, o transgene foi inserido como um fragmento de 1954 pb no plasmídeo MFG retroviral, através das enzimas de restrição BamH1-Bgl2. Neste plasmídeo, a transcrição do transgene está sob o controle do LTR viral. O plasmídeo foi transfectado em células de encapsulação 293 GPG, as quais fornecem as funções complementares dos vetores retrovirais (*gag/pol*), bem como a proteína G do vírus da estomatite vesicular como um envelope protéico (Ory et al., 1996). O clone 73.14 foi selecionado.

Sobrenadantes retrovirais foram produzidos pela coleta do meio de cultura das células confluentes durante três dias. Posteriormente o sobrenadante foi concentrado por centrifugação tangencial (*Amicon Ultra Centrifugal Filtration Devices*) (4.000 rpm) seguido de ultracentrifugação (26.000 rpm durante 1 h e 30 min) e armazenado à -80°C. O título viral foi determinado pela transdução de células Te671 com diluições seriadas do sobrenadante, seguido de avaliação por PCR quantitativa. O título foi de 5×10^8 p.i./ml.

2.5. Parâmetros analisados após o transplante

Sete semanas após o transplante uma amostra de sangue foi coletada dos ratos G1-G10 em tubo EDTA, para análise do quimerismo molecular, da bilirrubina plasmática e de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1.

2.5.1. Análise do quimerismo molecular

2.5.1.1. Extração do DNA

Aproximadamente um mililitro de sangue total foi coletado sob anestesia geral da região retro-orbital dos receptores. O sangue foi imediatamente centrifugado por 10 min (4000 rpm). A camada de leucócitos foi recuperada e colocada em tampão de lise contendo 250 mM Na₂ EDTA, 10mM KHCO₃, e 155mM NH₄Cl, a fim de eliminar as hemácias contaminantes. Em seguida, o precipitado de glóbulos brancos, após centrifugação, foi colocado em 500 µl de tampão de extração contendo 10 M uréia; 10% SDS; 0,5 M EDTA; 5 M NaCl; 1 M Tris pH 7,5 e 20 mg/ml de proteinase K, durante a noite, à 37°C, sob agitação.

Uma centrifugação à 4000 rpm por 15 min foi realizada. A fase aquosa foi recuperada e precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto/volume da amostra. O DNA assim precipitado, foi lavado com etanol 70%, centrifugado à 2000 rpm por 5 min e depois secado à temperatura ambiente. Enfim, o DNA foi dissolvido em tampão Tris-EDTA (20.1 mM) e conservado à 4°C.

2.5.1.2. Dosagem do DNA

A concentração do DNA foi medida de maneira automática com o fluorômetro (Amersham Pharmacia) utilizando como padrão o *Calf Thymus DNA* (Sigma).

2.5.1.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitativa

A PCR foi realizada com o reagente *Sybr Green I dye* (PE Biosystems) com sistema de detecção ABI Prism 7700. A medida da emissão fluorescente foi obtida em cada ciclo e calculada para cada amostra, pela intensidade da emissão da referência do reagente interno ROX (6-carboxi-X-rodamina). Os valores resultantes, ΔR_n , é calculado para cada ciclo. O valor C_t (ciclo limiar) foi calculado como o número do ciclo no qual o ΔR_n atingiu o limiar e foi usado para comparar as várias amostras. Os valores foram igualados para a quantidade de DNA utilizada na PCR, usando a amplificação de um fragmento do gene *PEPCK* (fosfoenol piruvato carboxiquinase) de rato como padrão interno, utilizando os oligonucleotídeos: 5': 5'-GTCATATTTCTTCAGCTTGCGG-3' e 5'-ATAATGGTCTGGACTTCTCTGC-3'. A medida do gene *hB-UDPGT1A1* para todas as amostras foi testada em duplicata. A seqüência dos oligonucleotídeos utilizados foram: 5'-GTGATGATGCCCTTGTTTGGT-3' e 5'-AAACTCCACCCAGAACACGG'. A PCR foi realizada em uma mistura final contendo: 50 ng de DNA, 7,5 pmol de cada oligonucleotídeo, e 12,5 µl do *Sybr Green PCR Máster Mix* (PE Biosystems). As condições de reação foram as seguintes: 50°C por 2 min, 95°C por 15 seg, 95°C por 10

min, seguidos de 40 ciclos: 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. O fragmento amplificado gerado foi de 228 bp. Como escala padrão utilizou-se um plasmídeo contendo o transgene *hB-UDPGT1A1*.

2.5.2. Dosagem da bilirrubina plasmática

A bilirrubina total foi medida por espectrofotometria em um aparelho Hitachi 717 usando-se o Kit Bil-T (*Boehringer Mannheim France, Meylan, France*).

2.5.3. Detecção de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1

A presença de anticorpos dirigidos contra a hB-UDPGT1A1 no soro dos ratos foi detectada por ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). O anticorpo anti-hB-UDPGT1A1 WP1(diluído 1:1000) foi colocado em 96 poços da placa Maxisorp incubado à 4°C durante a noite. Após lavagem com 200 µl de PBS/Tween 20 (0,5% v/v), a placa foi incubada com 2µg/poço de um lisado de fígado humano por 1 h e 30 min à 37°C. A placa foi novamente lavada e incubada com 50 µl dos soros a serem testados (1:50, 1:1000, 1:5000) por 1 h e 30 min à 37°C. A placa foi novamente lavada com 200 µl de PBS/Tween 20 (0,5% v/v) e a presença de anticorpos anti- hB-UDPGT1A1 foi revelada usando-se 50 µl do anticorpo secundário biotilado anti-IgG de rato diluído 1:2000 (*anti-rat IgG:Biotin-SP-AffiniPure F (ab')-Fragment Mouse anti-rat, Jackson ImmunoResearch*), após incubação à 37°C durante 1 h. Posteriormente a revelação foi feita com o reagente estreptavidina/peroxidase diluído 1:2000 (*HorseRadish Peroxidase Strptavidin, Vector*), seguida da incubação com 50 µl de ABTS® (2,2'-azino-bis-3 etilbenziazolina-6 ácido sulfônico) como substrato (*Boehringer Mannheim*). A densidade óptica foi lida em 405 nm.

2.6. Parâmetros analisados após a transdução hepática

Uma alíquota de sangue (200 μ l) foi coletada dos ratos G1-G10 para dosagem de bilirrubina sérica nos dias 14, 28, 42 após a transdução do fígado pelo vetor RV-hB-UDPGT1A1. Os ratos foram então sacrificados 42 dias após a injeção do RV-hB-UDPGT1A1, com exceção do rato G9, cuja bilirrubina foi também dosada nos dias 79 e 109 pós transdução hepática.

A dosagem de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1 foi realizada no dia 28 após a transdução hepática.

2.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student's. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

Quatorze ratos (G1-G14) previamente irradiados com uma dose de 9 *Grays*, receberam $1,87 \times 10^5$ ou $5,25 \times 10^5$ células triadas (lin^-) e infectadas com uma MOI de 150 ou 300. O nível de quimerismo variou entre 0,007 e 0,282 cópias/genoma haplóide. O rato G9 apresentou o nível mais forte de quimerismo (Tabela 6).

TABELA 6. Quimerismo molecular no sangue periférico dos ratos G1-G10 transplantados com a medula óssea geneticamente modificada pelo vetor HIV-hB-UDPGT1A1, sete semanas após o transplante

Ratos	MOI	Número de células transplantadas	Ct	Quimerismo (cópias/genoma haplóide)
G1	150	$1,80 \times 10^5$	29,93	0,019
G2	150	$1,80 \times 10^5$	30,39	0,009
G3	150	$1,80 \times 10^5$	27,92	0,105
G4	150	$1,80 \times 10^5$	29,64	0,023
G5	150	$1,80 \times 10^5$	30,32	0,009
G6	150	$1,80 \times 10^5$	29,38	0,018
G7	150	$1,80 \times 10^5$	30,55	0,007
G8	150	$1,80 \times 10^5$	30,98	0,007
G9	300	$5,25 \times 10^5$	26,37	0,282
G10	300	$5,25 \times 10^5$	26,02	0,275

MOI: *Multiplicity of Infection*; Ct: ciclo limiar

Sete semanas após o transplante, a bilirrubinemia sérica foi dosada. Os valores obtidos estavam entre 88-130 μM (Tabela 7). Quatorze dias após a transdução do fígado pelo vetor retroviral a bilirrubinemia foi novamente dosada. Os valores diminuíram consideravelmente como mostrado na tabela 7. Estes valores foram significativamente diferentes quando comparados com os valores obtidos antes da transdução hepática pelo vetor RV-hB-UDPGT1A1 ($p < 0,0001$). Vinte e oito dias após,

a concentração da bilirrubina aumentou em nove dos dez ratos. Somente o rato G9, cujo quimerismo foi o mais elevado (0,282 cópias/genoma haplóide), manteve a sua bilirrubina estável por um período de 109 dias, tempo em que o rato sobreviveu. A dosagem de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1 foi realizada no soro dos ratos, antes (D0) e após injeção do retrovírus (D28). A presença de anticorpos foi detectada no soro de todos os ratos 28 dias após a transdução hepática. Todos os ratos foram sacrificados 42 dias após a injeção do retrovírus, com exceção do rato G9. Os valores de bilirrubina sérica do rato G9 foram os seguintes: D0 (119 μM), D14 (7 μM), D28 (10 μM), D42 (12 μM), D79 (17 μM), D109 (22 μM) (Tabela 7).

TABELA 7. Análise da bilirrubinemia e título de anticorpos anti hB-UDPGT1A1 no soro dos ratos G1-G10, antes (D0) e após a transdução hepática pelo vetor RV-hB-UDPGT1A1 (D14, D28, D42).

Ratos	Bilirrubinemia (μM)				Anticorpos	
	D0	D14	D28	D42	D0	D28
G1	107	4	121	95	-	1:5000
G2	104	7	121	101	-	1:5000
G3	130	5	135	106	-	1:5000
G4	113	9	128	83	-	1:5000
G5	93	7	136	136	-	1:5000
G6	94	30	109	126	-	1:5000
G7	117	74	119	99	-	1:5000
G8	88	9	113	70	-	1:5000
G9	119	7	10	12	-	1:5000
G10	101	11	70	129	-	1:5000

(-) resultado negativo; (1:5000) diluição máxima positiva

4. DISCUSSÃO

Há anos, várias equipes se interessam em abordagens de terapia gênica para doenças hepáticas metabólicas hereditárias, que necessitam da expressão estável a longo prazo do transgene nos hepatócitos.

Vetores retrovirais são particularmente eficazes pois eles permitem a integração do transgene de modo estável no genoma. A injeção no rato 24 h após hepatectomia parcial de uma solução contendo vetor retroviral LacZ em título elevado pôde induzir a expressão da proteína em mais de 50% dos hepatócitos (Kitten et al., 1997).

No rato Gunn, a injeção de vetor retroviral veiculando o transgene *hB-UGT1A1* permite diminuição da bilirrubinemia de até 90%. Entretanto, a correção da hiperbilirrubinemia é transitória (em torno de três semanas), devido à resposta imune dirigida contra a proteína codificada pelo transgene (Aubert et al., 2002). A modulação do sistema imune poderia aumentar a duração da correção e, quando genes imunomoduladores foram incluídos em vetores adenovirais, a correção a longo prazo foi observada em ratos Gunn (Ilan et al., 1997; Thummala et al., 2002). Entretanto, estas estratégias com vetores adenovirais são fracamente relevantes em abordagem clínica. A indução de tolerância em relação à proteína hB-UDPGT1A1, poderá corrigir a longo prazo o déficit enzimático no rato Gunn.

Uma abordagem para atingir tolerância à hB-UDPGT1A1 no rato Gunn seria o estabelecimento de um quimerismo molecular usando o transplante de células da medula óssea, as quais expressam a proteína terapêutica.

Atualmente o vetor viral mais eficaz e mais utilizado para transduzir células hematopoiéticas é o lentiviral (Guenechea et al., 2000; Mikkolla et al. 2000). A transdução da totalidade das células hematopoiéticas é possível, mas necessita de uma quantidade importante do vetor lentiviral. Assim, é interessante isolar as células mais

imaturas da medula óssea, as quais possuem a capacidade de reconstituir todo o sistema hematopoiético.

Estudos prévios puderam demonstrar que tal quimerismo molecular conduzia à tolerância central em relação à proteína em questão. Esses estudos foram realizados em camundongos utilizando o transgene que codifica a proteína GFP. Camundongos transplantados com células tronco hematopoiéticas ($Sca1^+$), geneticamente modificadas foram posteriormente tolerantes a enxertos de pele provenientes de camundongos transgênicos GFP (Andersson et al., 2003). A indução de tolerância também foi observada no macaco quando transplantado com células $CD34^+$ geneticamente modificadas com GFP. Para testar a tolerância à proteína codificada pelo transgene, os macacos foram imunizados com a proteína GFP recombinante e um adjuvante (CpG). Os níveis celulares da proteína GFP se mantiveram estáveis por mais de 2 anos, apesar da forte imunização. A presença de anticorpos anti-GFP não foi detectada, nem uma resposta T citotóxica anti-GFP, indicando que os macacos tornaram-se tolerantes à proteína codificada pelo transgene (Kung et al., 2003). A mesma abordagem foi testada no modelo da hemofilia A, onde 50% dos camundongos transplantados tornaram-se tolerantes à proteína hFVIII (fator VIII humano da coagulação sanguínea (Evans et al., 1998).

Recentemente, um estudo preliminar ao do rato Gunn foi realizado com o objetivo de estabelecer um quimerismo hematopoiético, transplantando células tronco da medula óssea ($Sca1^+$) transduzidas com o gene *LacZ* em camundongos previamente irradiados. Esses resultados mostraram que quando o quimerismo molecular das células hematopoiéticas excedem 1%, a tolerância à proteína estranha nos camundongos quiméricos foi atingida após a transdução do fígado *in vivo* por um vetor retroviral contendo o mesmo transgene. Foi também demonstrado que a tolerância central é transmitida a receptores secundários (Pichard et al., 2005, submetido ao “Molecular Therapy”).

Os mecanismos pelos quais a tolerância é induzida não são ainda bem definidos. Os experimentos em camundongos mostram que a produção permanente

pela medula óssea, de células hematopoiéticas do receptor e do doador poderiam criar um novo repertório de linfócitos T no timo (Zinkernagel & Althage, 1999). Os linfócitos maduros (Tian et al., 2002), reguladores (Wekerle, 2001), mas também as células dendríticas (Andersson et al., 2003) são também tipos celulares que poderiam participar do mecanismo de indução de tolerância central.

O conceito de indução de tolerância central por quimerismo molecular hematopoiético, tendo sido validado no camundongo (Evans et al., 1998; Andersson et al., 2003) foi aplicado no rato Gunn. Enquanto a obtenção do quimerismo pela transdução de células da medula óssea foi bem descrito no camundongo e no macaco, não existem marcadores de células tronco hematopoiéticas conhecidos no rato. Uma técnica de transdução no rato Gunn eliminando o máximo de células maduras por um sistema de triagem negativa (lin^{-}) foi padronizada.

Utilizando um lentivírus portador do gene que codifica a proteína GFP demonstrou-se que é possível a obtenção de um nível de quimerismo elevado no rato Sprague-Dawley (até 36%) e que este quimerismo pode permanecer estável durante vários meses. O transplante secundário demonstrou que é possível transduzir células tronco hematopoiéticas, as quais foram capazes de reconstituir o sistema hematopoiético.

Em relação ao rato Gunn, houve uma mortalidade de 28% após o transplante, o que não aconteceu quando utilizou-se o rato Sprague-Dawley por ocasião da padronização da técnica de transdução de células hematopoiéticas e do transplante. O nível de quimerismo dos ratos Gunn transplantados com $1,80 \times 10^5$ células transduzidas com MOI de 150 foi muito baixo (0,007 – 0,1 cópias/genoma haplóide). Os ratos que foram transplantados com $5,25 \times 10^5$ células e com o dobro da quantidade de vírus (MOI de 300), geraram um quimerismo mais importante (0,282 e 0,275 cópias/genoma haplóide). Entretanto, apesar do aumento do quimerismo, foi detectada a presença de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1 em todos os ratos 28 dias após a transferência gênica no fígado. Curiosamente, somente um rato (G9), conservou sua bilirrubinemia à uma baixa concentração após a transdução hepática, apesar da presença de anticorpos. Este

rato possui o nível mais elevado de quimerismo do grupo. Assim, esses resultados mostram que o nível de quimerismo poderia representar um fator limitante para a indução de tolerância à proteína hB-UDPGT1A1, após transferência gênica no fígado.

Outros experimentos estão em andamento no laboratório, para tentar aumentar o quimerismo molecular nos ratos receptores.

Esta abordagem mais recente baseia-se na técnica de vantagem seletiva das células hematopoiéticas transduzidas. Por exemplo, é possível selecionar *ex vivo* as células transduzidas por citometria de fluxo, fazendo-se co-expressar um gene que codifica uma proteína fluorescente (GFP) e o gene de interesse (no caso, um gene terapêutico).

Na seleção *in vivo*, utiliza-se um vetor de transferência gênica contendo um gene terapêutico e um gene de resistência a agentes alquilantes. Esta construção permite uma amplificação seletiva *in vivo* das células transduzidas, através do tratamento pelo agente alquilante BCNU (1,3-bis 2 cloroetil-1-nitrosurea). A alquilguanina-DNA-transferase (AGT) é uma enzima que corrige as lesões do DNA causadas pelos agentes alquilantes (como o BCNU). A O⁶-benzilguanina (BG) inativa a AGT endógena e aumenta a toxicidade do BCNU. O gene *MGMT* (P140K-mutated O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase) codifica uma forma de AGT que é resistente à inativação pela BG. Assim, as células tronco hematopoiéticas transduzidas pela forma mutante *MGMT*, vão expressar uma AGT resistente à BG e capaz de corrigir as lesões ocasionadas pelo BCNU. Essas células resistentes ao BG vão sobreviver e enriquecer a medula óssea.

Os ratos Gunn serão então transplantados com células transduzidas por um lentivírus portador dos genes *hB-UDPGT1A1* e *MGMT*. Seis semanas após o transplante, eles receberão, uma combinação de BG/BCNU pela via intraperitoneal. As células sanguíneas serão, por consequência, enriquecidas seletivamente em células transduzidas.

Estudos no camundongo e no cachorro demonstraram que o nível de quimerismo pode aumentar consideravelmente, podendo atingir em torno de 100%, após vários tratamentos com BG/BCNU (Neff et al., 2003; Persons et al., 2003; Richard et al., 2004).

Se a vantagem seletiva for também eficaz no rato Gunn, o limiar de quimerismo necessário à obtenção de tolerância em relação à proteína hB-UDPGT1A1 poderá ser avaliado. Se o quimerismo atingir valores próximos à 100%, a conjugação da bilirrubina pelas células hematopoiéticas poderá acontecer. Embora as células sanguíneas sejam numerosas, elas não possuem um citoplasma abundante e a quantidade da proteína hB-UDPGT1A1 pode ser menor quando comparada com outros tipos celulares. Um estudo *in vitro* demonstrou que os fibroblastos de ratos são capazes de conjugar a bilirrubina de modo eficaz, tanto quanto os hepatócitos (Seppen et al., 1996).

O tratamento de uma doença metabólica hereditária do fígado pela transferência gênica em células tronco hematopoiéticas, deve ser mais profundamente estudado, pois uma abordagem extra-hepática facilitaria os ensaios clínicos de terapia gênica no fígado. Este protocolo seria clinicamente aceitável, pois trata-se de um autotransplante de células geneticamente modificadas.

Capítulo II – Terapia gênica no rato Gunn recém-nascido mediada por vetores retrovirais

1. INTRODUÇÃO

Recentemente foi demonstrado que a transferência gênica em animais recém-nascidos utilizando vetores retrovirais resultou na expressão permanente da proteína terapêutica (Ponder et al., 2002). Cachorros com mucopolissacaridose tipo VII foram tratados com sucesso pela injeção de vetores retrovirais murinos contendo o gene β -glucuronidase quando administrados 2-3 dias após o nascimento (Ponder et al., 2002). Posteriormente foi demonstrado que a transferência gênica com um vetor retroviral murino contendo o gene que codifica o fator IX da coagulação sanguínea, em camundongos e cachorros recém-nascidos resultou na tolerância à proteína terapêutica estrangeira (Xu et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi avaliar se a administração em ratos Gunn recém-nascidos de um vetor retroviral contendo o gene *hB-UDPGT1A1* poderia corrigir completa e permanentemente o fenótipo, sem a eliminação dos hepatócitos corrigidos pela resposta imune.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Ratos Gunn foram criados no biotério da Faculdade de Medicina de Nantes (França). Ratos homozigotos foram obtidos pelo cruzamento de fêmeas heterozigotas (+/-) com machos homozigotos (-/-) para a mutação. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Ministério Francês de Agricultura. Ratos recém-nascidos de ambos os sexos foram utilizados no experimento.

2.2. Esquema experimental

Três grupos de ratos foram utilizados neste estudo: Grupo I (n = 9), Grupo II (n = 11) e Grupo III (n = 10). Os ratos dos grupos I e II foram injetados com os vetores retrovirais: Grupo I: vetor retroviral portador do gene *hB-UDPGT1A1* (RV-hB-UDPGT1A1); Grupo II: vetor retroviral portador do gene *nlsLacZ* (RV-*nlsLacZ*). As injeções dos vetores retrovirais acima relacionados foram feitas através da veia temporal em ratos de dois dias de idade após anestesia induzida pelo gelo.

O volume das suspensões virais (adicionadas de 8 µg/ml de polibreno) foi o seguinte:

Grupo I: 200 µl (1×10^8 p.i.) da suspensão contendo 5×10^8 p.i./ml do RV-hB-UDPGT1A1.

Grupo II: 200 µl (4×10^7 p.i.) da suspensão contendo 2×10^8 p.i./ml do RV-*nlsLacZ*.

Os ratos do grupo III foram utilizados como controles não injetados.

2.3. Análise da mutação por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Quarenta e oito horas após o nascimento, os ratos Gunn ictericos foram identificados pela presença da coloração amarelada dos tegumentos. Posteriormente, uma confirmação genética da homozigose foi realizada nos ratos adultos (idade de 6 semanas) por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Um fragmento que contém a mutação pontual no éxon comum do gene UDPGT1 (Sato et al., 1990) foi amplificado no DNA extraído dos leucócitos (item 2.5.1.1, capítulo I) utilizando os seguintes oligonucleotídeos: 5'-GGGATTCTCAGAATCTAGACATT-3' e 5'-GTGTGTGGTATAAATGCTGTAGG-3'. As amostras foram submetidas à 32 ciclos de amplificação (94°C por 30 seg para desnaturação, 55°C por 30 seg para a hibridação e 72°C por 1 min para a extensão). O fragmento amplificado (379 pb) foi analisado com e sem digestão pela enzima de restrição *Bst*NI (Roy-Chowdhury et al., 1991).

2.4. Construção e produção dos vetores retrovirais

2.4.1. Vetor RV-hB-UDPGT1A1

O vetor RV-hB-UDPGT1A1 foi construído e produzido como descrito no item 2.4.1 (capítulo I).

2.4.2. Vetor RV-*nlsLacZ*

a) Linhagem celular

Os vetores RV-*nlsLacZ* contendo o gene marcador *nlsLacZ* foram produzidos usando a linhagem celular TEL-CeB6AF7, obtidas a partir de uma linhagem de fibrossarcoma humano (Cosset et al., 1995). As células produtoras expressam de maneira estável os genes *gag* e *pol* e *env*. O gene é idêntico ao do rAAV2/5CMV*nlsLacZ*. A transcrição do gene marcador está sob o controle do LTR viral.

b) Cultura celular

As células de encapsulação foram cultivadas em 10 ml de meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM) (*Sigma*) contendo 4,5 g/L de glicose, 10% de soro bovino fetal e 100 U/ml de penicilina à 37 C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Quando as células atingiram a confluência (em torno de 90%), o sobrenadante da cultura celular foi coletado durante três dias. O sobrenadante foi então filtrado com um filtro de nitrocelulose de 0,45 µm (*Millipore*). Antes do uso, o sobrenadante foi concentrado 8-10 vezes, por um sistema de filtração tangencial (Filtros Amicon, *Millipore*). O sobrenadante da cultura celular foi utilizado em presença de polibreno (brometo de hexametadina) (*Sigma*) em uma concentração final de 8 µg/ml. Alíquotas do vetor foram armazenadas à -80°C.

c) Titulação dos vetores retrovirais

Células Te671 (também de origem de fibrossarcoma humano) foram repicadas em placas de 6 poços com densidade de 2×10^5 células/poço. Elas foram infectadas 24 h após com o sobrenadante concentrado de cultura celular em diluições seriadas (10^{-5} a

10^{-8}) (1 ml/poço). O sobrenadante foi aspirado 24 h após. As células Te671 foram fixadas durante 15 min à temperatura ambiente com uma solução de 0,5% de glutaraldeído e 1% de formaldeído diluído em PBS. As células foram então lavadas com PBS e posteriormente coradas com o protocolo X-Gal: 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D galactopyranosídeo (X-Gal) (*Promega*), 4 mmol/L de ferrocianeto de potássio, 4 mmol/L de ferricianeto de potássio e 2 mmol/L de cloreto de magnésio diluído em PBS, em um volume final de 1,5 ml/poço. A coloração foi realizada durante 12 h, à 37°C, ao abrigo da luz. O título (p.i./ml) foi calculado contando o número de células azuis nos poços e multiplicado pelos respectivos fatores de diluição. O título foi de 5×10^7 p.i./ml.

2.5. Análise da bilirrubina sérica

Seis semanas após a administração e a seguir mensalmente, a dosagem de bilirrubina foi realizada em todos os ratos como descrito no item 2.5.2 (capítulo I).

2.6. Análise da bile

A bile foi coletada por canulação do ducto biliar principal (cateter de polietileno-PF10) de três ratos 1, 2 e 3 (grupo I), 13 semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1. A presença de conjugados de bilirrubina mono e diglucuronídeos na bile foi avaliada usando a metanólise alcalina e cromatografia líquida de alta pressão (*HPLC*) (Muraca & Blanckaert, 1983). Como amostras controles foram utilizados soros de rato Wistar (controle positivo) e de rato Gunn homozigoto (controle negativo).

2.7. Biópsia hepática

Os ratos 1, 2 e 3 (grupo I) e quatro ratos (grupo II) foram anestesiados e uma laparotomia foi realizada 13 semanas e duas semanas após a injeção dos vetores RV-hB-UDPGT1A1 e RV-*nls*LacZ, respectivamente. Um fragmento de fígado (aproximadamente 10 mg) foi retirado do lobo caudado. Cada biópsia hepática foi utilizada da seguinte maneira: um fragmento para a confecção do bloco de parafina após fixação em formaldeído 3% (ratos do grupo II) e, um fragmento foi imediatamente congelado à -80°C para a PCR (ratos do grupo I). Os três ratos do grupo I foram sacrificados logo após a biópsia.

2.8. Análise da transdução hepática por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

2.8.1. Extração do DNA

Os fragmentos de fígado congelados provenientes da biópsia hepática dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I) foram colocados em 1 ml de tampão de extração contendo 10 M uréia; 10% SDS; 0,5 M EDTA; 5 M NaCl; 1 M Tris pH 7,5 e 20 mg/ml de proteinase K, durante a noite, à 37°C, sob agitação. No dia seguinte, 2,5 ml de uma mistura fenol/clorofórmio (50% v/v) foi adicionada ao lisado hepático e colocado sob agitação por 30 min à temperatura ambiente.

Uma centrifugação à 4000 rpm por 15 min foi realizada. A fase aquosa foi recuperada e precipitada com 2,5 volumes de etanol absoluto/volume da amostra. O DNA assim precipitado, foi lavado com etanol 70%, centrifugado à 2000 rpm por 5 min e depois secado à temperatura ambiente. Enfim, o DNA foi dissolvido em tampão Tris-EDTA (20.1 mM) e conservado à 4°C.

2.8.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) semi-quantitativa

A PCR semi-quantitativa foi realizada no DNA extraído de amostras do tecido hepático dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I) utilizando os seguintes oligonucleotídeos para o gene *hB-UDPGT1A1*: 5'-TCTGCTATGCTTTTGTCTGG-3' e 5'-GGATAGTGGATTTTGGTGAA-3'. A amplificação foi realizada pela desnaturação por 5 min à 94°C, seguida de 28 ciclos de amplificação (94°C por 20 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 40 seg) e extensão final por 10 min à 72°C. PCR foi realizada em 30 µl de tampão de amplificação contendo 500 ng do DNA genômico; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo; 2,5 U de Taq Polimerase; 1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de cada dNTP para a extensão. O tamanho do fragmento amplificado foi de 504 bp. O controle de amplificação do DNA foi realizado com os oligonucleotídeos complementares à uma seqüência de 202 bp do promotor do gene da PEPCK (fosfoenol piruvato carboxiquinase) de rato: 5'-GTCATATTTCTTCAGCTTGCGG-3' e 5'-ATAATGGTCTGGACTTCTCTGC-3'. A curva padrão foi construída diluindo-se o DNA humano em várias proporções com o DNA de rato.

2.8.3. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa

A PCR quantitativa foi realizada no DNA extraído de amostras do tecido hepático dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I) como descrito no item 2.5.1.3 (capítulo I).

A curva padrão foi construída diluindo-se o DNA humano em várias proporções com o DNA de rato.

2.9. Análise por Western Blot em lisado hepático

Para a verificação da proteína hB-UDPGT1A1 foi utilizada a técnica de *Western Blot*, em lisado hepático dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I) obtido da biópsia hepática (13 semanas após a injeção do RV-hB-UDPGT1A1). Primeiramente, foram isolados microsomas hepáticos totais por ultracentrifugação. Aproximadamente 1 grama de fígado foi triturado no Ultraturax® em tampão contendo: 0,25 M de sucrose, 10mM de Tris-HCL pH 7,4, 1 mM de EDTA e inibidor de protease *Complete-Roche®-1X*. O lisado hepático foi então ultracentrifugado à 100.000 g durante 1 h. O sobrenadante protéico foi dosado pelo método de Lowry modificado (*Biorad Protein Assay DC*).

As proteínas hepáticas (40 µg) foram migradas através de eletroforese em gel de acrilamida 10% (*Sigma*). Após eletroforese, foi feita a transferência em membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham Biosciences*) à 200 mA. Em seguida, a membrana foi colocada em solução contendo: 5% de leite em pó desnatado, 0,5% de Tween 20 e anticorpo primário WP1 diluído 1:5000. O anticorpo WP1 interage com o domínio comum carboxi-terminal das isoformas UDPGT1 humanas (Peters et al., 1987). O período de incubação foi de aproximadamente 12 h. Duas lavagens sucessivas com PBS e 0,1% de Tween 20 foram feitas e o anticorpo secundário biotinizado (*Biotinylated conjugated anti-mouse Ig F'ab fragment, RPN 1021, Amersham Biosciences*) foi colocado na diluição 1:2000. A revelação foi feita utilizando o kit *Streptavidin-horseradish peroxidase, RPN 2106, Amersham Biosciences*. Microsomas de fígado humano foram utilizados como controle positivo.

2.10. Imunohistoquímica β -galactosidase em biópsia hepática

A quantificação dos hepatócitos que expressavam β -galactosidase em quatro ratos do grupo II foi verificada duas semanas após a injeção do vetor RV-*nlsLacZ*. A presença de β -galactosidase foi avaliada por imunohistoquímica em cortes histológicos de parafina (5 μ m). A parafina foi retirada dos cortes, e a peroxidase endógena dos mesmos foi inibida através da incubação durante 30 min, em solução de H₂O₂ 3% em PBS. O anticorpo primário policlonal anti- β -galactosidase de coelho (*Chemicon International Inc.*) diluído 1:2.000 em PBS contendo albumina humana (2% p/v) e Tween 20 (0,1% v/v) foi aplicado durante a noite à 4°C. As células positivas foram visualizadas com anticorpo biotilado anti-IgG (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*) e com o sistema de revelação estreptavidina-peroxidase usando como substrato cromogênico o amino-etil carbazol (AEC) (*Vector Laboratories*).

As lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina e a porcentagem de células β -galactosidase positivos (núcleos azuis) foi calculada pela contagem em 10 campos, no aumento de 40x.

2.11. Análise da distribuição do transgene

A distribuição do transgene *hB-UDPGT1A1* foi avaliada em vários órgãos (fígado, baço, rim, coração, pulmão, gônadas, timo, músculo, intestino, pâncreas e medula óssea) dos ratos 4 e 5 (grupo I) por PCR e por RT-PCR (rato 4), 34 semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1

a) Análise por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A PCR foi realizada como descrito no item 2.8.2.

b) Análise do RNA (RT-PCR: *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*)

No método de RT-PCR, inicialmente o RNA total ou RNAm é isolado da amostra e convertido em seu DNA complementar (DNAc). A seguir, o DNAc é amplificado através da PCR com oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse. A quantidade de DNAc reflete a quantidade de RNAm o qual, por sua vez, reflete o grau de transcrição do gene e também, em geral, a quantidade da proteína sintetizada.

O RNA total foi extraído de vários tecidos (fígado, rim, coração, músculo, intestino e pulmão) do rato 4 (grupo I) utilizando-se o kit *Nucleospin RNA II* (*Macherey-Nagel, Hoerd, France*). O DNAc (RT-PCR) foi obtido utilizando-se o oligo (dT) *primer* (*Amersham Pharmacia*) e 400 ng de RNA. A PCR foi realizada com 2 µl de DNAc e os oligonucleotídeos descritos no item 2.8.2.

Como controle de extração de RNA, foi realizada a RT-PCR e PCR em um fragmento do RNA correspondente à unidade S6 ribossomal. O tamanho do fragmento amplificado foi de 147 pb.

2.12. Detecção de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1

A presença de anticorpos dirigidos contra a hB-UDPGT1A1 no soro de todos os ratos do grupo I foi avaliada entre 6 e 42 semanas após a administração do vetor

RV-hB-UDPGT1A1, por ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), como descrito no ítem 2.5.3 (capítulo I).

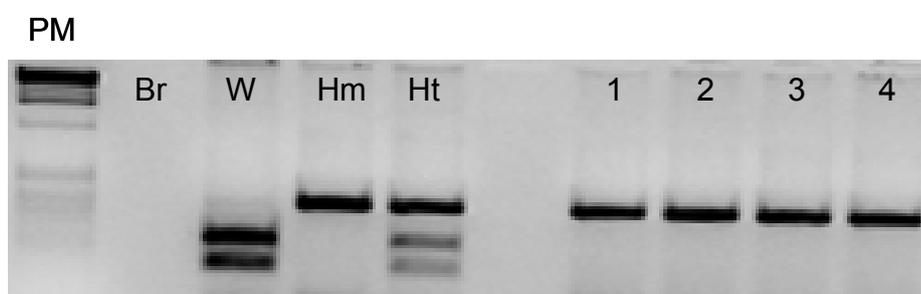
2.13. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student's. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

A mutação pontual no terceiro éxon do gene *UDPGT1* foi confirmada para todos os ratos, com 6 semanas de idade. Como exemplo, o perfil eletroforético dos ratos 1, 2, 3 e 4 (grupo I) encontra-se na figura 17.

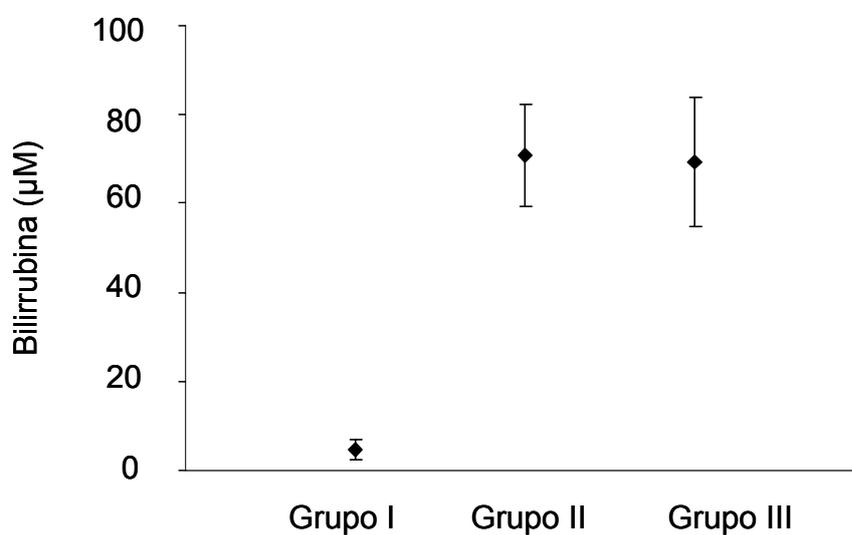
FIGURA 17. Análise genotípica da mutação no éxon 3 do gene *UDPGT1* por PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *Bst*NI



PM: marcador de peso molecular; Br: branco de PCR; W: rato Wistar, 149 e 230 pb; Hm: rato Gunn $-/-$, 379 pb; Ht: rato Gunn $-/+$, 149, 230 e 379 pb; 1-4: ratos do grupo I. Sítio de restrição da enzima *Bst*NI (*BioLabs*): 5'...CCWGG...3'
3'...GGWCC...5'

Com seis semanas de idade, a bilirrubina sérica foi dosada em todos os ratos. A bilirrubinemia foi semelhante nos grupos II e III ($70,7 \pm 11,5 \mu\text{M}$ e $69,2 \pm 14,6 \mu\text{M}$, respectivamente) (NS) (Figura 18). Em compensação, a bilirrubinemia ($4,56 \pm 2,19 \mu\text{M}$) dos ratos injetados com o vetor RV-hB-*UDPGT1A1* (grupo I) diminuiu para valores semelhantes aos dos ratos Gunn heterozigotos ($< 10 \mu\text{M}$). Esses valores foram significativamente diferentes quando comparados com os grupos controles ($p < 0,0001$).

FIGURA 18. Nível sérico de bilirrubina seis semanas após transferência gênica nos ratos



Grupo I (n=9): ratos injetados com o RV-hB-UDPGT1A1; grupo II (n=7): ratos controles injetados com o RV-*nlsLacZ*; grupo III (n=10): ratos controles não injetados. Os dados de cada grupo representam a média \pm desvio padrão dos valores de bilirrubina.

Esses valores indicam que a correção do fenótipo foi rápida e completa, podendo ser ilustrada com a mudança na coloração do soro: amarela para os ratos controles e transparente para os ratos tratados (Figura 19).

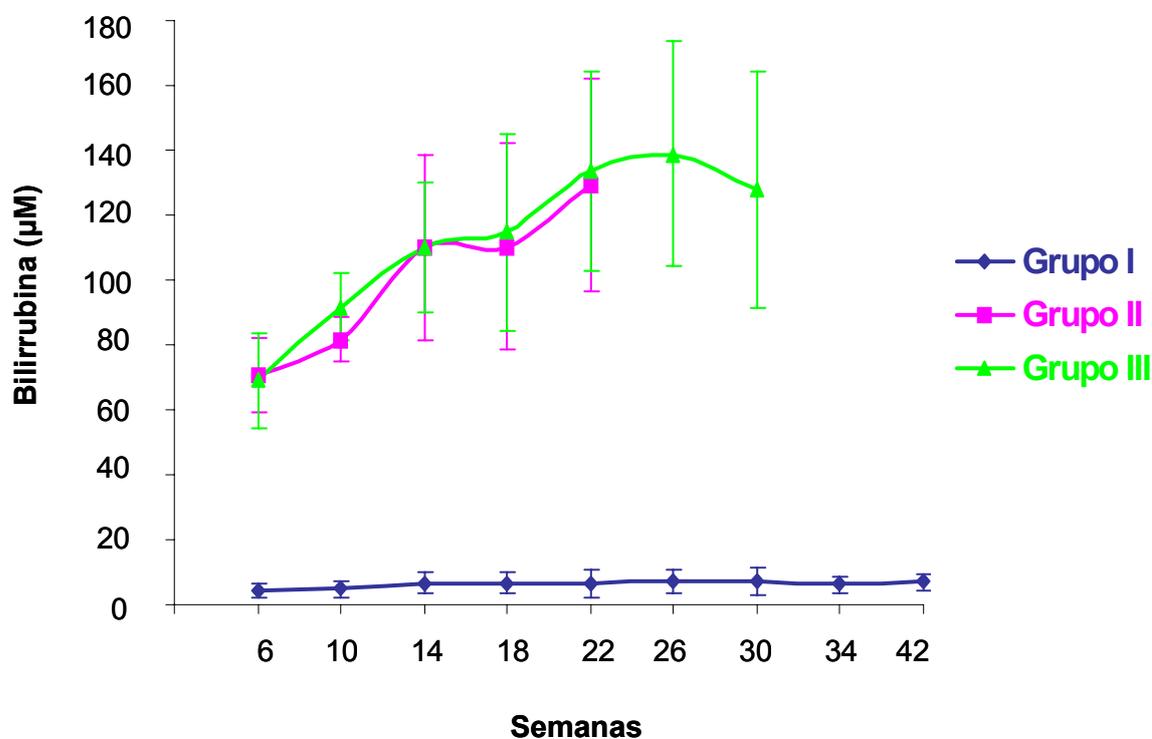
FIGURA 19. Fotografia do soro de ratos Gunn com seis semanas de idade



Esquerda: soro de um rato Gunn homozigoto não tratado (grupo III). Direita: soro do rato 1 (grupo I) tratado com o vetor RV-hB-UDPGT1A1.

Posteriormente, foi avaliada a persistência a longo prazo da correção do fenótipo nos ratos tratados. O nível de bilirrubina sérica permaneceu em níveis normais durante 42 semanas para o grupo I (Figura 20). Em compensação, a bilirrubinemia dos ratos controles aumentou para valores próximos de $100 \mu\text{M}$.

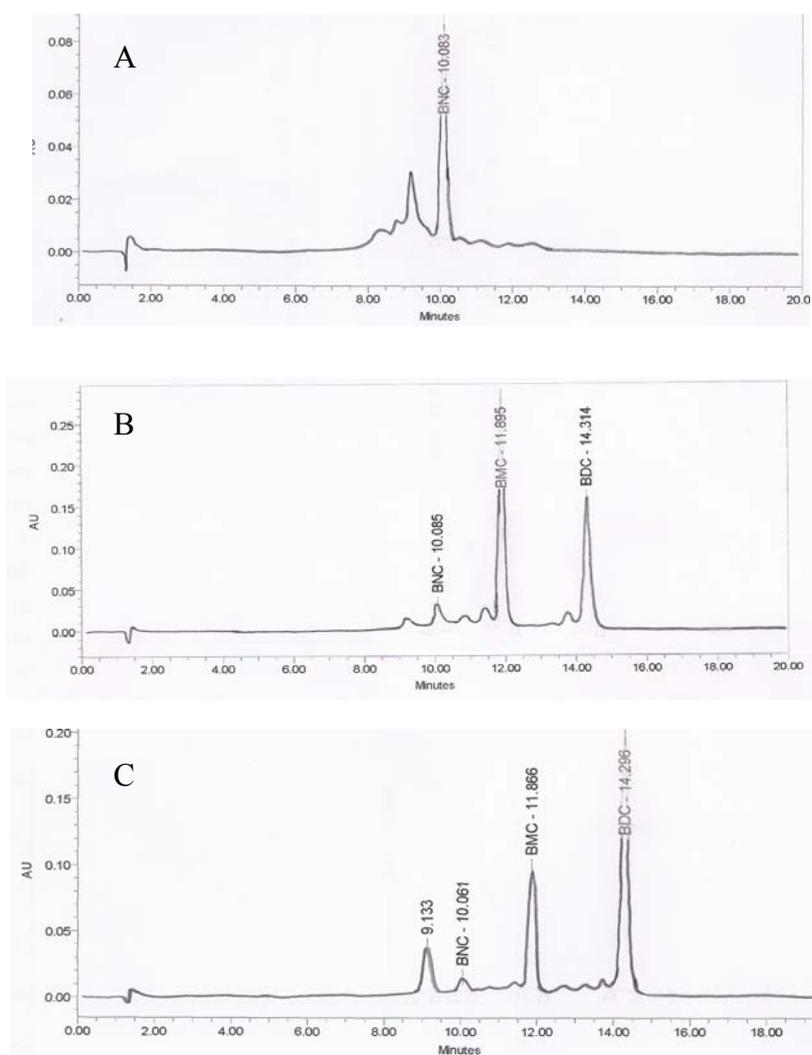
FIGURA 20. Análise da bilirrubina sérica dos ratos a longo tempo



Grupo I (6 semanas: n=9; 10 semanas: n=9; 14 – 34 semanas: n=6; 42 semanas: n=4): ratos injetados com o RV-hB-UDPGT1A1; grupo II (n=7): ratos controles injetados com o RV-*nlsLacZ*; grupo III (n=10): ratos controles não injetados. Os dados de cada grupo representam a média \pm desvio padrão dos valores de bilirrubina obtidos.

A fim de documentar a glucuronidação da bilirrubina hepática nos ratos tratados, a bile foi coletada dos ratos 1, 2 e 3 do grupo I, 13 semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1. A presença de mono- e diglucuronídeos de bilirrubina foi analisada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os histogramas representativos do rato 1 do grupo I e dos controles (rato Gunn -/- e rato Wistar) são mostrados na figura 21.

FIGURA 21. Perfil cromatográfico dos glucuronídeos de bilirrubina do rato 1 (grupo I), treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1



Os cromatogramas foram obtidos da bile de rato Gunn $-/-$ (A), de rato Wistar (B) e do rato 1 (grupo I) (C). BNC: bilirrubina não conjugada; BMC: bilirrubina monoglucuronídeo; BDC: bilirrubina diglucuronídeo.

As proporções relativas dos vários tipos de bilirrubina nos cromatogramas foram calculadas e são apresentadas na tabela 8. A quantidade de bilirrubina não conjugada diminui consideravelmente nos ratos tratados. A quantificação precisa da proporção dos glucuronídeos de bilirrubina mostrou que eles contribuem em mais de 80% dos pigmentos biliares nos três ratos tratados do grupo I. Essas concentrações são quase idênticas às concentrações no rato Wistar, cuja bilirrubina não conjugada varia em torno de 1-5% dos pigmentos biliares.

Interessantemente, nos ratos injetados, existe uma predominância de diglucuronídeos de bilirrubina (por exemplo: 65,2% versus 21,33% para monoglucuronídeos) quando comparado com o rato Wistar, o qual tem uma predominância de monoglucuronídeos. Esta constatação pode ser explicada pelas altas concentrações da enzima em uma pequena proporção de hepatócitos transduzidos, e também pela forte atividade do promotor viral.

TABELA 8. Quantificação de glucuronídeos de bilirrubina na bile dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I), treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1

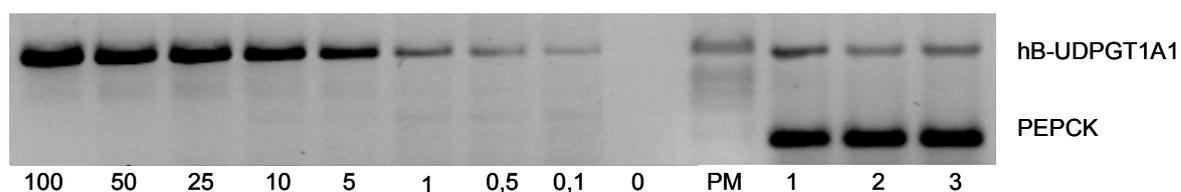
Ratos	Bilirrubina Não conjugada (%)	Bilirrubina Monoglucuronídeos (%)	Bilirrubina Diglucuronídeos (%)	Bilirrubina Sérica (µM)
Rato 1	15,46	17,34	67,20	2
Rato 2	12,82	25,62	61,56	4
Rato 3	12,13	21,03	66,84	3
média	13,47 ± 1,76	21,33 ± 4,15	65,20 ± 3,16	
Gunn	100	0	0	
Wistar	5,45	57,50	37,05	

Ratos 1,2 e 3 (grupo I)

Para a análise da transdução hepática no grupo I três ratos (1, 2 e 3) foram sacrificados treze semanas após a injeção do RV-hB-UDPGT1A1. A presença do

transgene nas amostras de DNA extraído do fígado foi analisada por PCR semi-quantitativa. Um sinal positivo foi obtido nos ratos tratados e foi comparado com curva padrão. A proporção estimada de células transduzidas estava em torno de 1-5% para os ratos do grupo I (Figura 22). Esse valor foi confirmado por PCR quantitativa, a qual revelou a presença de 11%, 4% e 18% de células transduzidas no fígado dos ratos 1, 2 e 3 (Tabela 9). Esses valores não puderam também ser reproduzidos pela técnica de imunohistoquímica, pelo fato de que o anticorpo WP1 produz muito artefato de técnica.

FIGURA 22. Análise da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) semi-quantitativa no DNA extraído do fígado de ratos do grupo I, treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1



Ratos do grupo I (1, 2 e 3). PEPCK: amplificação do fragmento do promotor do gene PEPCK. Curva padrão obtida pela mistura de diferentes proporções de DNA genômico humano e de rato (0-100). PM: marcador de peso molecular.

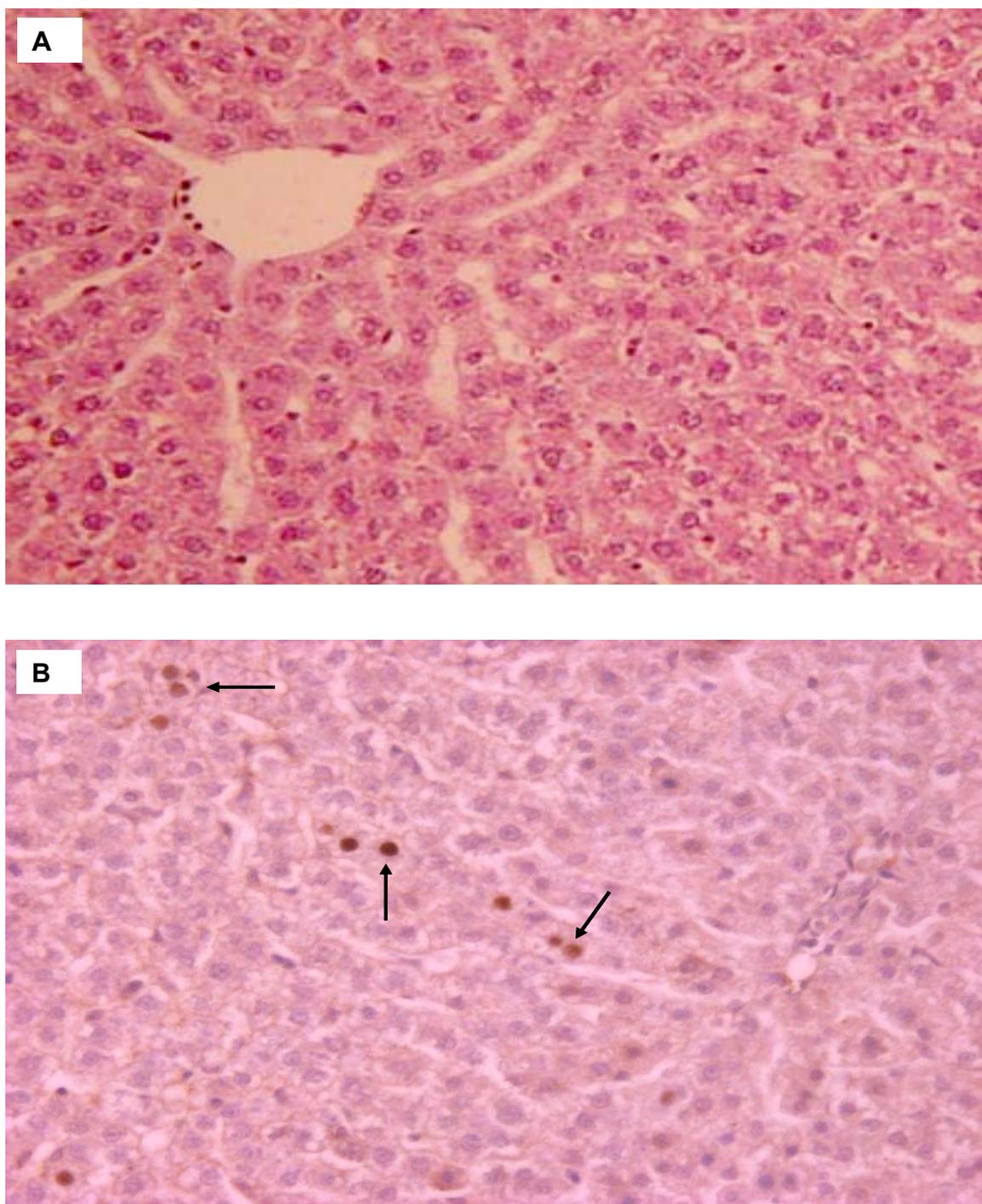
TABELA 9. Valores da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa na curva padrão e no DNA dos ratos tratados (grupo I), treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1

Curva Padrão (% DNA humano)	Ct (ciclo limiar)
100	17,3
50	19,0
25	19,3
10	21,6
5	22,3
1	24,8
0,5	26,3
0,1	27,3
branco	40
Ratos	
1	21,0
2	22,6
3	20,2

Curva padrão (0,1-100); ratos 1, 2 e 3 (grupo I)

Entretanto, para avaliar a transferência gênica nos hepatócitos dos ratos recém-nascidos, a detecção imunohistoquímica da β -galactosidase no fígado de quatro ratos controles (grupo II) foi realizada, duas semanas após a injeção. A análise imunohistoquímica revelou que $2 \pm 0,78\%$ dos hepatócitos expressavam a β -galactosidase (Figura 23). Pelo fato de que existe uma diferença na quantidade (2,5 vezes) de partículas virais injetadas entre o grupo I e II (1×10^8 versus 4×10^7 , respectivamente), e que a transdução dos hepatócitos é proporcional à quantidade de partículas injetadas, espera-se que o nível de transdução após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1 seja em torno de 5%. Esta estimativa está de acordo com os resultados dos experimentos de PCR quantitativa que revelaram a presença de 4 a 18% de células transduzidas pelo RV-hB-UDPGT1A1.

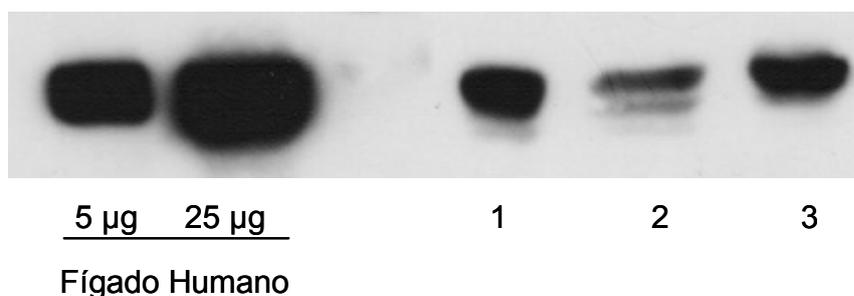
FIGURA 23. Detecção imunohistoquímica de hepatócitos expressando β -galactosidase em ratos do grupo II, duas semanas após a injeção do vetor RV-*nlsLacZ*



A: fígado não transduzido de um rato controle . B: fígado de um rato transduzido pelo RV-*nlsLacZ* (grupo II). Coloração: hematoxilina/eosina. Aumento: 400X

A expressão do transgene veiculado pelo vetor RV-hB-UDPGT1A1 foi avaliada por Western Blot nos microsossomos hepáticos dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I), 13 semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1 (Figura 24). A detecção de uma banda de 52 kD foi observada em todos os ratos, como no controle positivo (fígado humano). No rato 2, o sinal obtido foi o mais fraco, concordando com os experimentos de PCR.

FIGURA 24. Análise por Western Blot da proteína hB-UDPGT1A1 no fígado dos ratos 1, 2 e 3, treze semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1

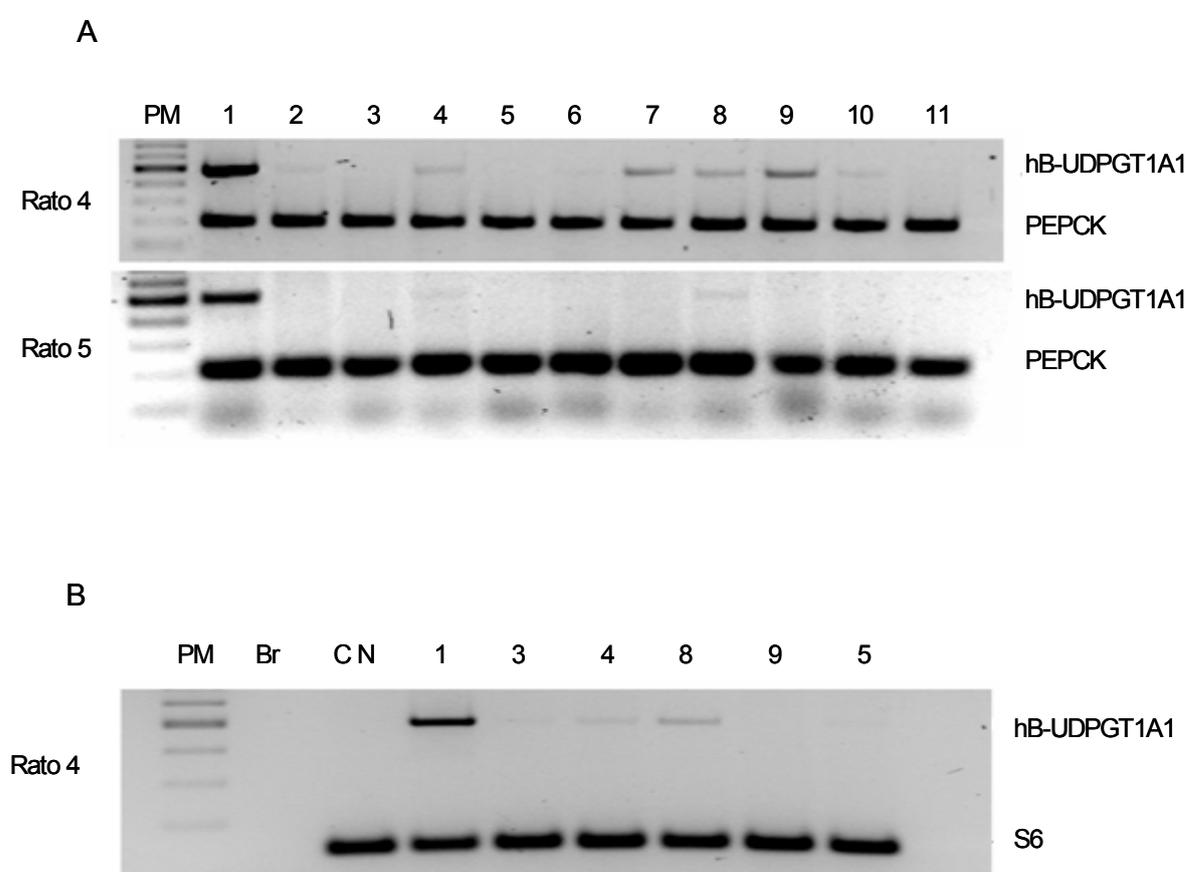


Microsossomos hepáticos dos ratos 1, 2 e 3 (grupo I). Microsossomos de fígado humano: controle positivo (5 µg e 25 µg).

A distribuição do transgene foi avaliada em diversos órgãos (fígado, baço, rim, coração, pulmão, gônadas, timo, músculo, intestino, pâncreas e medula óssea) dos ratos 4 e 5 (grupo I) por PCR e por RT-PCR, 34 semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1 (Figura 25). A PCR revelou um sinal intenso da proteína hB-UDPGT1A1 no fígado dos dois ratos e fracamente positivo no coração, timo, músculo e intestino do rato 4. Entretanto, estes tecidos no rato 5 mostraram-se negativos. A presença do transgene não foi detectada em células da linhagem germinativa (Figura 25A). A RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) demonstrou que o fígado foi o órgão onde ocorreu maior transcrição do transgene (Figura 25B). A análise densitométrica dos sinais revelou que o músculo e o coração (rato 4) contém 1,5% e 2,8%, respectivamente, do sinal presente no fígado. A transcrição do transgene

no intestino não foi detectada. O fígado contribuiu com pelo menos 90% da atividade da hB-UDPGT1A1, indicando que a conjugação da bilirrubina em tecidos extra-hepáticos foi muito fraca ou ausente.

FIGURA 25. Distribuição do transgene *hB-UDPGT1A1* em vários órgãos dos ratos 4 e 5 por PCR e RT-PCR, trinta e quatro semanas após a injeção do vetor RV-hB-UDPGT1A1



A. DNA analisados (ratos 4 e 5): 1: fígado; 2: baço; 3: rim; 4: coração; 5: pulmão; 6: gônadas; 7: timo; 8: músculo; 9: intestino; 10: pâncreas; 11: medula óssea. B. RNA total extraído dos tecidos que foram positivos nos experimentos de PCR (rato 4) e submetidos à RT-PCR. 1: fígado; 3: rim; 4: coração; 8: músculo; 9: intestino; 5: pulmão. S6: amplificação do fragmento do gene que codifica a porção ribossomal S6. PEPCK: amplificação do fragmento do promotor do gene PEPCK. PM: marcador de peso molecular.

Finalmente, foi verificado em todos os ratos do grupo I que nenhuma resposta imune contra a hB-UDPGT1A1 ocorreu. A dosagem de anticorpos anti-hB-

UDPGT1A1 por ELISA revelou-se negativa até 42 semanas após a transdução do fígado pelos vetores RV-hB-UDPGT1A1.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, a transferência gênica neonatal *in vivo* mediada por vetores retrovirais resultou na correção completa da hiperbilirrubinemia em ratos Gunn. Esta correção é acompanhada da secreção de glucuronídeos de bilirrubina na bile, confirmando o sucesso da transdução hepática. Além disso, a correção gênica é mantida e a ausência de resposta imune contra o produto do transgene favorece a expressão a longo prazo do transgene.

A transdução parcial das células hepáticas pode ser suficiente para a cura biológica, uma vez que a bilirrubina em excesso pode ser capturada e metabolizada por um número limitado de hepatócitos. Esse fato foi sugerido em estudo prévio, no qual hepatócitos singênicos transduzidos com um vetor retroviral portador do gene *hB-UDPGT1A1*, foram transplantados em ratos Gunn. Os autores assumiram que uma repopulação do fígado de apenas 2,5% obtida por hepatócitos transplantados conseguiu diminuir em torno de 40% a bilirrubina sérica (Tada et al., 1998).

Um exemplo foi o primeiro protocolo clínico de transplante de hepatócitos alogênicos em pacientes com síndrome de Crigler-Najjar tipo I: o restabelecimento de 5,5% da atividade enzimática normal reduziu em 50% a bilirrubina sérica (Fox et al., 1998). Na síndrome de Crigler-Najjar tipo I o parênquima hepático é normal ao longo da doença, fazendo com que os hepatócitos sejam acessíveis aos vetores de transferência gênica.

Os vetores retrovirais são capazes de integrar o transgene no genoma das células transduzidas, sendo que a proporção de células transduzidas é constante durante o crescimento. Em animais jovens, o crescimento hepático ativo torna possível a integração de vetores retrovirais, uma vez que os mesmos necessitam das frequentes divisões celulares para integrar o seu genoma nos hepatócitos. A integração no genoma garante a expressão permanente do transgene, por mais que a divisão celular

subseqüente ocorra. Isto é particularmente importante quando a terapia gênica é planejada para o tratamento de crianças.

Vários estudos têm demonstrado a eficácia da terapia gênica mediada por vetores retrovirais em animais recém-nascidos, principalmente no que diz respeito à mucopolissacaridose tipo VII (Xu et al., 2002; Ponder et al., 2002; Ponder, 2003, Mango et al., 2004) e a hemofilia B (Xu et al., 2003; Zhang et al., 2004). Resultados encorajadores, principalmente em relação à correção do fenótipo da doença, bem como a expressão a longo prazo do transgene, motivaram o planejamento deste experimento.

A indução de tolerância à proteína hB-UDPGT1A1 poderia ser explicada pela imaturidade do sistema imune no rato recém-nascido, uma vez que o promotor LTR pode ser expresso pelas células apresentadoras de antígenos, e por conseqüência induzir uma resposta imune. Tal hipótese poderia ser testada pela administração de um vetor retroviral portador do mesmo transgene nesses ratos, após uma hepatectomia parcial. A avaliação da presença de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1, bem como da bilirrubina sérica, poderia confirmar se os ratos são realmente tolerantes. A hepatectomia, como todo procedimento cirúrgico invasivo, pode representar um “sinal de perigo” e provocar a liberação de citocinas, que podem ativar toda a cascata de reações imunológicas, ativando principalmente linfócitos T. De fato, a produção de citocinas, tais como a IL-4 e IL-5, são consideravelmente reduzidas nos linfócitos dos neonatos humanos, e uma resposta imune importante nos recém-nascidos parece ser decorrente de um estímulo inflamatório (Brown & Lillicrap, 2002).

Uma outra questão que merece ser considerada quando da utilização vetores de transferência gênica que se integram no genoma da célula alvo, é a mutagênese insercional, como foi bem mostrada em um recente ensaio de terapia gênica para a imunodeficiência ligada ao cromossomo X (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Acredita-se que o risco de transformação maligna após a transferência gênica *in vivo* no fígado seja baixa e que não comprometa a razão risco/benefício para doenças genéticas graves.

O estudo da biodistribuição realizado em 2 ratos do grupo I (RV-hB-UDPGT1A1), revelou que a transdução foi fortemente positiva no fígado e fracamente positiva no coração, timo, músculo, intestino, pâncreas. Este achado é coerente com a presença do endotélio fenestrado no fígado, indispensável ao extravasamento das partículas virais. Isto pode explicar a discrepância entre estes resultados e aqueles obtidos após a injeção *in utero* de vetores lentivirais (Seppen et al., 2003). A porosidade do sistema vascular em desenvolvimento durante o crescimento fetal pode explicar porque outros órgãos, além do fígado, foram transduzidos naquele estudo.

A transferência gênica no fígado de ratos Gunn recém-nascidos mediada por vetores retrovirais mostrou-se eficaz. Entretanto, em humanos, o diagnóstico genético da doença pode não ser detectado nos primeiros dias de vida, e os pacientes destinados à terapia gênica neonatal não devem ultrapassar a idade de 2-3 meses.

A concretização de tal protocolo no ser humano para futuras aplicações clínicas, não acontecerá antes que outros estudos pré-clínicos em primatas sejam realizados, embora não exista nesta espécie, um modelo da doença, como é o caso do rato Gunn. O estudo poderia ser feito utilizando genes marcadores como o LacZ e GFP, dando ênfase ao mecanismo de tolerância ao produto do transgene.

Capítulo III – Terapia gênica no rato Gunn recém-nascido mediada por vetores lentivirais

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, foi demonstrado que a administração de vetores lentivirais contendo o gene *hB-UDPGT1A1* durante a vida fetal em ratos Gunn resultou na correção parcial da bilirrubinemia, cujos valores permaneceram estáveis por um período de aproximadamente um ano (Seppen et al., 2003). Dentro do mesmo contexto, foi demonstrado que a administração de vetores retrovirais contendo o gene que codifica o fator IX da coagulação sanguínea em camundongos recém-nascidos resultou na expressão prolongada da proteína, sem a indução de resposta imune (Xu et al., 2003).

Baseado nesses resultados, o objetivo deste experimento foi avaliar se a administração em ratos Gunn recém-nascidos do vetor lentiviral contendo o gene *hB-UDPGT1A1*, poderia resultar na correção completa e permanente do fenótipo sem eliminação dos hepatócitos corrigidos, pela resposta imune.

A particularidade do vetor lentiviral contendo o gene *hB-UDPGT1A1* é que ele possui um promotor hépato-específico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Os ratos Gunn utilizados neste experimento tiveram a mesma procedência daqueles descritos no item 2.1 (capítulo II).

2.2. Esquema experimental

Três grupos de ratos Gunn recém-nascidos foram utilizados neste estudo: Grupo I (n = 7), Grupo II (n = 6) e Grupo III (n = 10). Os ratos dos grupos I e II foram injetados com os vetores lentivirais: Grupo I: vetor lentiviral portador do gene *hB-UDPGT1A1* (HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1); Grupo II: vetor lentiviral portador do transgene *GFP* (HIV-mTTR-GFP). As injeções dos vetores lentivirais acima relacionados foram feitas através da veia temporal em ratos de dois dias de idade após anestesia induzida pelo gelo.

O volume das suspensões virais (adicionadas de 8 µg/ml de polibreno) foi o seguinte:

Grupo I: 50 µl (5×10^8 p.i.) da suspensão contendo 1×10^{10} p.i./ml do HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1.

Grupo II: 50 µl (5×10^8 p.i.) da suspensão contendo 1×10^{10} p.i./ml do HIV-mTTR-GFP.

O ratos do grupo III foram utilizados como controles não injetados.

2.3. Análise da mutação por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A confirmação genética da homozigose foi realizada nos ratos adultos como descrito no item 2.3 (capítulo II).

2.4. Construção e produção dos vetores lentivirais

Os vetores lentivirais foram produzidos como detalhado no item 2.2.2.1 (capítulo I). Neste caso, o transgene *hB-UDPGT1A1* está sob controle transcricional do promotor hépato-específico mTTR (*murine transthyretin*) fusionado com um intensificador (*enhancer*) sintético hépato-específico (Costa & Grayson, 1991; Nguyen et al., submetido). O vetor HIV-mTTR-GFP possui também o mesmo promotor. O título dos vetores foi de 1×10^{10} p.i./ml.

2.5. Análise da bilirrubina sérica

Seis semanas após a administração e a seguir mensalmente, a dosagem de bilirrubina foi realizada como descrito no item 2.5 (capítulo II).

2.6. Análise da bile

A bile foi coletada por canulação do ducto biliar principal (cateter de polietileno-PF10) de três ratos E, F e G (grupo I), 22 semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1.

A bile foi analisada como descrito no item 2.6 (capítulo II).

2.7. Biópsia hepática

Os ratos E, F e G (grupo I) e cinco ratos (grupo II) foram anestesiados e uma laparotomia foi realizada 22 semanas após a injeção dos vetores HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1 e HIV-mTTR-GFP, respectivamente. Um fragmento de fígado (aproximadamente 10 mg) foi retirado do lobo caudado. Cada biópsia hepática foi utilizada da seguinte maneira: um fragmento para a confecção do bloco de parafina após fixação em formaldeído 3% (ratos do grupos II) e, um fragmento foi imediatamente congelado à -80°C para a PCR (ratos do grupo I).

2.8. Análise da transdução hepática por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As análises de PCR semi-quantitativa, PCR quantitativa e Western Blot nos ratos E, F e G (grupo I) foram realizadas 22 semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1 como descrito nos itens 2.8, 2.8.1, 2.8.2, 2.8.3 e 2.9 (capítulo II).

2.9. Imunohistoquímica GFP em biópsia hepática

Em cinco ratos do grupo II, a quantificação dos hepatócitos GFP positivos por imunohistoquímica foi feita da mesma maneira como descrito no item 2.10 (capítulo II). O anticorpo anti-GFP (*Living Colors Monoclonal antibody-JL8, BD Biosciences*) foi diluído 1:100 em PBS contendo BSA (2% p/v) e Tween 20 (0,1% v/v).

2.10. Análise da distribuição do transgene

A distribuição do transgene *hB-UDPGT1A1* foi avaliada em vários órgãos (fígado, baço, rim, coração, pulmão, testículo, músculo, intestino, medula óssea e pâncreas) dos ratos A e B (grupo I) por PCR, 42 semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1. A PCR foi realizada como descrito no item 2.11-a (capítulo II).

2.11. Detecção de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1

A presença de anticorpos dirigidos contra a hB-UDPGT1A1 no soro de todos os ratos do grupo I foi avaliada entre 6 e 42 semanas após a administração do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1, por ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), como descrito no item 2.5.3 (capítulo I).

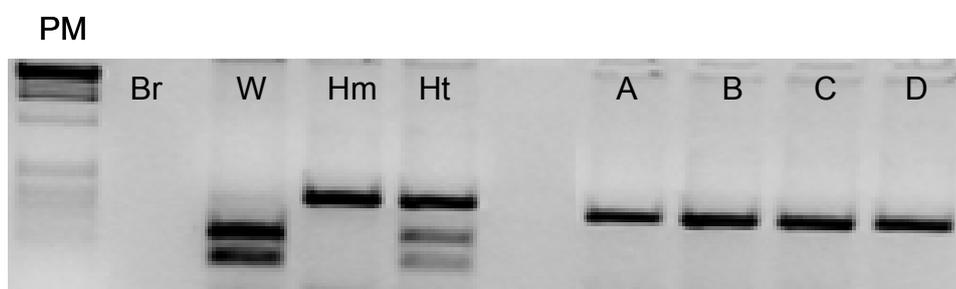
2.12. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o teste *t* de Student's. O valor de *P* <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

A mutação pontual no terceiro éxon do gene UDPGT1 foi confirmada para todos os ratos. Como exemplo, o perfil eletroforético dos ratos A, B, C e D (grupo I) é mostrado na figura 26.

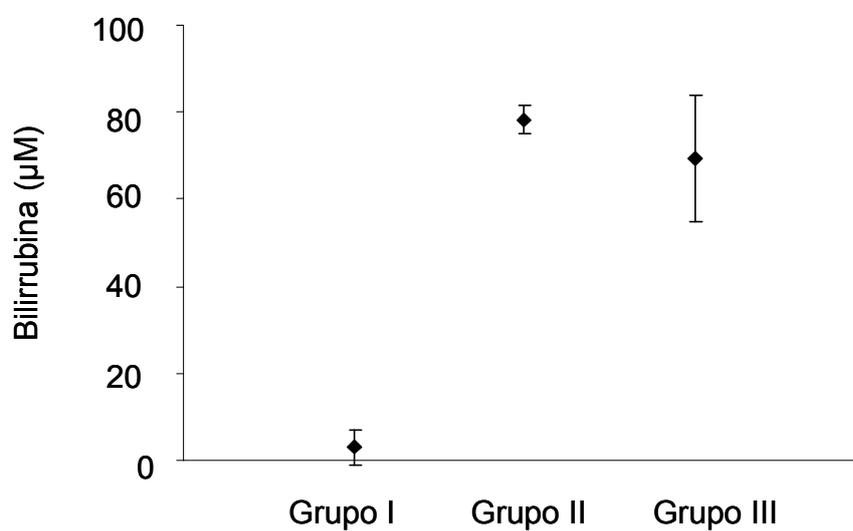
FIGURA 26. Análise genotípica da mutação no éxon 3 do gene UDPGT1 por PCR-RFLP



PM: marcador de peso molecular; Br: branco de PCR; W: rato Wistar, 149 e 230 pb; Hm: rato Gunn $-/-$, 379 pb; Ht: rato Gunn $-/+$, 149, 230 e 379 pb; A-D: ratos do grupo I. Sítio de restrição da enzima BstNI (*BioLabs*): 5'...CCWGG...3'
3'...GGWCC...5'

Com seis semanas de idade, a bilirrubina sérica foi dosada em todos os ratos. A bilirrubinemia foi semelhante nos grupos II e III ($78,33 \pm 3,2 \mu\text{M}$ e $69,2 \pm 14,6 \mu\text{M}$, respectivamente (NS) mostrando que a injeção do vetor lentiviral HIV-mTTR-GFP não afeta a hiperbilirrubinemia (Figura 27). Em compensação, no grupo I a bilirrubinemia ($3,43 \pm 5,56 \mu\text{M}$) diminuiu para valores semelhantes aos de ratos Gunn heterozigotos ($< 10 \mu\text{M}$). Esses valores foram significativamente diferentes quando comparados com os grupos controles ($p < 0,0001$).

FIGURA 27. Nível sérico de bilirrubina seis semanas após transferência gênica nos ratos



Grupo I (n=7): ratos injetados com o HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1; grupo II (n=6): ratos injetados com o HIV-mTTR-GFP; grupo III (n=10): ratos controles não injetados. Os dados de cada grupo representam a média \pm desvio padrão dos valores de bilirrubina.

Esses valores indicam que a correção do fenótipo foi rápida e completa, podendo ser ilustrada com a mudança na coloração do soro: amarela para os ratos controles e transparente para os ratos tratados (Figura 28).

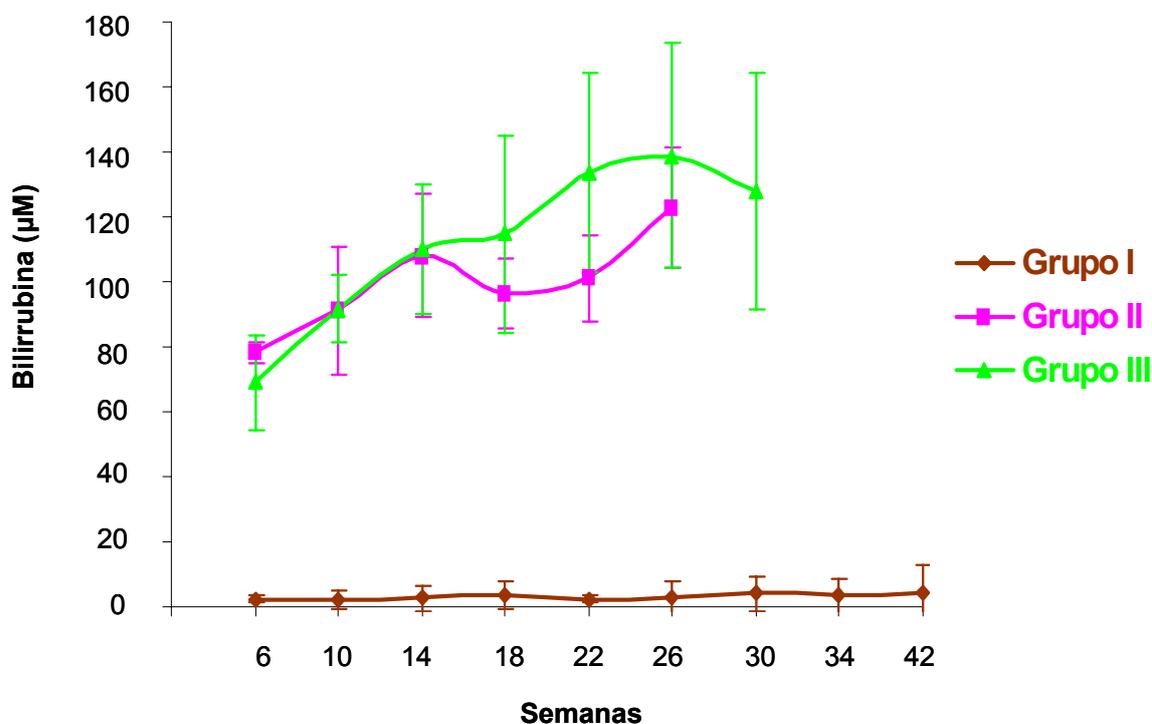
FIGURA 28. Fotografia do soro de ratos Gunn com seis semanas de idade



Esquerda: soro de um rato Gunn homozigoto não tratado (grupo III). Direita: soro do rato A (grupo I): tratado com o vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1

Os níveis de bilirrubina sérica foram posteriormente monitorados mensalmente. A correção do fenótipo foi estável e a bilirrubinemia permaneceu em níveis normais durante 42 semanas para o grupo I (Figura 29). Em compensação, a bilirrubinemia dos ratos controles aumentou para valores próximos de 100 μM .

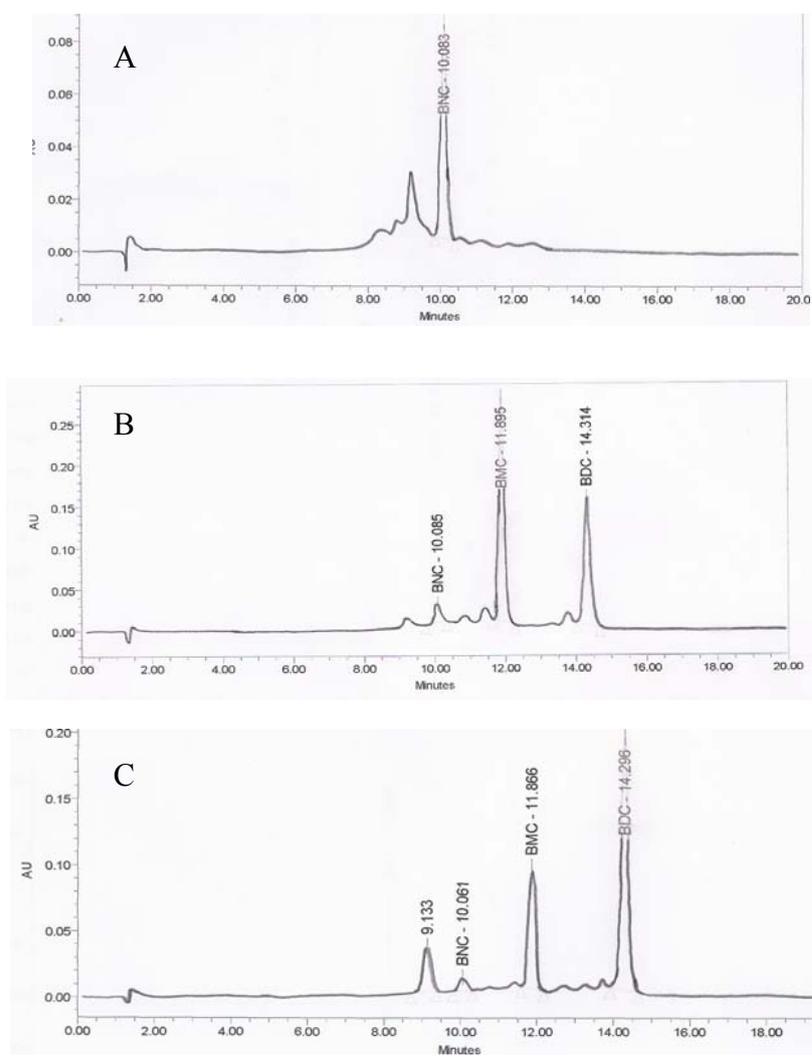
FIGURA 29. Análise da bilirrubina sérica a longo tempo



Grupo I (n=7): ratos injetados com o HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1; grupo II (n=6): ratos injetados com o HIV-mTTR-GFP; grupo III (n=10): ratos controles não injetados. Os dados de cada grupo representam a média \pm desvio padrão dos valores de bilirrubina obtidos.

A fim de documentar a glucuronidação da bilirrubina hepática nos ratos tratados, a bile foi coletada dos ratos E, F e G do grupo I, 22 semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1 e foi analisado por *HPLC*. O perfil cromatográfico dos ratos do grupo I foi semelhante ao perfil de ratos Wistar, sendo que os picos correspondentes aos mono- e diglucuronídeos de bilirrubina foram claramente visíveis. Em compensação, não existe secreção de glucuronídeos de bilirrubina na bile dos ratos não injetados ou dos ratos injetados com o vetor HIV-mTTR-GFP (dados não mostrados). Os histogramas representativos do rato E do grupo I e dos controles (rato Gunn *-/-* e rato Wistar) são mostrados na figura 30.

FIGURA 30. Perfil cromatográfico dos glucuronídeos de bilirrubina do rato E (grupo I), vinte e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1



Os cromatogramas foram obtidos da bile de rato Gunn -/- (A), de rato Wistar (B) e do rato E (grupo I) (C). BNC: bilirrubina não conjugada; BMC: bilirrubina monoglucuronídeo; BDC: bilirrubina diglucuronídeo.

A quantificação precisa da proporção dos glucuronídeos de bilirrubina mostrou que eles contribuem em mais de 99% dos pigmentos biliares nos três ratos tratados do grupo I (Tabela 10). Essas concentrações são quase idênticas às concentrações no rato Wistar, cuja bilirrubina não conjugada varia em torno de 1-5% dos pigmentos biliares. Nos ratos injetados existe uma predominância de diglucuronídeos de bilirrubina em relação aos monoglucuronídeos. No rato Wistar, ao contrário, a proporção de derivados de bilirrubina é inversa.

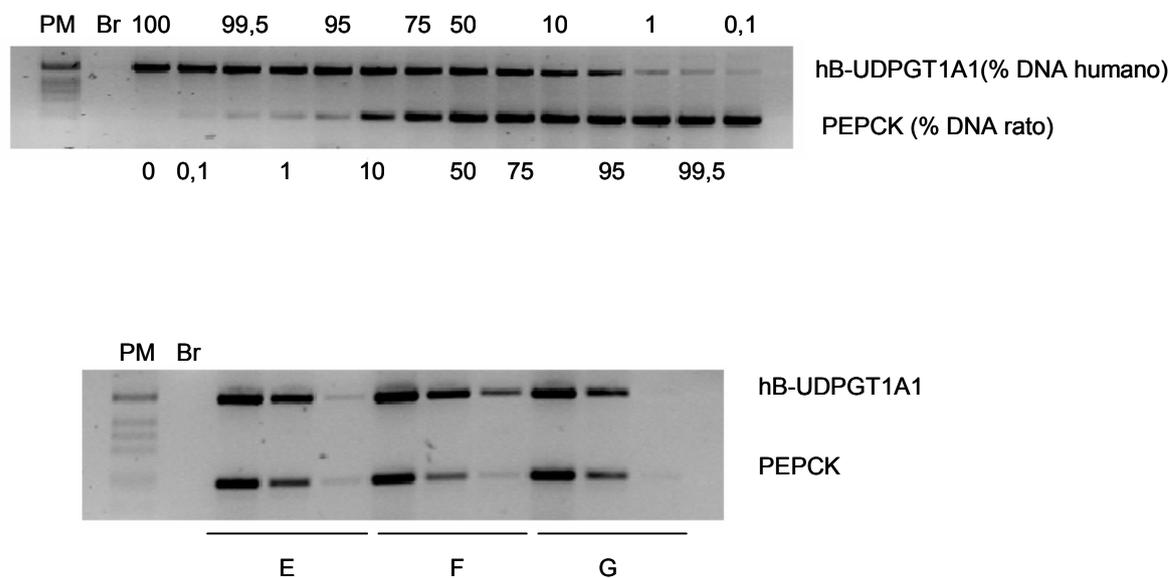
TABELA 10. Quantificação de glucuronídeos de bilirrubina na bile

Ratos	Bilirrubina Não conjugada (%)	Bilirrubina Monoglucuronídeos (%)	Bilirrubina Diglucuronídeos (%)	Bilirrubina Sérica (μ M)
Rato E	0,47	12,67	86,86	2
Rato F	0,27	8,30	91,43	2
Rato G	0,63	15,10	84,27	2
média	0,46 \pm 0,18	12,02 \pm 3,44	87,52 \pm 3,62	
Gunn	100	0	0	
Wistar	5,45	57,50	37,05	

Ratos E,F e G (grupo I).

Biópsias hepáticas foram realizadas nos ratos E, F e G, 22 semanas após a injeção do vetor do HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1. A presença bem como a expressão do transgene foi revelada por PCR e Western Blot. A PCR semi-quantitativa revelou a presença de um fragmento específico de 504 bp nos ratos tratados (Figura 31). Uma curva padrão foi construída diluindo-se DNA humano no DNA de rato a fim de comparar a intensidade do sinal de PCR. O sinal mais intenso foi obtido na PCR realizada no DNA do rato F (Figura 31).

FIGURA 31. Análise por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) semi-quantitativa do DNA extraído do tecido hepático após transferência gênica nos ratos E, F e G do grupo I



Curva padrão obtida pela mistura de diferentes proporções de DNA genômico humano e de rato (foto superior). A PCR foi realizada no DNA não diluído (500 ng), diluído 1:10 (50 ng) e diluído 1:100 (5 ng). PEPCK: amplificação do fragmento do promotor do gene PEPCK. PM: marcador de peso molecular. E, F e G: ratos do grupo I.

A análise das amostras de DNA por PCR quantitativa mostrou que 8%, 25% e 5% dos hepatócitos eram positivos para a presença do transgene no fígado dos ratos E, F e G respectivamente (Tabela 11).

TABELA 11. Valores da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa na curva padrão e no DNA dos ratos tratados (grupo I)

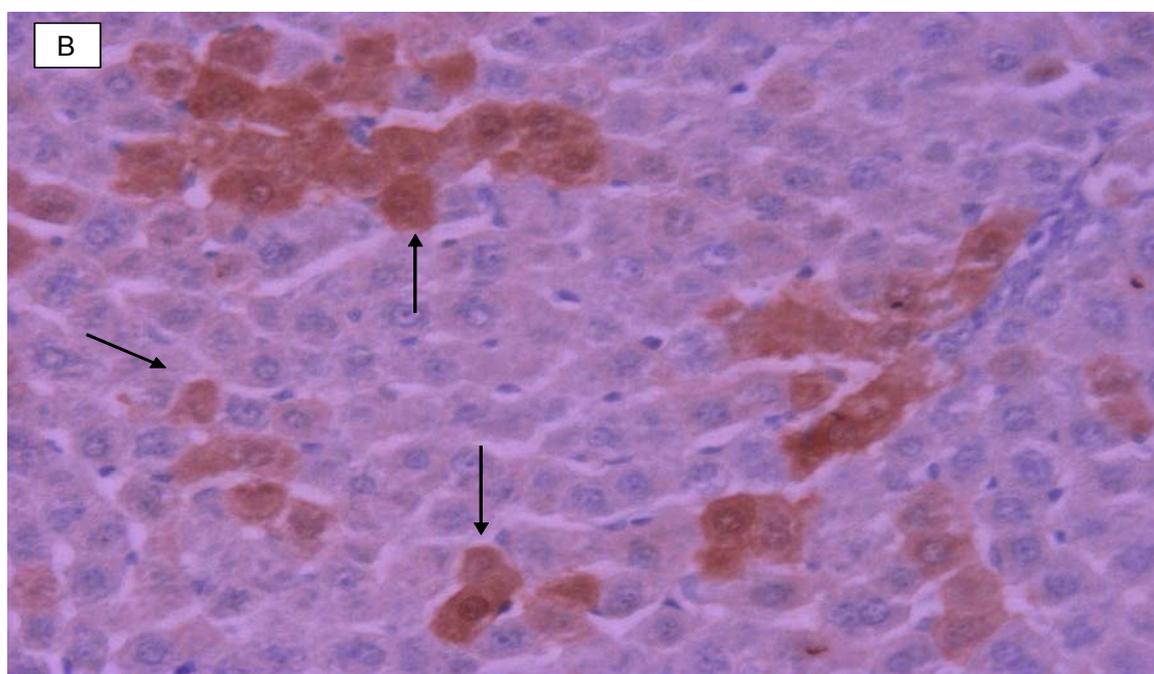
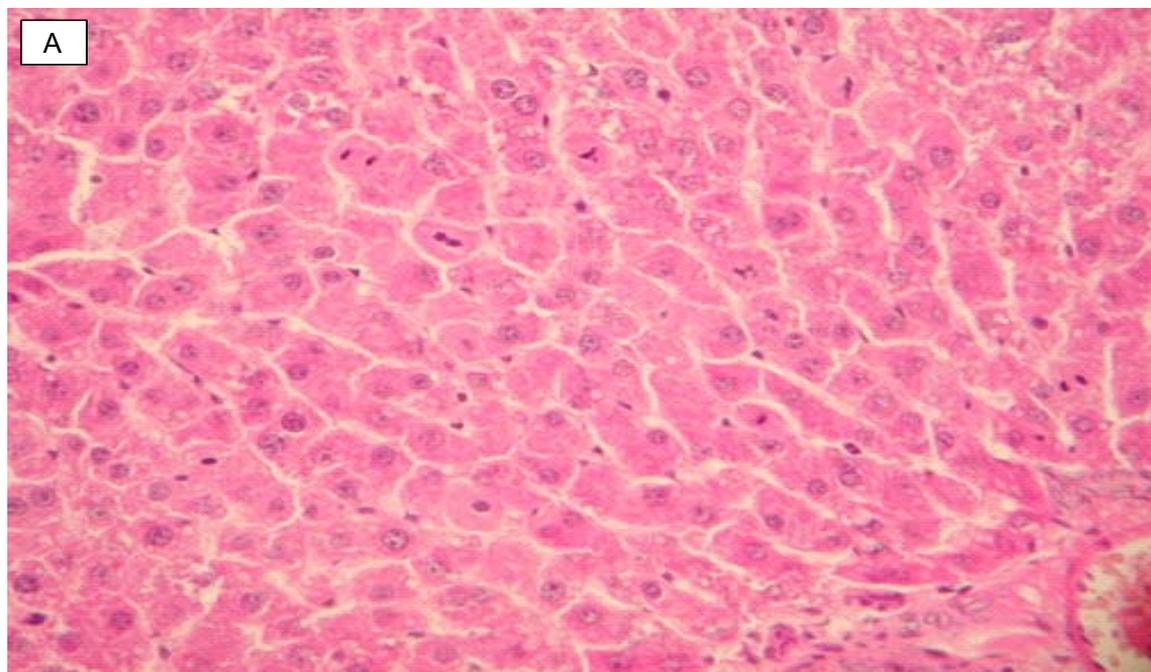
Curva Padrão (% DNA humano)	Ct (ciclo limiar)
100	17,3
50	19,0
25	19,3
10	21,6
5	22,3
1	24,8
0,5	26,3
0,1	27,3
branco	40
Ratos	
E	21,8
F	19,2
G	22,5

Curva padrão (0,1-100); ratos E, F e G (grupo I)

Para avaliar a proporção de hepatócitos transduzidos após a transferência gênica neonatal *in vivo*, os hepatócitos provenientes de cinco ratos do grupo II foram analisados por imunohistoquímica para detectar GFP, 22 semanas após a injeção do HIV-mTTR-GFP. Pelo fato de que a mesma quantidade de partículas virais foram injetadas no grupo I e II, a proporção de hepatócitos GFP positivos deve refletir a proporção de hepatócitos transduzidos pelo HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1.

A análise imunohistoquímica GFP revelou que os hepatócitos transduzidos estavam distribuídos de maneira uniforme no parênquima hepático (Figura 32). A porcentagem média de hepatócitos transduzidos foi de $36,15 \pm 29\%$ (70%; 14,3%; 10,3%; 50%; 36,1%). Não foram detectadas por imunohistoquímica células não parenquimatosas expressando GFP, o que está de acordo com a especificidade do promotor mTTR.

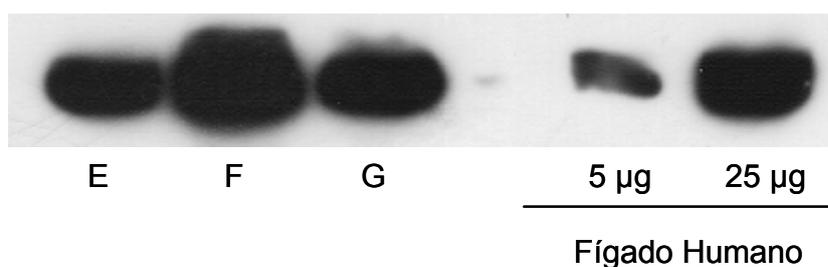
FIGURA 32. Detecção imunohistoquímica da proteína GFP no fígado, vinte e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-GFP



A: fígado controle não transduzido. B: fígado de rato transduzido pelo HIV-mTTR-GFP (setas) (grupo II). Coloração: hematoxilina/eosina. Aumento 400x.

A detecção da proteína hB-UDPGT1A1 expressa pelo vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1 foi avaliada por Western Blot nos microsossomos hepáticos dos ratos E, F e G (grupo I), 22 semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1, como mostrado na figura 33. A detecção de uma banda de 52 kD foi observada em todos os ratos, como no controle positivo (fígado humano). No rato F, o sinal obtido foi o mais forte, concordando com os experimentos de PCR.

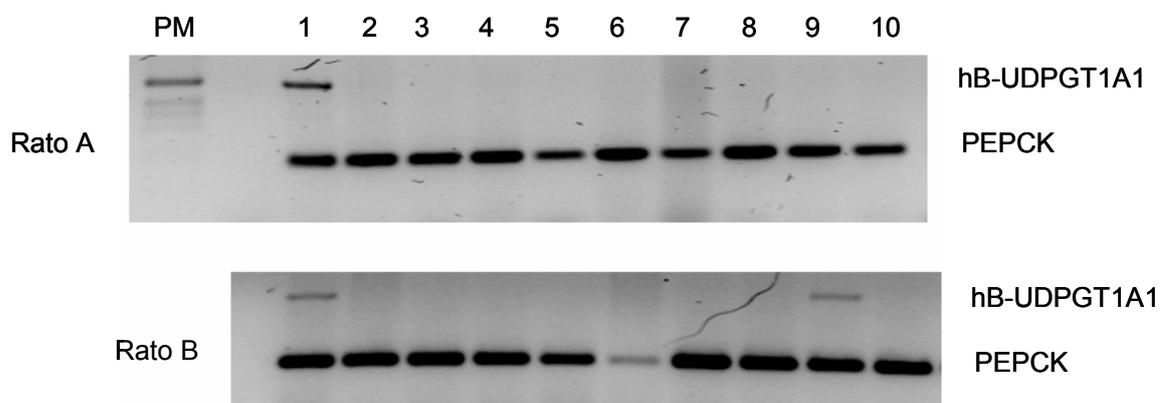
FIGURA 33. Análise por Western Blot da proteína hB-UDPGT1A1 no fígado dos ratos E, F e G (grupo I), vinte e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1



Microsossomos hepáticos dos ratos E, F e G (grupo I). Microsossomos de fígado humano: controle positivo (5 µg e 25 µg).

A distribuição do transgene foi avaliada nos órgãos (fígado, baço, rim, coração, pulmão, testículo, músculo, intestino, medula óssea e pâncreas) de dois ratos (A e B) do grupo I, 42 semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1. Um sinal positivo foi observado no fígado de ambos os ratos e uma banda de fraca intensidade também estava presente no DNA proveniente da medula óssea em um dos ratos. Todos os outros órgãos testados foram negativos (Figura 34).

FIGURA 34. Determinação da disseminação do transgene *mTTR-hB-UDPGT1A1* por PCR em vários órgãos dos ratos A e B (grupo I), quarenta e duas semanas após a injeção do vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1



DNA analisados: 1: fígado; 2: baço; 3: rim; 4: coração; 5: pulmão; 6: testículo; 7: músculo; 8: intestino; 9: medula óssea; 10: pâncreas. PEPCK: amplificação do fragmento do promotor do gene PEPCK. PM: marcador de peso molecular.

Finalmente, foi verificado em todos os ratos que nenhuma resposta imune contra a hB-UDPGT1A1 ocorreu. A dosagem de anticorpos anti-hB-UDPGT1A1 por ELISA revelou-se negativa até 42 semanas após a transdução do fígado pelo vetor HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi relatado que a administração do vetor lentiviral contendo o gene *hB-UDPGT1A1* em ratos Gunn homozigotos recém-nascidos resultou na correção permanente do fenótipo. Usando um promotor hépato-específico, uma correção completa com níveis de bilirrubinemia permanecendo em valores normais por 42 semanas foi alcançada. A correção genética dos hepatócitos foi documentada pela presença de mono- e diglucuronídeos de bilirrubina na bile dos ratos tratados em quantidades semelhantes, ou até maiores do que em ratos heterozigotos controles. A PCR bem como a análise por Western Blot realizadas no DNA e em microsossomos hepáticos, respectivamente, revelou a presença e expressão do transgene no parênquima hepático.

Uma variedade de vetores virais contendo o gene *hB-UDPGT1A1* foi avaliada no rato Gunn. Resultados promissores foram obtidos com o vetor retroviral SV40 obtendo-se um decréscimo de 30% na bilirrubina sérica (Sauter et al., 2000). A primeira geração de vetores adenovirais administrados no fígado resultou em correção completa mas transitória do fenótipo, causada pela rejeição dos hepatócitos transduzidos (Askari et al., 1996). Recentemente, Toietta et al. relataram uma correção completa e permanente de ratos Gunn adultos após uma única injeção do vetor adenoviral “*gutless*” (Toietta et al., 2005). Este estudo representa o maior avanço em terapia gênica para doenças hepáticas hereditárias. Entretanto, a aplicação clínica desta abordagem ainda é discutível. A ausência de toxicidade dos vetores adenovirais no rato não elimina o potencial tóxico em humanos. Este dado é importante, uma vez que estudos clínicos realizados anteriormente em terapia gênica da deficiência em OTC (*ornitine transcarbamilase*) usando vetores adenovirais resultaram na morte de um paciente, causada pela imunidade inata imediatamente após a injeção (Raper et al., 2003). A dose do vetor administrada ao paciente (6×10^{11} partículas virais/kg) foi menor que a dose necessária para tratar o rato Gunn (3×10^{12} partículas/kg).

Outras tentativas para induzir tolerância à proteína terapêutica através da administração oral de vetores adenovirais ou inoculação intra-tímica da proteína foram parcialmente satisfatórios e resultaram em correção incompleta do fenótipo (Ilan et al., 1996; Ilan et al., 1997). Outro estudo promissor relatou que a transferência gênica mediada por vetor adenoviral em recém-nascidos pôde evitar a rejeição dos hepatócitos transduzidos (Li et al., 1998). Entretanto, pelo fato que vetores adenovirais não se integram no genoma da célula alvo, subseqüentes divisões dos hepatócitos transduzidos resultaram em diluição progressiva e eliminação do transgene terapêutico. Como conseqüência, o alto nível de correção obtido após transferência gênica progressivamente desaparece após seis semanas (Li et al., 1998).

Vetores retrovirais integram o transgene no genoma da célula alvo. O nível de correção alcançado após infecção é constante apesar das subseqüentes divisões das células corrigidas. Isto é um dado importante quando a terapia gênica é planejada para o tratamento de crianças. Esa correção permanente foi relatada em estudos nos quais vetores lentivirais foram administrados *in utero* bem como quando vetores retrovirais foram administrados após hepatectomia parcial no rato Gunn adulto (Tada et al., 1998; Seppen et al., 2003). Em ambos estudos, a correção foi permanente por um período superior a um ano. Entretanto, como vetores retrovirais são menos eficientes que vetores adenovirais na transdução de hepatócitos, uma correção completa nunca foi alcançada.

No presente estudo, foi demonstrado que quando vetores que *i)* se integram no genoma da célula alvo e *ii)* possuem um título alto são administrados em ratos recém-nascidos, uma quantidade suficiente de hepatócitos são transduzidos e uma correção completa do fenótipo é alcançada. Além disso, esta correção completa é mantida durante o crescimento dos ratos tratados.

Foi relatado anteriormente que quando vetores retrovirais com títulos elevados foram administrados ao fígado de ratos adultos após hepatectomia parcial, uma diminuição de 50-70% do nível de bilirrubina sérica foi obtida. A correção foi

prejudicada pela resposta imune que eliminou os hepatócitos transduzidos em menos de quatro semanas (Aubert et al., 2002).

No presente estudo, a injeção de vetores lentivirais não desencadeou resposta imune contra a proteína terapêutica. Foi recentemente relatado que a administração *in vivo* de vetor retroviral em camundongos recém-nascidos induziu tolerância a proteínas “não-próprias” (Xu et al., 2003). Tal mecanismo pode explicar a ausência de resposta imune contra a hB-UDPGT1A1 neste experimento. Em um rato, a análise por PCR revelou a presença do transgene em células da medula óssea. A transdução da medula óssea foi também observada após administração neonatal de vetores oncoretrovirais (Xu et al., 2004a). Entretanto, o promotor hépato-específico presente no vetor lentiviral HIV-mTTR-hB-UDPGT1A1 faz com que seja improvável que a expressão do transgene em células do timo contribua para esta tolerância. A tolerância pode ter acontecido devido à expressão restrita da hB-UDPGT1A1 nos hepatócitos e não em células apresentadoras de antígenos, evitando o desenvolvimento das respostas celular e humoral transgene-específicas (Follenzi et al., 2004). De um modo geral, promotores hépato-específicos seriam superiores em relação aos promotores ubiqüitários no que diz respeito ao nível e a expressão a longo prazo do transgene no fígado.

Finalmente, o estudo da biodistribuição revelou que a transdução foi restrita ao fígado e à medula óssea. Esta afirmação é consistente com a presença do endotélio fenestrado nestes órgãos, indispensável ao extravasamento dos vetores virais. Isto pode explicar a discrepância entre estes resultados e aqueles obtidos por Seppen et al. após injeção *in utero* do vetor lentiviral (Seppen et al., 2003). A porosidade do sistema vascular em desenvolvimento durante o crescimento fetal pode explicar porque outros órgãos, além do fígado, foram transduzidos naquele estudo.

O presente estudo pode ser considerado como ensaio prévio em modelo animal para futuros protocolos clínicos de terapia gênica para a síndrome de Crigler-Najjar tipo I, usando-se vetor lentiviral portador do gene *hB-UDPGT1A1* sob controle de um promotor hépato-específico.

CONCLUSÕES

Capítulo I:

Os resultados puderam demonstrar que o quimerismo molecular hB-UDPGT1A1 obtido na medula óssea dos ratos Gunn transplantados não foi suficiente para:

- i) Induzir tolerância central à proteína hB-UDPGT1A1.
- ii) Manter a expressão a longo prazo do transgene no fígado, com exceção do rato G9.

Capítulos II e II

A transferência gênica *in vivo* mediada por vetores retrovirais ou lentivirais nos ratos Gunn recém-nascidos resultou na correção completa e a longo prazo da hiperbilirrubinemia, resultando em tolerância imunológica à proteína hB-UDPGT1A1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, B. T-cell function in newborn mice and humans. **Immunology Today**, v. 20, n. 7, p. 330-335, Jul, 1999. Review.

ADKINS, B.; BU, Y.; GUEVARA, P. Murine neonatal CD4+ lymph node cells are highly deficient in the development of antigen-specific Th1 function in adoptive adult hosts. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 9, p. 4998-5004, Nov 1, 2002.

AIKEN, C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 5871-5877, Aug, 1997.

ANDERSON, W.F. The current status of clinical gene therapy. **Human Gene Therapy**, v. 13, n. 11, p. 1261-1262, Jul, 2002.

ANDERSSON, G.; DENARO, M.; JOHNSON, K.; MORGAN, P.; SULLIVAN, A.; HOUSER, S.; PATIENCE, C.; WHITE-SCHARF, M.E.; DOWN, J.D. Engraftment of retroviral EGFP-transduced bone marrow in mice prevents rejection of EGFP-transgenic skin grafts. **Molecular Therapy**, v. 8, n. 3, p. 385-391, Sep, 2003a.

ANDERSSON, G.; ILLIGENS, B.M.; JOHNSON, K.W.; CALDERHEAD, D.; LEGUERN, C.; BENICHO, G.; WHITE-SCHARF, M.E.; DOWN, J.D. Nonmyeloablative conditioning is sufficient to allow engraftment of EGFP-expressing bone marrow and subsequent acceptance of EGFP-transgenic skin grafts in mice. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4305-4312, Jun 1, 2003.

ARNOLD, B. Levels of peripheral T cell tolerance. **Transplant Immunology**, v. 10, n. 2-3, p. 109-114, Aug, 2002. Review.

ASKARI, F.K.; HITOMI, Y.; MAO, M.; WILSON, J.M. Complete correction of hyperbilirubinemia in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I following transient in vivo adenovirus-mediated expression of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. **Gene Therapy**, v. 3, n. 5, p. 381-388, May, 1996.

AUBERT, D.; MENORET, S.; CHIARI, E.; PICHARD, V.; DURAND, S.; TESSON, L.; MOULLIER, P.; ANEGON, I.; FERRY, N. Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 4, p. 388-396, Apr, 2002.

BAGLEY, J.; BRACY, J.L.; TIAN, C.; KANG, E.S.; IACOMINI, J. Establishing immunological tolerance through the induction of molecular chimerism. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1331-1337, May 01, 2002a. Review.

BAGLEY, J.; TIAN, C.; SACHS, D.H.; IACOMINI, J. Induction of T-cell tolerance to an MHC class I alloantigen by gene therapy. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4394-4399, Jun 15, 2002.

BERNARD, O.; FISCHER, A.; GRÜNFELD, J. La transplantation d'organe comme traitement des maladies métaboliques héréditaires. **Medecine Sciences**, v. 7, p. 406-412, 1988.

BLAESE, R.M.; CULVER, K.W.; MILLER, A.D.; CARTER, C.S.; FLEISHER, T.; CLERICI, M.; SHEARER, G.; CHANG, L.; CHIANG, Y.; TOLSTOSHEV, P. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 475-480, Oct 20, 1995.

BORDIGNON, C.; NOTARANGELO, L.D.; NOBILI, N.; FERRARI, G.; CASORATI, G.; PANINA, P.; MAZZOLARI, E.; MAGGIONI, D.; ROSSI, C.; SERVIDA, P. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 470-475, Oct, 1995.

BOSMA, P.J.; CHOWDHURY, N.R.; GOLDHOORN, B.G.; HOFKER, M.H.; OUDE ELFERINK, R.P.; JANSEN, P.L.; CHOWDHURY, J.R. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I. **Hepatology**, v.15, n. 5, p. 941-947, May , 1992.

BOSMA, P.J.; GOLDHOORN, B.; OUDE ELFERINK, R.P.; SINAASAPPEL, M.; OOSTRA, B.A.; JANSEN, P.L. A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase isoform 1 causing Crigler-Najjar syndrome type II. **Gastroenterology**, v.105, n. 1, p. 216-220, Jul, 1993.

BOSMA, P.J.; SEPPEN, J.; GOLDHOORN, B.; BAKKER, C.; OUDE ELFERINK, R.P.; CHOWDHURY, J.R.; CHOWDHURY, N.R.; JANSEN, P.L. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 27, p. 17960-17964, Jul 8, 1994.

BOT, A.; BONA, C. Genetic immunization of neonates. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 511-520, Apr, 2002. Review.

BOVIA, F.; SALMON, P.; MATTHES, T.; KVELL, K.; NGUYEN, T.H.; WERNER-FAVRE, C.; BARNET, M.; NAGY, M.; LEUBA, F.; ARRIGHI, J.F.;

PIGUET, V.; TRONO, D.; ZUBLER, R.H. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 1727-1733, Mar 1, 2003.

BRANCHEREAU, S.; FERRY, N.; MYARA, A.; SATO, H.; KOWAI, O.; TRIVIN, F.; HOUSSIN, D.; DANOS, O.; HEARD, J. Correction of bilirubin glucuronyl transferase in Gunn rats by gene transfer in the liver using retroviral vectors. **Chirurgie**, v. 119, n. 10, p. 642-648, 1993.

BRENNER, S.; MALECH, H.L. Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1640, n. 1, p. 1-24, Apr 7, 2003. Review.

BROWN, B.D.; LILICRAP, D. Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1133-1140, Aug 15, 2002. Review.

BUCHER, N.L.; SWAFFIELD, M.N.; DITROIA, J.F. The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C14 into the DNA of regenerating rat liver. **Cancer Research**, v. 24, p. 509-512, Apr, 1964.

BURNS, J.C.; FRIEDMANN, T.; DRIEVER, W.; BURRASCANO, M.; YEE, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 8033-8037, Sep, 1993.

CABRERA, J.A.; WILSON, J.M.; RAPER, S.E. Targeted retroviral gene transfer into the rat biliary tract. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 22, n. 1, p. 21-29, Jan, 1996.

CARDOSO, J.E.; BRANCHEREAU, S.; JEYARAJ, P.R.; HOUSSIN, D.; DANOS, O.; HEARD, J.M. In situ retrovirus-mediated gene transfer into dog liver. **Human Gene Therapy**, v. 4, n. 4, p. . 411-418, Aug, 1993.

CAVAZZANA-CALVO, M.; HACEIN-BEY, S.; DE SAINT-BASILE, G.; LE DEIST, F.; FISCHER, A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. **Transfusion Clinique Biologique**, v. 7, n. 3, p. 259-260, Jun, 2000. Review.

CAVAZZANA-CALVO, M.; HACEIN-BEY, S.; YATES, F.; DE VILLARTAY, J.P.; LE DEIST, F.; FISCHER, A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. **Journal of Gene Medicine**, v. 3, n. 3, p. 201-206, May-Jun, 2001. Review.

CHARNEAU, P.; MIRAMBEAU, G.; ROUX, P.; PAULOUS, S.; BUC, H.; CLAVEL, F. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. **Journal of Molecular Biology**, v. 241, n. 5, p. 651-662, Sep, 1994.

COFFIN, J. Retroviridae: the viruses and their replication. In: B. Fields, D. Knipe, P. Howley. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1767-1847, 1996.

COLUMBANO, A.; SHINOZUKA, H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. **FASEB Journal**, v. 10, n. 10, p. 1118-1128, Aug, 1996. Review.

CONLEE JW, SHAPIRO SM. Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. **Acta Neuropathologica**, v. 93, n. 5, p. 450-460, May, 1997.

CORBEAU, P.; KRAUS, G.; WONG-STAAAL, F. Efficient gene transfer by a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived vector utilizing a stable HIV packaging cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 14070-14075, Nov 26, 1996.

COSIMI, A.B.; SACHS, D.H. Mixed chimerism and transplantation tolerance. **Transplantation**, v. 77, n. 6, p. 943-946, Mar 27, 2004. Review.

COSSET, F.L.; TAKEUCHI, Y.; BATTINI, J.L.; WEISS, R.A.; COLLINS, M.K. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. **Journal of Virology**, v. 69, n. 12, p. 7430-7436, Dec, 1995.

COSTA, R.H.; GRAYSON, D.R. Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 15, p. 4139-4145, Aug 11, 1991.

COTE, I.; ROGERS, N.J.; LECHLER, R.I. Allorecognition. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 8, n. 3, p. 318-323, Jun; 2001. Review.

CRIGLER, J.F.; NAJJAR, V.A. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. **Pediatrics**, v. 10, n. 2, p. 169-180, Aug, 1952.

CUI, Y.; GOLOB, J.; KELLEHER, E.; YE, Z.; PARDOLL, D.; CHENG, L. Targeting transgene expression to antigen-presenting cells derived from lentivirus-transduced engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells. **Blood**, v. 99, n. 2, p. 399-408, Jan, 2002.

CULLEN, B.R. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*, v. 93, n. 5, p. 685-692, May, 1998. Review.

DANOS, O.; MULLIGAN, R.C. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 17, p. 6460-6464, Sep, 1988.

DAVERN, T.J.; SCHARSCHMIDT, B.F. Gene therapy for liver disease. **Digestive Disease**, v. 16, n.1, p. 23-37, Jan-Feb, 1998. Review.

DE GEEST, B.R.; VAN LINTHOUT, S.A.; COLLEN, D. Humoral immune response in mice against a circulating antigen induced by adenoviral transfer is strictly dependent on expression in antigen-presenting cells. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2551-2556, Apr, 2003.

DE GODOY, J.L.; MALAFOSSE, R.; FABRE, M.; MEHTALI, M.; HOUSSIN, D.; SOUBRANE, O. In vivo hepatocyte retrovirus-mediated gene transfer through the rat biliary tract. **Human Gene Therapy**, v. 10, n. 2, p. 249-257, Jan 20, 1999.

DE GODOY, J.L.; MALAFOSSE, R.; FABRE, M.; MITCHELL, C.; MEHTALI, M.; HOUSSIN, D.; SOUBRANE, O. A preclinical model of hepatocyte gene transfer: the in vivo, in situ perfused rat liver. **Gene Therapy**, v. 7, n. 21, p. 1816-1823, Nov, 2000.

DELENDIA, C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. **Journal of Gene Gene Medicine**, v. 6, n. 1, p. S125-S138, Feb, 2004. Review.

DE SOULTRAIT, V.R.; CAUMONT, A.; DURRENS, P.; CALMELS, C.; PARISSI, V.; RECORDON, P.; BON, E.; DESJOBERT, C.; TARRAGO-LITVAK, L.; FOURNIER, M. HIV-1 integrase interacts with yeast microtubule-associated proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1575, n. 1-3, p. 40-48, May 3, 2002.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. Second of two parts. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 2, p. 108-117, Jul 13, 2000. Review.

DEY, B.; SYKES, M.; SPITZER, T.R. Outcomes of recipients of both bone marrow and solid organ transplants. A review. **Medicine**, v. 77, n. 5, p. 355-369, Sep, 1998. Review.

DOLBEARE, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. **Histochemical Journal**, v. 27, n. 5, p. 339-369, May, 1995. Review.

DOLBEARE, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis. **Histochemical Journal**, v. 27, n. 12, p. 923-964, Dec, 1995a. Review.

DOLBEARE, F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization. **Histochemical Journal**, v. 28, n. 8, p. 531-575, Aug, 1996. Review.

DUBENSKY, T.W.; CAMPBELL, B.A.; VILLARREAL, L.P. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. **Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 23, p. 7529-7575, Dec, 1984.

DULL, T.; ZUFFEREY, R.; KELLY, M.; MANDEL, R.J.; NGUYEN, M.; TRONO, D; NALDINI, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8463-8471, Nov, 1998.

EMERY, D.W.; SABLINSKI, T.; SHIMADA, H.; GERMANA, S.; GIANELLO, P.; FOLEY, A.; SHULMAN, S.; ARN, S.; FISHMAN, J.; LORF, T.; NICKELEIT, V.; COLVIN, R.B.; SACHS, D.H.; LEGUERN, C. Expression of an allogeneic MHC DRB transgene, through retroviral transduction of bone marrow, induces specific reduction of alloreactivity. **Transplantation**, v. 64, n. 10, p. 1414-1423, Nov 27, 1997.

EMI, Y.; OMURA, S.; IKUSHIRO, S.; IYANAGI, T. Accelerated degradation of mislocalized UDP-glucuronosyltransferase family 1 (UGT1) proteins in Gunn rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, n. 2, p. 163-169, Sep 15, 2002.

ESCARPE, P.; ZAYEK, N.; CHIN, P.; BORELLINI, F.; ZUFFEREY, R.; VERES, G.; KIERMER, V. Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. **Molecular Therapy**, v. 8, n. 2, p. 332-341, Aug, 2003.

ESQUIVEL, C.O.; MARINO, I.R.; FIORAVANTI, V.; VAN THIEL, D.H. Liver transplantation for metabolic disease of the liver. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 17, n. 1, p. 167-175, Mar, 1988. Review.

EVANS, G.L.; MORGAN, R.A. Genetic induction of immune tolerance to human clotting factor VIII in a mouse model for hemophilia A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 10, p. 5734-5739, May 12 1998.

FABRIKANT, J.I. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. **Journal of Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 551-565, Mar, 1968.

FERRY, N.; DUPLESSIS, O.; HOUSSIN, D.; DANOS, O.; HEARD, J.M. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 188, n. 19, p. 8377-8381, Oct, 1991.

FERRY, N. Gene therapy and liver diseases. **Gastroenterology Clinique et Biologique**, v. 27, n. 3 Pt 1, p. 288-290, Mar, 2003. Review.

FOLLENZI, A.; AILLES, L.E.; BAKOVIC, S.; GEUNA, M.; NALDINI, L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. **Nature Genetics**, v. 25, n. 2, p. 217-222, Jun, 2000.

FOLLENZI, A.; BATTAGLIA, M.; LOMBARDO, A.; ANNONI, A.; RONCAROLO, M.G.; NALDINI, L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3700-3709, May, 2004.

FOLLENZI, A.; SABATINO, G.; LOMBARDO, A.; BOCCACCIO, C.; NALDINI, L. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors. **Human Gene Therapy**, v. 13, n. 2, p. 243-260, Jan, 2002.

FORBES, S.J.; HODGSON, H.J. Review article: gene therapy in gastroenterology and hepatology. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 11, n. 5, p. 823-836, Oct, 1997. Review.

FORBES, S.J.; THEMIS, M.; ALISON, M.R.; SHIOTA, A.; KOBAYASHI, T.; COUELLE, C.; HODGSON, H.J. Tri-iodothyronine and a deleted form of hepatocyte growth factor act synergistically to enhance liver proliferation and enable in vivo retroviral gene transfer via the peripheral venous system. **Gene Therapy**, v. 7, n. 9, p. 784-789, May, 2000.

FORSTHUBER, T.; YIP, H.C.; LEHMANN, P.V. Induction of TH1 and TH2 immunity in neonatal mice. **Science**, v. 271, n. 5256, p. 1728-1730, Mar 22, 1996.

FOX, I.J.; CHOWDHURY, J.R.; KAUFMAN, S.S.; GOERTZEN, T.C.; CHOWDHURY, N.R.; WARKENTIN, P.I.; DORKO, K.; SAUTER, B.V.; STROM, S.C. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 20, p. 1422-1426, May, 1998.

GEROLAMI, R.; CARDOSO, J.; BRALET, M.P.; CUENOD, C.A.; CLEMENT, O.; TRAN, P.L.; BRECHOT, C. Enhanced in vivo adenovirus-mediated gene transfer to rat hepatocarcinomas by selective administration into the hepatic artery. **Gene Therapy**, v. 5, n. 7, p. 896-904, Jul, 1998.

GOPAL, T.V. Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 5, p. 1188-1190, May, 1985.

GONCHOROFF, N.J.; GREIPP, P.R.; KYLE, R.A.; KATZMANN, J.A. A monoclonal antibody reactive with 5-bromo-2-deoxyuridine that does not require DNA denaturation. **Cytometry**, v. 6, n. 6, p. 506-512, Nov, 1985.

GONCHOROFF, N.J.; KATZMANN, J.A.; CURRIE, R.M.; EVANS, E.L.; HOUCK, D.W.; KLINE, B.C.; GREIPP, P.R.; LOKEN, M.R. S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, n. 1, p. 97-101, Oct 23, 1986.

GRATZNER, H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 474-475, Oct 29, 1982.

GRATZNER, H.G.; LEIF, R.C.; INGRAM, D.J.; CASTRO, A. The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. **Experimental Cellular Research**, v. 95, n. 1, p. 88-94, Oct, 1975.

GRISHAM, J.W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. **Cancer Research**, v. 22, p. 842-849, Aug, 1962.

GROSSMAN, M.; RADER, D.J.; MULDER, D.W.M.; KOLANSKY, D.M.; KOZARSKY, K.; CLARK III, B.J.; STEIN, E.A.; LUPIEN, P.J.; BREWER JR, H.B.; RAPER, S.E.; WILSON, J.M. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. **Nature Medicine**, v. 1, p. 1148-1154, Nov 11, 1995.

GUENECHEA, G.; GAN, O.I.; INAMITSU, T.; DORRELL, C.; PEREIRA, D.S.; KELLY, M.; NALDINI, L.; DICK, J.E. Transduction of human CD34+ CD38-

bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 1, n. 6, p. 566-573, Jun, 2000.

GUHA, C.; PARASHAR, B.; DEB, N.J.; GARG, M.; GORLA, G.R.; SINGH, A.; ROY-CHOWDHURY, N.; VIKRAM, B.; ROY-CHOWDHURY, J. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 354-362, Aug, 2002.

GUNN, C.K. Hereditary acholuric jaundice in a new mutant strain of rat. **Journal of Heredity**, v. 29, p. 137-139, 1938.

HACEIN-BEY-ABINA, S.; VON KALLE, C.; SCHMIDT, M.; LE DEIST, F.; WULFFRAAT, N.; MCINTYRE, E.; RADFORD, I.; VILLEVAL, J.L.; FRASER, C.C.; CAVAZZANA-CALVO, M.; FISCHER, A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 3, p. 255-256, Jan 16, 2003.

HEIM, D.A.; HANAZONO, Y.; GIRI, N.; WU, T.; CHILDS, R.; SELLERS, S.E.; MUUL, L.; AGRICOLA, B.A.; METZGER, M.E.; DONAHUE, R.E.; TISDALE, J.F.; DUNBAR, C.E. Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. **Molecular Therapy**, v. 1, n. 6, p. 533-544, Jun 2000.

HIGGINS, G.; ANDERSON, R. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Archives of Pathology**, v. 12, p. 186-212, 1931.

HOOGERBRUGGE, P.M.; VON BEUSECHEM, V.W.; KAPTEIN, L.C.; EINERHAND, M.P.; VALERIO, D. Gene therapy for adenosine deaminase deficiency. **British Medical Bulletin**, v. 51, n. 1, p. 72-81, Jan, 1995. Review.

HORWICH, A.L. Inherited hepatic enzyme defects as candidates for liver-directed gene therapy. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 168, p. 185-200, 1991. Review.

HUANG, C.A.; FUCHIMOTO, Y.; SCHEIER-DOLBERG, R.; MURPHY, M.C.; NEVILLE, D.M.; SACHS, DH. Stable mixed chimerism and tolerance using a nonmyeloablative preparative regimen in a large-animal model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 2, p. 173-181, Jan, 2000.

IERINO, F.L.; GOJO, S.; BANERJEE, P.T.; GIOVINO, M.; XU, Y.; GERE, J.; KAYNOR, C.; AWWAD, M.; MONROY, R.; REMBERT, J.; HATCH, T.; FOLEY, A.; KOZLOWSKI, T.; YAMADA, K.; NEETHLING, F.A.; FISHMAN, J.; BAILIN, M.; SPITZER, T.R.; COOPER, D.K.; COSIMI, A.B.; LEGUERN, C.;

SACHS, D.H. Transfer of swine major histocompatibility complex class II genes into autologous bone marrow cells of baboons for the induction of tolerance across xenogeneic barriers. **Transplantation**, v. 67, n. 8, p. 1119-1128, Apr 27, 1999.

ILAN, Y.; ATTAVAR, P.; TAKAHASHI, M.; DAVIDSON, A.; HORWITZ, M.S.; GUIDA, J.; CHOWDHURY, N.R.; CHOWDHURY, J.R. Induction of central tolerance by intrathymic inoculation of adenoviral antigens into the host thymus permits long-term gene therapy in Gunn rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 11, p. 2640-2647, Dec 1, 1996.

ILAN, Y.; DROGUETT, G.; CHOWDHURY, N.R.; LI, Y.; SENGUPTA, K.; THUMMALA, N.R.; DAVIDSON, A.; CHOWDHURY, J.R.; HORWITZ, M.S. Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2587-2592, Mar 18, 1997.

IYANAGI, T.; EMI, Y.; IKUSHIRO, S. Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1407, n. 3, p. 173-184, Sep, 1998. Review.

IYANAGI, T.; WATANABE, T.; UCHIYAMA, Y. The 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase deficiency in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat) is caused by a -1 frameshift mutation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 35, p. 21302-21307, Dec 15, 1989.

IYANAGI, T. Molecular basis of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme deficiencies in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat). **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 35, p. 24048-24052, Dec 15, 1991.

IZEMBART, A.; AGUADO, E.; GAUTHIER, O.; AUBERT, D.; MOULLIER, P.; FERRY, N. In vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver of dogs results in transient expression and induction of a cytotoxic immune response. **Human Gene Therapy**, v. 10, n. 18, p. 2917-2925, Dec, 1999.

JANEWAY, C.A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 13, p. 1167-1171, Nov, 2001. Review.

JANSEN, P.L. Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. **European Journal of Pediatrics**, v. 158 n. 2, p. S89-S94, Dec, 1999. Review.

JEANG, K.T.; XIAO, H.; RICH, E.A. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 28837-28840, Oct, 1999. Review.

JEZEQUEL, A.M.; PAOLUCCI, F.; BENEDETTI, A.; MANCINI, R.; ORLANDI, F. Enumeration of S-phase cells in normal rat liver by immunohistochemistry using bromodeoxyuridine-antibromodeoxyuridine system. **Digestive Diseases of Sciences**, v. 36, n. 4, p. 482-484, Apr, 1991.

JONES, N.D.; FLUCK, N.C.; MELLOR, A.L.; MORRIS, P.J.; WOOD, K.J. The induction of transplantation tolerance by intrathymic (i.t.) delivery of alloantigen: a critical relationship between i.t. deletion, thymic export of new T cells and the timing of transplantation. **International Immunology**, v. 10, n. 11, p. 1637-1646, Nov, 1998.

JOOSS, K.; ERTL, H.C.; WILSON, J.M. Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. **Journal of Virology**, v. 72, n. 4, p. 2945-2954, Apr, 1998.

KADAKOL, A.; SAPPAL, B.S.; GHOSH, S.S.; LOWENHEIM, M.; CHOWDHURY, A.; CHOWDHURY, S.; SANTRA, A.; ARIAS, I.M.; CHOWDHURY, J.R.; CHOWDHURY, N.R. Interaction of coding region mutations and the Gilbert-type promoter abnormality of the UGT1A1 gene causes moderate degrees of unconjugated hyperbilirubinaemia and may lead to neonatal kernicterus. **Journal of Medical Genetics**, v. 38, n. 4, p. 244-249, Apr, 2001.

KALIL, A.; CELHO, J.; STRAUSS, E. **Fígado e vias biliares. Clínica e Cirurgia**. In: Anatomia e fisiologia do fígado, p. 3-10, 2001.

KAPLAN, M.; HAMMERMAN, C.; MAISELS, M.J. Bilirubin genetics for the nongeneticist: hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation. **Pediatrics**, v. 111, n. 4 Pt 1, p. 886-893, Apr, 2003. Review.

KAY, M.A.; GLORIOSO, J.C.; NALDINI, L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 33-40, Jan, 2001. Review.

KAY, M.A.; MEUSE, L.; GOWN, A.M.; LINSLEY, P.; HOLLENBAUGH, D.; ARUFFO, A.; OCHS, H.D.; WILSON, C.B. Transient immunomodulation with anti-CD40 ligand antibody and CTLA4Ig enhances persistence and secondary adenovirus-mediated gene transfer into mouse liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4686-4691, Apr, 1997.

KAY, M.A.; ROTHENBERG, S.; LANDEN, C.N.; BELLINGER, D.A.; LELAND, F.; TOMAN, C.; FINEGOLD, M.; THOMPSON, A.R.; READ, M.S.; BRINKHOUS, K.M. In vivo gene therapy of hemophilia B: sustained partial

correction in factor IX-deficient dogs. **Science**, v. 262, n. 5130, p. 117-119, Oct 1, 1993.

KAY, M.A.; WOO, S.L. Gene therapy for metabolic disorders. **Trends in Genetics**, v. 10, n. 7, p. 253-257, Jul, 1994. Review.

KEINO, H.; SATO, H.; SEMBA, R.; AONO, S.; AOKI, E.; KASHIWAMATA, S. Mode of prevention by phototherapy of cerebellar hypoplasia in a new Sprague-Dawley strain of jaundiced Gunn rats. **Pediatric Neurosciences**, v. 12, n. 3, p. 145-150, 1985.

KIM, V.N.; MITROPHANOUS, K.; KINGSMAN, S.M.; KINGSMAN, A.J. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 811-816, Jan, 1998.

KITTEN, O.; COSSET, F.L.; FERRY, N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo. **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 12, p. 1491-1494, Aug 10, 1997.

KLAGES, N.; ZUFFEREY, R.; TRONO, D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 2, n. 2, p. 170-176, Aug, 2000.

KOHN, D.B.; HERSHFIELD, M.S.; CARBONARO, D.; SHIGEOKA, A.; BROOKS, J.; SMOGORZEWSKA, E.M.; BARSKY, L.W.; CHAN, R.; BUROTTO, F.; ANNETT, G.; NOLTA, J.A.; CROOKS, G.; KAPOOR, N.; ELDER, M.; WARA, D.; BOWEN, T.; MADSEN, E.; SNYDER, F.F.; BASTIAN, J.; MUUL, L.; BLAESE, R.M.; WEINBERG, K.; PARKMAN, R. T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 775-780, Jul, 1998.

KREN, B.T.; PARASHAR, B.; BANDYOPADHYAY, P.; CHOWDHURY, N.R.; CHOWDHURY, J.R.; STEER, C.J. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the gunn rat model of crigler-najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 18, p. 10349-10354, Aug, 1999.

KUNG, S.K.; AN, D.S.; BONIFACINO, A.; METZGER, M.E.; RINGPIS, G.E.; MAO, S.H.; CHEN, I.S.; DONAHUE, R.E. Induction of transgene-specific immunological tolerance in myeloablated nonhuman primates using lentivirally transduced CD34+ progenitor cells. **Molecular Therapy**, v. 8, n. 6, p. 981-991, Dec, 2003.

LABRUNE, P.H.; MYARA, A.; FRANCOUAL, J.; TRIVIN, F.; ODIEVRE, M. Cerebellar symptoms as the presenting manifestations of bilirubin encephalopathy in children with Crigler-Najjar type I disease. **Pediatrics**, v. 84, n. 4 Pt 2, p. 768-770, Apr, 1992.

LAKE, J.R. Hepatocyte transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 20, p. 1463-1465, May, 1998.

LE ROUZIC, E.; MOUSNIER, A.; RUSTUM, C.; STUTZ, F.; HALLBERG, E.; DARGEMONT, C.; BENICHOU, S. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 45091-45098, Nov, 2002.

LEDLEY, F.D. Clinical application of somatic gene therapy in inborn errors of metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 13, n. 4, p. 597-616, 1990.

LEDLEY, F.D. Hepatic gene therapy: present and future. **Hepatology**, v.18, n. 5, p. 1263-1273, Nov, 1993. Review.

LEWIS, P.F.; EMERMAN, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. **Journal of Virology**, v. 68, n. 1, p. 510-506, Jan, 1994.

LI, Q.; KAY, M.A.; FINEGOLD, M.; STRATFORD-PERRICAUDET, L.D.; WOO, S.L. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. **Human Gene Therapy**, v. 4, n. 4, p. 403-409, Aug, 1993.

LI, Q.; MURPHREE, S.S.; WILLER, S.S.; BOLLI, R.; FRENCH, B.A. Gene therapy with bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type 1. **Human Gene Therapy**, v. 9, n. 4, p. 497-505, Mar 1, 1998.

LIU, Y.L.; MINGOZZI, F.; RODRIGUEZ-COLON, S.M.; JOSEPH, S.; DOBRZYNSKI, E.; SUZUKI, T.; HIGH, K.A.; HERZOG, R.W. Therapeutic levels of factor IX expression using a muscle-specific promoter and adeno-associated virus serotype 1 vector. **Human Gene Therapy**, v. 15, n. 8, p. 783-792, Aug, 2004.

LOGAN, A.C.; LUTZKO, C.; KOHN, D.B. Advances in lentiviral vector design for gene-modification of hematopoietic stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 429-436, Oct, 2002. Review.

LOIS, C.; REFAELI, Y.; QIN, X.F.; VAN PARIJS, L. Retroviruses as tools to study the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 4, p. 496-504, Aug, 2001. Review.

LUNDQUIST, C.A.; TOBIUME, M.; ZHOU, J.; UNUTMAZ, D.; AIKEN, C. Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 76, n. 9, p. 4625-4633, May, 2002.

MACDONALD, R. "Lifespan" of liver cells. **Archives of Internal Medicine**, v. 107, p. 335-343, 1961.

MANGO, R.L.; XU, L.; SANDS, M.S.; VOGLER, C.; SEILER, G.; SCHWARZ, T.; HASKINS, M.E.; PONDER, K.P. Neonatal retroviral vector-mediated hepatic gene therapy reduces bone, joint, and cartilage disease in mucopolysaccharidosis VII mice and dogs. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 82, n. 1, p. 4-19, May, 2004.

MARODON, G.; MOULY, E.; BLAIR, E.J.; FRISEN, C.; LEMOINE, F.M.; KLATZMANN, D. Specific transgene expression in human and mouse CD4+ cells using lentiviral vectors with regulatory sequences from the CD4 gene. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3416-3423, May 1, 2003.

MARTH, T.; STROBER, W. Oral tolerance and its modulation by anti-cytokines. **Research in Immunology**, v. 148, n. 8-9, p. 554-561, Oct-Dec, 1997. Review.

MERTEN, O.W. State-of-the-art of the production of retroviral vectors. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 1, p. S105-S124, Feb, 2004. Review.

MICHALOPOULOS, G.K.; DEFRANCES, M.C. Liver regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 60-66, Apr 4, 1997. Review.

MICHALOPOULOS, G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. **FASEB Journal**, v. 4, n. 2, p. 176-187, Feb 1, 1990. Review.

MIKKOLA, H.; WOODS, N.B.; SJOGREN, M.; HELGADOTTIR, H.; HAMAGUCHI, I.; JACOBSEN, S.E.; TRONO, D.; KARLSSON, S. Lentivirus gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells is compromised by a delay in proviral integration and results in transduction mosaicism and heterogeneous gene expression in progeny cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 24, p. 11911-11918, Dec, 2000.

MILLER, D.G.; ADAM, M.A.; MILLER, A.D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 8, p. 4239-4242, 1990.

MINERS, J.O.; MCKINNON, R.A.; MACKENZIE, P.I. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. **Toxicology**, v. 27, n. 181-182, p. 453-456, Dec, 2002. Review.

MINGOZZI, F.; LIU, Y.L.; DOBRZYNSKI, E.; KAUFHOLD, A.; LIU, J.H.; WANG, Y.; ARRUDA, V.; HIGH, K.A.; HERZOG, R.W. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1347-1356, May, 2003.

MIYOSHI, H.; BLOMER, U.; TAKAHASHI, M.; GAGE, F.H.; VERMA, I.M. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of Virology**, v. 72, n. 10, p. 8150-8157, Oct, 1998.

MORRAL, N.; O'NEAL, W.; RICE, K.; LELAND, M.; KAPLAN, J.; PIEDRA, P.A.; ZHOU, H.; PARKS, R.J.; VELJI, R.; AGUILAR-CORDOVA, E.; WADSWORTH, S.; GRAHAM, F.L.; KOCHANNEK, S.; CAREY, K.D.; BEAUDET, A.L. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 12816-12821, Oct 26, 1999.

MURACA, M.; BLANCKAERT, N. Liquid-chromatographic assay and identification of mono- and diester conjugates of bilirubin in normal serum. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1767-1771, Oct, 1983.

NAGAI, F.; SATOH, H.; MORI, S.; SATO, H.; KOIWAI, O.; HOMMA, H.; MATSUI, M. Mapping of rat bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase gene (Ugt1a1) to chromosome region 9q35-->q36. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 69, n. 3-4, p. 185-186, 1995.

NAKAI, H.; MONTINI, E.; FUESS, S.; STORM, T.A.; GROMPE, M.; KAY, M.A. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 297-302, Jul, 2003.

NAKAI, H.; YANT, S.R.; STORM, T.A.; FUESS, S.; MEUSE, L.; KAY, M.A. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. **Journal of Virology**, v. 75, n. 15, p. 6969-6976, Aug, 2001.

NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F.H.; VERMA, I.M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Nature Medicine**, v. 2, n. 3, p. 338-342, Mar, 1996.

NEFF, T.; HORN, P.A.; PETERSON, L.J.; THOMASSON, B.M.; THOMPSON, J.; WILLIAMS, D.A.; SCHMIDT, M.; GEORGES, G.E.; VON KALLE, C.; KIEM, H.P. Methylguanine methyltransferase-mediated in vivo selection and chemoprotection of allogeneic stem cells in a large-animal model. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, p. 1581-1588, Nov, 2003.

NGUYEN, T.H.; FERRY, N. Liver gene therapy: advances and hurdles. **Gene Therapy**, v. 11, n. 1, p. S76-S84, Oct, 2004. Review.

NGUYEN, T.H.; OBERHOLZER, J.; BIRRAUX, J.; MAJNO, P.; MOREL, P.; TRONO, D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. **Molecular Therapy**, v. 6, n. 2, p. 199-209, Aug, 2002.

OGUETA, S.B.; YAO, F.; MARASCO, W.A. Design and in vitro characterization of a single regulatory module for efficient control of gene expression in both plasmid DNA and a self-inactivating lentiviral vector. **Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 569-579, Aug, 2001.

ORY, D.S.; NEUGEBOREN, B.A.; MULLIGAN, R.C. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11400-11406, Oct 15, 1996.

OVERTURF, K.; AL-DHALIMY, M.; MANNING, K.; OU, C.N.; FINEGOLD, M.; GROMPE, M. Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. **Human Gene Therapy**, v. 9, n. 3, p. 295-304, Feb 10, 1998.

OVERTURF, K.; AL-DHALIMY, M.; TANGUAY, R.; BRANTLY, M.; OU, C.N.; FINEGOLD, M.; GROMPE, M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. **Nature Genetics**, v. 12, n. 3, p. 266-273, Mar, 1996.

PANIS, Y.; RAD, A.R.; BOYER, O.; HOUSSIN, D.; SALZMANN, J.L.; KLATZMANN D. Gene therapy for liver tumors. **Surgical Oncology Clinical in North America**, v. 5, n. 2, p. 461-473, Apr, 1996. Review.

PARK, F.; OHASHI, K.; CHIU, W.; NALDINI, L.; KAY, M.A. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. **Nature Genetics**, v. 24, n. 1, p. 49-52, Jan, 2000.

PERSONS, D.A.; ALLAY, E.R.; SAWAI, N.; HARGROVE, P.W.; BRENT, T.P.; HANAWA, H.; NIENHUIS, A.W.; SORRENTINO, B.P. Successful treatment of

murine beta-thalassemia using in vivo selection of genetically modified, drug-resistant hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 102, n. 2, p. 506-513, Jul 15, 2003.

PETERS WH, ALLEBES WA, JANSEN PL, POELS LG, CAPEL PJ. Characterization and tissue specificity of a monoclonal antibody against human uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase. **Gastroenterology**, v. 93, n. 1, p. 162-191, Jul, 1987.

PFEIFER, A.; VERMA, I.M. Gene therapy: promises and problems. **Annual Review of Genomics in Human Genetics**, v. 2, p. 177-211, 2001. Review.

PICHARD, V.; AUBERT, D.; FERRY, N. Efficient retroviral gene transfer to the liver in vivo using nonpolypeptidic mitogens. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 5, p. 929-935, Sep, 2001.

PODEVIN, G.; OTTA, E.; NGUYEN, J.M.; PICHARD, V.; AUBERT, D.; MOULLIER, P.; FERRY, N. Factors influencing immune response after in vivo retrovirus-mediated gene transfer to the liver. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 1, p. 16-21, Jan, 2004.

POLLARD, V.W.; MALIM, M.H. The HIV-1 Rev protein. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 491-532, 1998. Review.

PONDER, K.P.; MELNICZEK, J.R.; XU, L.; WEIL, M.A.; O'MALLEY, T.M.; O'DONNELL, P.A.; KNOX, V.W.; AGUIRRE, G.D.; MAZRIER, H.; ELLINWOOD, N.M.; SLEEPER, M.; MAGUIRE, A.M.; VOLK, S.W.; MANGO, R.L.; ZWEIGLE, J.; WOLFE, J.H.; HASKINS, M.E. Therapeutic neonatal hepatic gene therapy in mucopolysaccharidosis VII dogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 13102-13107, Oct 1, 2002.

PONDER, K.P. Should gene therapy be used for newborns with hemophilia ? **Molecular Therapy**, v. 7, n. 1, p. 7-8, Jan, 2003.

PUPPI, J.; GUILLONNEAU, C.; PICHARD, V.; BELLODI-PRIVATO, M.; CUTURI, M.C.; ANEGON, I.; FERRY, N. Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene. **Journal of Hepatology**, v. 41, n. 2, p. 222-228, Aug, 2004.

RABES, H.; WIRSCHING, R.; TUCZEK, H.; ISELER, G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. **Cell Tissue Kinetics**, v. 9, p. 517-532, 1976.

RADU, P.; ATSMON, J. Gilbert's syndrome--clinical and pharmacological implications. **Israel Medical Association Journal**, v. 3, n. 8, p. 593-598, Aug, 2001. Review.

RAPER, S.E.; CHIRMULE, N.; LEE, F.S.; WIVEL, N.A.; BAGG, A.; GAO, G.P.; WILSON, J.M.; BATSHAW, M.L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 80, n. 1-2, p. 148-158, Sep-Oct, 2003.

REISER, H.; STADECKER, M.J. Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 18, p. 1369-1377, Oct 31, 1996. Review.

RICHARD, E.; ROBERT, E.; CARIO-ANDRE, M.; GED, C.; GERONIMI, F.; GERSON, S.L.; DE VERNEUIL, H.; MOREAU-GAUDRY, F. Hematopoietic stem cell gene therapy of murine protoporphyria by methylguanine-DNA-methyltransferase-mediated in vivo drug selection. **Gene Therapy**, v. 11, n. 22, p. 1638-1647, Nov, 2004.

RITTER, J.K.; YEATMAN, M.T.; FERREIRA, P.; OWENS, I.S. Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 150-155, Jul, 1992.

ROLLING F. Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. **Gene Therapy**, v. 11, n. 1, p. S26-S32, Oct, 2004. Review.

ROSENBERG, SA. Gene therapy for cancer. **Journal of the American Medical Association**, v. 268, n. 17, p. 2416-2419, Nov 4, 1992.

ROY-CHOWDHURY, J.; HUANG, T.J.; KESARI, K.; LEDERSTEIN, M.; ARIAS, I.M.; ROY-CHOWDHURY, N. Molecular basis for the lack of bilirubin-specific and 3-methylcholanthrene-inducible UDP-glucuronosyltransferase activities in Gunn rats. The two isoforms are encoded by distinct mRNA species that share an identical single base deletion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 27, p. 18294-18298, Sep 25, 1991.

SAMULSKI, R.J.; ZHU, X.; XIAO, X.; BROOK, J.D.; HOUSMAN, D.E.; EPSTEIN, N.; HUNTER, L.A. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. **EMBO Journal**, v. 10, n. 12, p. 3941-3950, Dec, 1991.

SARKAR, R.; TETREULT, R.; GAO, G.; WANG, L.; BELL, P.; CHANDLER, R.; WILSON, J.M.; KAZAZIAN, J.R. Total correction of hemophilia A

mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. **Blood**, v.103, n. 4, p. 1253-1260, Feb, 2004.

SARUKHAN, A.; SOUDAIS, C.; DANOS, O.; JOOSS, K. Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. **Journal of Gene Medicine**, v. 3, n. 3, p. 260-270, May-Jun, 2001.

SASTRY, L.; JOHNSON, T.; HOBSON, M.J.; SMUCKER, B.; CORNETTA, K. Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. **Gene Therapy**, v. 9, n. 17, p. 1155-1162, Sep, 2002.

SATO, H.; KOIWAI, O.; TANABE, K.; KASHIWAMATA, S. Isolation and sequencing of rat liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNA: possible alternate splicing of a common primary transcript. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 169, n. 1, p. 260-264, May 31, 1990.

SAUTER, B.V.; PARASHAR, B.; CHOWDHURY, N.R.; KADAKOL, A.; ILAN, Y.; SINGH, H.; MILANO, J.; STRAYER, D.S.; CHOWDHURY, J.R. A replication-deficient rSV40 mediates liver-directed gene transfer and a long-term amelioration of jaundice in gunn rats. **Gastroenterology**, v. 119, n. 5, p. 1348-1357, Nov, 2000.

SAYEGH, M.H.; TURKA, L.A. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 25, p. 1813-1821, Jun 18, 1998. Review.

SCHAUER, R.; STANGL, M.; LANG, T.; ZIMMERMANN, A.; CHOUKER, A.; GERBES, A.L.; SCHILDBERG, F.W.; RAU, H.G. Treatment of Crigler-Najjar type 1 disease: relevance of early liver transplantation. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 38, n. 8, p. 1227-1231, Aug, 2003.

SCHIEDNER, G.; MORRAL, N.; PARKS, R.J.; WU, Y.; KOOPMANS, S.C.; LANGSTON, C.; GRAHAM, F.L.; BEAUDET, A.L.; KOCHANNEK, S. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. **Nature Genetics**, v. 18, n. 2, p. 180-183, Feb, 1998.

SCHWARTZ, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, v. 248, n. 4961, p. 1349-1356, Jun 15, 1990.

SEPPEN, J.; BOSMA, P.J.; GOLDHOORN, B.G.; BAKKER, C.T.; CHOWDHURY, J.R.; CHOWDHURY, N.R.; JANSEN, P.L.; OUDE ELFERINK, R.P. Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant

bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 6, p. 2385-2391, Dec, 1994.

SEPPEN, J.; TADA, K.; HELLOWIG, S.; BAKKER, C.T.; PRASAD, V.R.; ROY CHOWDHURY, N.; ROY CHOWDHURY, J.; BOSMA, P.J.; OUDE ELFERINK, R.P. Bilirubin glucuronidation by intact Gunn rat fibroblasts expressing bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. **Biochemical Journal**, v. 314, n. 2, p. 477-483, Mar 1, 1996.

SEPPEN, J.; TADA, K.; OTTENHOFF, R.; SENGUPTA, K.; CHOWDHURY, N.R.; CHOWDHURY, J.R.; BOSMA, P.J.; OUDE ELFERINK, R.P. Transplantation of Gunn rats with autologous fibroblasts expressing bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: correction of genetic deficiency and tumor formation. **Human Gene Therapy**, v. 8, n. 1, p. 27-36, Jan, 1997.

SEPPEN, J.; VAN DER RIJT, R.; LOOIJE, N.; VAN TIL, N.P.; LAMERS, W.H.; OUDE ELFERINK, R.P. Long-term correction of bilirubin UDPglucuronosyltransferase deficiency in rats by in utero lentiviral gene transfer. **Molecular Therapy**, v. 8, n. 4, p. 593-599, Oct, 2003.

SHARABI, Y.; SACHS, D.H. Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 2, p. 493-502, Feb 1, 1989.

SHIZURU, J.A.; WEISSMAN, I.L.; KERNOFF, R.; MASEK, M.; SCHEFFOLD, Y.C. Purified hematopoietic stem cell grafts induce tolerance to alloantigens and can mediate positive and negative T cell selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9555-9560, Aug 15, 2000.

SINAASAPPEL, M.; JANSEN, P.L. The differential diagnosis of Crigler-Najjar disease, types 1 and 2, by bile pigment analysis. **Gastroenterology**, v. 100, n. 3, p. 783-789, Mar, 1991.

SNYDER, R.O.; MIAO, C.; MEUSE, L; TUBB, J.; DONAHUE, B.A.; LIN, H.F.; STAFFORD, D.W.; PATEL, S.; THOMPSON, A.R.; NICHOLS, T.; READ, M.S.; BELLINGER, D.A.; BRINKHOUS, K.M.; KAY, M.A. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. **Nature Medicine**, v. 5, n. 1, p. 64-70, Jan, 1999.

SONG, E.S.; LEE, V.; SURH, C.D.; LYNN, A.; BRUMM, D.; JOLLY, D.J.; WARNER, J.F.; CHADA, S. Antigen presentation in retroviral vector-mediated gene transfer in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 5, p. 1943-1948, Mar, 1997.

SONNTAG KC, EMERY DW, YASUMOTO A, HALLER G, GERMANA S, SABLINSKI T, SHIMIZU A, YAMADA K, SHIMADA H, ARN S, SACHS DH, LEGUERN C. Tolerance to solid organ transplants through transfer of MHC class II genes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 65-71, Jan, 2001.

SPITZER, T.R.; DELMONICO, F.; TOLKOFF-RUBIN, N.; MCAFEE, S.; SACKSTEIN, R.; SAIDMAN, S.; COLBY, C.; SYKES, M.; SACHS, D.H.; COSIMI, A.B. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. **Transplantation**, v. 68, n. 4, p. 480-484, Aug 27, 1999.

STARR, T.K.; JAMESON, S.C.; HOGQUIST, K.A. Positive and negative selection of T cells. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 139-176, 2003. Review.

STEER, C.J. Liver regeneration. **FASEB Journal**, v. 9, n. 14, p. 1396-1400, Nov, 1995. Review.

STROBEL, S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance v. sensitisation. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 60, n. 4, p. 437-442, Nov, 2001. Review.

STROBEL, S.; FERGUSON, A. Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immune responses. **Immunology**, v. 60, n. 2, p. 317-318, Feb, 1987.

SYKES, M.; SACHS, D.H.; NIENHUIS, A.W.; PEARSON, D.A.; MOULTON, A.D.; BODINE, D.M. Specific prolongation of skin graft survival following retroviral transduction of bone marrow with an allogeneic major histocompatibility complex gene. **Transplantation**, v. 55, n. 1, p. 197-202, Jan, 1993.

TABARKI, B.; KHALIFA, M.; YACOUB, M.; TLILI, K.; ESSOUSSI, A.S. Cerebellar symptoms heralding bilirubin encephalopathy in Crigler-Najjar syndrome. **Pediatric Neurology**, v. 27, n. 3, p. 234-236, Sep, 2002.

TADA, K.; CHOWDHURY, N.R.; NEUFELD, D.; BOSMA, P.J.; HEARD, M.; PRASAD, V.R.; CHOWDHURY, J.R. Long-term reduction of serum bilirubin levels in Gunn rats by retroviral gene transfer in vivo. **Liver Transplantation and Surgery**, v. 4, n. 1, p. 78-88, Jan, 1998.

TADA, K.; ROY-CHOWDHURY, N.; PRASAD, V.; KIM, B.H.; MANCHIKALAPUDI, P.; FOX, I.J.; VAN DUIJVENDIJK, P.; BOSMA, P.J.; ROY-CHOWDHURY, J. Long-term amelioration of bilirubin glucuronidation defect in

Gunn rats by transplanting genetically modified immortalized autologous hepatocytes. **Cell Transplantation**, v. 7, n. 6, p. 607-616, Nov-Dec, 1998a.

THUMMALA, N.R.; GHOSH, S.S.; LEE, S.W.; REDDY, B.; DAVIDSON, A.; HORWITZ, M.S.; CHOWDHURY, J.R.; CHOWDHURY, N.R. A non-immunogenic adenoviral vector, coexpressing CTLA4Ig and bilirubin-uridine-diphosphoglucuronateglucuronosyltransferase permits long-term, repeatable transgene expression in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome. **Gene Therapy**, v. 9, n. 15, p. 981-990, Aug, 2002.

TIAN, C.; BAGLEY, J.; IACOMINI, J. Expression of antigen on mature lymphocytes is required to induce T cell tolerance by gene therapy. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3771-3776, Oct 1, 2002.

TIAN, C.; BAGLEY, J.; KAYE, J.; IACOMINI, J. Induction of T cell tolerance to a protein expressed in the cytoplasm through retroviral-mediated gene transfer. **Journal of Gene Medicine**, v. 5, n. 5, p. 359-365, May, 2003.

TOIETTA, G.; MANE, V.P.; NORONA, W.S.; FINEGOLD, M.J.; NG, P.; MCDONAGH, A.F.; BEAUDET, A.L.; LEE, B. Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 11, p. 3930-3935, Mar 15, 2005.

TSUI, L.V.; KELLY, M.; ZAYEK, N.; ROJAS, V.; HO, K.; GE, Y.; MOSKALENKO, M.; MONDESIRE, J.; DAVIS, J.; ROEY, M.V.; DULL, T.; MCARTHUR, J.G. Production of human clotting Factor IX without toxicity in mice after vascular delivery of a lentiviral vector. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 53-57, Jan, 2002.

VAN DER VEERE, C.N.; JANSEN, P.L.; SINAASAPPEL, M.; VAN DER MEER, R.; VAN DER SIJS, H.; RAMMELOO, J.A.; GOYENS, P.; VAN NIEUWKERK, C.M.; OUDE ELFERINK, R.P. Oral calcium phosphate: a new therapy for Crigler-Najjar disease? **Gastroenterology**, v. 112, n. 2, p. 455-462, Feb, 1997.

VAN MAELE, B.; DE RIJCK, J.; DE CLERCQ, E.; DEBYSER, Z. Impact of the central polypurine tract on the kinetics of human immunodeficiency virus type 1 vector transduction. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4685-4694, Apr, 2003.

VANDENDRIESSCHE, T.; THORREZ, L.; NALDINI, L.; FOLLENZI, A.; MOONS, L.; BERNEMAN, Z.; COLLEN, D.; CHUAH, M.K. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can

efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 813-822, Aug, 2002.

VARMUS, H. Retroviruses. **Science**, v. 240, n. 4858, p. 1427-1435, Jun 10, 1988. Review.

VERHOEYEN, E.; COSSET, F.L. Surface-engineering of lentiviral vectors. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 1, p. S83-S94, Feb, 2004. Review.

VERSLAND, M.R.; WU, C.H.; WU, G.Y. Strategies for gene therapy in the liver. **Seminars in Liver Disease**, v. 12, n. 3, p. 332-339, Aug, 1992. Review.

VIGNA, E.; CAVALIERI, S.; AILLES, L.; GEUNA, M.; LOEW, R.; BUJARD, H.; NALDINI, L. Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 3, p. 252-261, Mar, 2002.

VIGNA, E.; NALDINI, L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. **Journal of Gene Medicine**, v. 2, n. 5, p. 308-316, Sep-Oct, 2000. Review.

VOLPERS, C.; KOCHANNEK, S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 1, p. S164-S171, Feb, 2004. Review.

WAKABAYASHI, A.; UTSUYAMA, M.; HOSODA, T.; SATO, K.; HIROKAWA, K. Differential age effect of oral administration of an antigen on antibody response: an induction of tolerance in young mice but enhancement of immune response in old mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 109, n. 3, p. 191-201, Sep, 1999.

WALDMANN, H.; COBBOLD, S.P.; FAIRCHILD, P.; ADAMS, E. Therapeutic aspects of tolerance. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 392-397, Aug, 2001. Review.

WATCHKO, J.F.; DAOOD, M.J.; BINIWALE, M. Understanding neonatal hyperbilirubinaemia in the era of genomics. **Seminars in Neonatology**, v. 7, n. 2, p. 143-152, Apr, 2002.

WEINER, H.L. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 341-351, 1997. Review.

WEKERLE, T. Transplantation tolerance induced by mixed chimerism. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 20, n. 8, p. 816-823, Aug, 2001. Review.

WILSON, J.M.; CHOWDHURY, N.R.; GROSSMAN, M; WAJSMAN, R; EPSTEIN, A; MULLIGAN, R.C., CHOWDHURY, J.R. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 8437-8441, Nov 21, 1990.

WOOD, K.J.; USHIGOME, H.; KARIM, M.; BUSHELL, A.; HORI, S.; SAKAGUCHI, S. Regulatory cells in transplantation. **Novartis Foundation Symposium**, v. 252, p. 177-188, 2003.

WU, C.Y.; DEMEURE, C.; KINIWA, M.; GATELY, M.; DELESPESE, G. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 4, p. 1938-1949, Aug 15, 1993.

WU, X.; LI, Y.; CRISE, B.; BURGESS, S.M. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1749-1751, Jun, 2003.

XU, H.; CHILTON, P.M.; HUANG, Y.; SCHANIE, C.L.; ILDSTAD, S.T. Production of donor T cells is critical for induction of donor-specific tolerance and maintenance of chimerism. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1463-1471, Feb, 2004.

XU, L.; GAO, C.; SANDS, M.S.; CAI, S.R.; NICHOLS, T.C.; BELLINGER, D.A.; RAYMER, R.A.; MCCORQUODALE, S.; PONDER, K.P. Neonatal or hepatocyte growth factor-potentiated adult gene therapy with a retroviral vector results in therapeutic levels of canine factor IX for hemophilia B. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3924-3932, May 15, 2003.

XU, L.; HASKINS, M.E.; MELNICZEK, J.R.; GAO, C.; WEIL, M.A.; O'MALLEY, T.M.; O'DONNELL, P.A.; MAZRIER, H.; ELLINWOOD, N.M.; ZWEIGLE, J.; WOLFE, J.H.; PONDER, K.P. Transduction of hepatocytes after neonatal delivery of a Moloney murine leukemia virus based retroviral vector results in long-term expression of beta-glucuronidase in mucopolysaccharidosis VII dogs. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 2, p. 141-153, Feb, 2002.

XU, L.; O'MALLEY, T.; SANDS, M.S.; WANG, B.; MEYERROSE, T.; HASKINS, M.E.; PONDER, K.P. In vivo transduction of hematopoietic stem cells after neonatal intravenous injection of an amphotropic retroviral vector in mice. **Molecular Therapy**, v. 10, n. 1, p. 37-44, Jul, 2004a.

YAMADA K, MCCARTY DM, MADDEN VJ, WALSH CE. Lentivirus vector purification using anion exchange HPLC leads to improved gene transfer. **Biotechniques**, v. 34, n. 5, p. 1074-1078, May, 2003.

YANG, N.S.; BURKHOLDER, J.; ROBERTS, B.; MARTINELL, B.; MCCABE, D. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9568-9572, Dec, 1990.

YANG, Y.; RAPER, S.E.; COHN, J.A.; ENGELHARDT, J.F.; WILSON, J.M. An approach for treating the hepatobiliary disease of cystic fibrosis by somatic gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 10, p. 4601-4605, May, 1993.

YANG, Y.; SU, Q.; GREWAL, I.S.; SCHILZ, R.; FLAVELL, R.A.; WILSON, J.M. Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 6370-6377, Sep, 1996.

YU, D.; CHEN, D.; CHIU, C.; RAZMAZMA, B.; CHOW, Y.H.; PANG, S. Related Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors. **Cancer Gene Therapy**, v. 8, n. 9, p. 628-635, Sep, 2001.

ZENNOU, V.; PETIT, C.; GUETARD, D.; NERHBASS, U.; MONTAGNIER, L.; CHARNEAU, P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 173-185, Apr, 2000.

ZHANG, J.; XU, L.; HASKINS, M.E.; PARKER PONDER, K. Neonatal gene transfer with a retroviral vector results in tolerance to human factor IX in mice and dogs. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 143-151, Jan 1, 2004.

ZIEGLER, R.J.; LONNING, S.M.; ARMENTANO, D.; LI, C.; SOUZA, D.W.; CHERRY, M.; FORD, C.; BARBON, C.M.; DESNICK, R.J.; GAO, G.; WILSON, J.M.; PELUSO, R.; GODWIN, S.; CARTER, B.J.; GREGORY, R.J.; WADSWORTH, S.C.; CHENG, S.H. AAV2 vector harboring a liver-restricted promoter facilitates sustained expression of therapeutic levels of alpha-galactosidase A and the induction of immune tolerance in Fabry mice. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 2, p. 231-240, Feb, 2004.

ZINKERNAGEL, R.M.; ALTHAGE, A. On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 8092-8097, Jul 6, 1999.

ZUFFEREY, R.; DONELLO, J.E.; TRONO, D.; HOPE, T.J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 2886-2892, Apr, 1999.

ZUFFEREY, R.; NAGY, D.; MANDEL, R.J.; NALDINI, L.; TRONO, D.
Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, n. 9, p. 871-875, Sep, 1997.