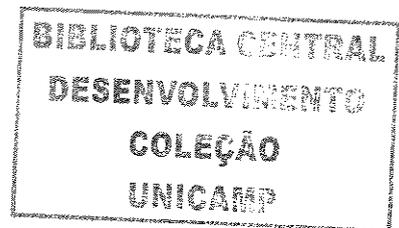


DENISE SILVIA DE SOUZA

**INDUÇÃO ARTIFICIAL DA APOPTOSE COMO MEDIDA
DE SEGURANÇA EM TERAPIA GÊNICA**

**Campinas
2005**



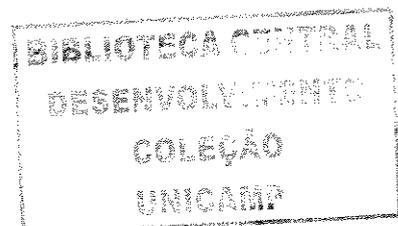
DENISE SILVIA DE SOUZA

**INDUÇÃO ARTIFICIAL DA APOPTOSE COMO MEDIDA
DE SEGURANÇA EM TERAPIA GÊNICA**

Aluna: Denise Silvia De Souza
Orientadora: Prof Dra Sara T. O. Saad

*Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia
Médica, área de Biologia Estrutural.*

Campinas
2005



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno (a): DENISE SILVIA DE SOUZA

Orientador(a): Profa. Dra. SARA TERESINHA OLALLA SAAD _____

Membros

Professor Doutor Sérgio Paulo Bydlowski _____

Professora Doutora Maria de Fátima Sonatti _____

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Medica, área de concentração Biologia Estrutural da Faculdade de Ciências Medicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data 28/02/2005

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	50891
V	EX
TOMBO BC/	65971
PROC.	16-D-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	05/10/05
Nº CPD	

Bib ID 366483

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

So89i Souza, Denise Silvia de
Indução artificial da apoptose como medida de segurança em terapia gênica / Denise Silvia de Souza. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador : Sara Terezinha Olala Saad
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Eritropoetina. 2. Apoptose. 3. Caspases/Metabolismo.
I. Saad, Sara Terezinha Olala. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

As minhas e amigas, pela amizade e apoio e otimismo;Aos meus familiares, pela força.Aos meus sobrinhos, pela alegria de tê-los por perto;A minha avó, que mesmo distante, me incentivava;A todos do laboratório que me auxiliaram desde o primeiro dia em que cheguei;Á todas minhas amigas, antigas e recentes, que o tempo e a distância nunca nos separe;A Deus, pela perseverança, presença e fé.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Sara Teresinha Olalla Saad** pela orientação, muita paciência, atenção e confiança.

À **Edna** pelos primeiros ensinamentos em prática de laboratório.

A **Dilmara** pelo auxílio no cuidado com animais, aprendizado de técnicas e principalmente pela amizade.

À **Tereza** pela cultura de células, informações sobre o trabalho, além do carinho.

A **Helô** pela paciência, massagens e amizade.

A **Dr. Hernandes** pela imunohistoquímica.

As amigas **Dulcinéia, Adriana, Carol**, pelos conselhos, confiança e diversão.

A **Flavia Boca** por ter sido uma amiga “na real”.

À **Ângela**, pelas bênçãos, amizade e confidências.

A **Lena e Michele** pela amizade e conselhos durante os anos.

À **Teresa** da Fisiopatologia Médica, pelas “confusões” e ajuda durante a pós-graduação.

As amigas de fora do laboratório **Carla, Cris e Cleide** que sempre me ajudam.

Aos “**mocinhos**” (nomes não citáveis) que durante a realização do trabalho me auxiliavam, amenizando o “stress”.

Aos amigos do laboratório e do Hemocentro Dil, Dú, Helô, Lena, Michele, Marcelo Brandão, Maria Tereza, Adriana, Carol Lanaro, Sheley, Camila Oresco, Camila Almeida, Anderson, Renata, Tiago, Lú do Tiago, Lu Holanda, Ângela, Flávia L, Flávia C, Flavia (Du Little), Manoela, Babi, Aída, Gustavo, Paty, Paty secretária, Raquel, Samuel, Tereza, Eliane, Andréia, Tarcísio, Hélivia, Paulo, Marcelo, Nic, Erick, Natasha, Ucha, Deva, Carol Bigarela, Luciene, Arlete, Léo e a todos aqui não mencionados, mas que tornaram tudo mais fácil e alegre.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e para meu amadurecimento profissional.

Muito obrigada a todos vocês!!

A realização deste estudo contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	33
MATERIAIS E MÉTODOS	35
1. Obtenção dos plasmídeos.....	36
2. Administração do CID	38
3. A – Cultura de células C ₂ C ₁₂	38
4. B – Obtenção da Linhagem Estável com plasmídeo da Caspase9.....	39
5. Análise da Expressão da Luciferase em linhagens estáveis expressando a construção iCasp9	40
6. Medida da eficiência do sistema pBS-mEpoD/iCasp9 na elevação do hematócrito	43
7. Administração do CID/AP20187.....	43
8. Administração de Tetraciclina/Doxociclina aos camundongos.....	44
9. Reação em Cadeia da Polimerase.....	44
10. Western Blotting.....	45
11. Reação de TUNEL.....	45

12. Análise Estatística	46
RESULTADOS	47
13. Obtenção de Linhagem C ₂ C ₁₂ Estavelmente Transfectada com plasmídeo iCasp9	48
14. Resposta ao CID/AP20187	49
15. Análise da Expressão da Luciferase em linhagens estáveis expressando a construção da Caspase-9/FKPB (F36V)	50
16. Eficiência do sistema pBS–mEpoD/iCasp-9 na elevação e sustentação do hematócrito	51
17. Resposta ao CID/AP20187	55
18. Detecção do vetor iCasp9 no músculo injetado	58
19. Análise Histológica	59
20. Administração de Tetraciclina/Doxociclina aos camundongos	60
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

EPO	Eritropoetina
EpoR	Receptor de Eritropoetina
IL – 3	Interleucina 3
IL – 4	Interleucina 4
IL – 6	Interleucina 6
G-CSF	Fator de crescimento de colônia granulocítica
BFU – E	Unidade formadora de burst eritróide
CFU – E	Unidade formadora de colônia eritróide
cDNA	DNA complementar
AAV	Adenovírus Associado
CMV	Citomegalovírus
AD	Domínio de Ativação
ptTA	Proteína transativadora
pTRE	Proteína contendo elemento responsivo a tetraciclina
CID	Indutor químico de dimerização
DFF	Fator de fragmentação do DNA
CAD	Caspase ativada por DNase
dNTP	Desoxiribonucleotídeos trifosfato
SDS	Sodecil dissulfato de sódio
FKBP	FK506 Binding Protein
RPM	Rotações por minuto
LB	Meio Lurian Bertan

CsCl ₂	Cloreto de Césio
ETOH	Etanol
TUNEL	Terminal dideoxynucleotidil Uracil Nick end Labeling
FBS	Soro fetal bovino
Tween	Polioxietilenosorbitol monolaurato
Peg	Polietilenoglicol
IP	Intraperitoneal
IM	Intramuscular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização da eritropoetina	23
Figura 2: A caspase torna-se ativa após a clivagem de suas subunidades.....	27
Figura 3: Indutor químico de dimerização, AP20187, produzido por ARIAD/MIT Pharmaceutical (Cambridge)	29
Figura 4: Modelo de ativação de dimerização através de um sistema artificial. Através da ligação do CID com a molécula do FKBP em fusão com a proteína alvo, ocorre a ativação da proteína que necessita se encontrar na forma de um dímero para ser expresso (Spencer et al, 1996 e Blau et al, 1997).....	30
Figura 5: Modelo de ativação do sistema Tet-Off, onde na ausência do antibiótico ocorre a transcrição do gene alvo e na sua presença a afinidade do TetR pela tetraciclina inibe este processo.....	31
Figura 6: Sistema Tet-On. Diferencia do sistema Tet-Off por possuir um transativador reverso, que na ausência do antibiótico doxociclina inibe a transcrição gênica, enquanto que na sua presença, ocorre a transcrição	32
Figura 7: Vetor iCasp9 (pSH1/Sn-E-Fv`-Fvls-casp9), utilizado nos estudos <i>in</i> <i>vitro</i> e <i>in vivo</i>	36
Figura 8: Plasmídeo pBS-mEpoD contendo duas moléculas do cDNA da EPO murina, sob controle do vetor ptet-tTA.....	37

Figura 9: MW= marcador de peso molecular ladder 100pb, 1 a 5 = clones C ₂ C ₁₂ transfetados estavelmente com cDNA da Caspase-9, C= controle positivo.....	48
Figura 10: Western blotting de clones de células C ₂ C ₁₂ transfetadas estavelmente com vetor iCasp9.....	49
Figura 11: Reação de TUNEL em células C ₂ C ₁₂ , transfetadas estavelmente. (A) células não tratadas com CID, (B) células tratadas com AP20187. Observe que após o tratamento com a droga, ocorreu fragmentação celular detectada pela incorporação de iodeto de propídio no DNA fragmentado com consequente emissão de fluorescência, indicando assim a ativação da caspase-9.....	50
Figura 12: Detecção do vetor iCasp9 no músculo injetado. De 1 a 6 músculo de animais injetados com CID e 7 músculo de animais não injetados. M marcador de peso molecular, ladder 100pb, C9 controle positivo	58
Figura 13: A e C mostram reação negativa de TUNEL, devido a integridade nas células, em animais não tratados com AP20187. B e D mostram reação positiva em animais tratados com AP20187, onde vemos fragmentação celular detectada pela incorporação de iodeto de propídeo no DNA fragmentado, com consequente emissão de fluorescência.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Experimento 1: Teste de concentração ideal de vetor iCasp9.....	42
Tabela 2: Experimento 2: Teste para verificar sustentação do hematócrito e administração do AP20187.....	42
Tabela 3: Experimento 3 : Sistema ptet-mEpoD.....	43
Tabela 4: Dados da eficiência do sistema Tet-Off/iCasp-9 na elevação do hematócrito (%), antes e após, administração dos plasmídeos.....	52
Tabela 5: Medida do hematócrito (%) antes e após a administração do sistema pBS-mEpoD - TetOff . (Grupo 1).....	54
Tabela 6: Medida do hematócrito (%) antes e após a administração do sistema pBS-mEpoDTetOff / iCasp9 (Grupo 2). Os animais que apresentaram elevação do hematócrito acima de 65% receberam o CID (AP20187) na semana 4.....	56
Tabela 7: Hct (%) dos animais que receberam doxociclina (semanas 4 e 5) oralmente, antes e após a administração do sistema Tet-Off/EPO	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Atividade da Luciferase após administração do CID (AP20187)	51
Gráfico 2: Elevação do hematócrito dos animais do grupo 1 a 3, que receberam pBS- mEpoD (5,0 µg) e iCasp9 (5,0 µg – grupo 2; e 10,0 µg – grupo 3)	51
Gráfico 3: Animais injetados com pBS-mEpoD (n=9) mostrando, em 5 animais, sustentação do hct (> 65%) por até 15 semanas após purificação dupla com CsCl ₂	53
Gráfico 4: Hematócrito no grupo tratado com AP20187. (A) animais que responderam ao tratamento (n=7), e em (B) animais que não responderam (n=16). A administração da droga foi realizada na semana 4.....	55
Gráfico 5: Sistema Tet-Off no controle da expressão do gene da eritropoetina. A doxociclina foi administrada nas semanas 4 e 5	60

RESUMO

Para que a terapia gênica seja aplicada à terapêutica clínica, é necessário o desenvolvimento de um sistema que permita a eficácia biológica e segurança no caso de efeitos tóxicos.

O gene da eritropoetina (EPO) pode ser utilizado para o tratamento de anemias crônicas, porém estudos *in vivo* têm demonstrado que efeitos tóxicos, como trombose e policitemia fatal, são freqüentes devido ao descontrole da expressão da EPO e alta elevação do hematócrito (Hct).

O objetivo deste estudo foi buscar um sistema capaz de induzir a apoptose de células transformadas com o gene da EPO, baseado na ativação artificial da caspase-9, através de indutores químicos de dimerização (CID), comparando este sistema ao do Tet-Off. Duas construções foram utilizadas: a primeira contendo o cDNA da EPO murina (pBS-mEpoD) sob o controle do sistema Tet-off (ptetTA) e o segundo contendo o cDNA da caspase9 ligado a duas moléculas de FKBP em tandem (iCasp9). As moléculas de FKBP contêm uma mutação F36V que permite a ligação específica do indutor químico de dimerização (CID) AP20187, gentilmente cedido pela ARIAD Pharmaceuticals (Cambridge, MA).

Estudos *in vitro* mostraram que, em células murinas C2C12 transfectadas estavelmente, o vetor icasp9 apresentou expressão adequada e 90% das células entraram em apoptose após a administração do AP 20187

Os ensaios *in vivo* foram realizados, inicialmente, com 3 grupos de camundongos (11/grupo), que receberam 5µg pBS-mEpoD, 0,5µg ptet-tTA e diferentes concentrações de iCasp9: grupo 1: zero, grupo 2= 6µg e grupo 3= 10µg. As injeções intramusculares foram seguidas de eletroporação (8 pulsos, 30mseg, 200V/cm, 1Hz). Após cinco semanas, os animais apresentaram aumento no Hct de 33% (Student T test $p=0.0013$), 36.8% ($p=0.0004$) e 12.8% ($p=0.0374$) nos grupos 1,2 e 3 respectivamente, sugerindo que a administração de 6µg de icasp9 não altera a expressão do vetor pBS-mEpoD, enquanto que 10µg de iCasp9 reduz sua eficiência.

Novo experimento foi realizado, onde 49 animais participaram do estudo, sendo que treze destes receberam as concentrações administradas ao grupo 1, acima descrito, e 36 receberam as concentrações do grupo 2. Através deste experimento, foi possível verificar a eficiência do sistema na elevação e sustentação do hematócrito, assim como comparar os sistemas iCasp9/AP20187 e Tet-Off, no controle da expressão da eritropoetina. Dos 13 animais do grupo 1, 4 não tiveram aumento do hematócrito (30,7%) e os demais (n=9) apresentaram aumento do hematócrito superior a 75% , na 4ª semana após a injeção do plasmídeo. Destes, 5 animais (55,5%) mantiveram o hematócrito elevado por mais que 15 semanas

Dos 36 animais do grupo 2, 3 foram a óbito e 10 (30,3%) não apresentaram elevação do hematócrito . Os 23 animais restantes tiveram elevação do hematócrito superior a 65% e foram selecionados para receber a droga AP20187. Destes, 7 (30,44%) responderam à administração da droga com queda do hematócrito a níveis basais e 16 animais não responderam (69,56%).

Animais tratados e não tratados com CID foram sacrificados para retirada de músculo injetado, verificando a apoptose através da técnica de Tunel. Caspase9 não foi detectada por PCR no grupo 1, e foi positiva em 91% dos animais do grupo 2 e em 83% do grupo 3.

Através dos resultados, concluímos que a administração dos sistemas em conjunto não altera a eficiência do vetor da EPO na elevação do hematócrito, apesar deste efeito ser heterogêneo. Também foi possível observar que o sistema Tet-Off é eficiente no controle da expressão gênica, demonstrando efeitos homogêneos.

Finalmente, concluímos que o uso do iCasp9 ativado por indutor químico de dimerização e o controle da expressão do gene da eritropoetina pelo sistema Tet-Off são opções viáveis para a segurança na terapia gênica.

ABSTRACT

In order to apply gene therapy to clinical practice, it is necessary to develop a system establishing biological efficiency and safety in case of toxic effects. The erythropoietin gene (EPO) can be used in the treatment of chronic anemia, however *in vivo* studies have revealed that toxic effects, such as thrombosis and fatal polycythemia, are frequent due to uncontrolled EPO expression and a high increase in the hematocrit (Hct) levels.

The aim of this study was to search for a system capable of inducing apoptosis in cells transformed by the EPO gene, based on the artificial activation of caspase-9, using chemical inducers of dimerization (CID), comparing this system to Tet-Off. Two constructions were used: the first one containing the cDNA of murine EPO (pBS-mEpoD) under Tet-Off system (ptet-tTA) control and the second containing the cDNA of caspase-9 connected to two FKBP molecules in tandem (iCasp9). The FKBP molecules contain a F36V mutation that permits a specific connection to the chemical inducer of dimerization (CID) AP20187, kindly provided by ARIAD Pharmaceuticals (Cambridge, MA).

Studies *in vitro* demonstrated that, in stably transfected murine cells C₂C₁₂, the icasp9 vector presented and adequate expression and 90% of the cells entered apoptosis after AP20187 administration.

The *in vivo* assays were performed, initially, with 3 groups of mice (11/group) that received 5µg pBS-mEpoD, 5µg ptet-tTA and different concentrations of iCasp9: group 1: zero, group 2=6µg, and group 3=10µg. The intramuscular injections were followed by electroporation (8 pulses, 30mseg, 200V/cm, 1Hz). After five weeks, the animals demonstrated a 33% increase in Hct (Student T test p=0.0013), 36.8% (p=0.0004) and 12.8% (p=0.0374) in groups 1, 2, and 3 respectively, suggesting that the administration of 6µg of icasp9 does not alter the pBS-mEpoD vector expression, although 10µg of iCasp9 reduces its efficiency.

A new assay was performed, the study involved 49 animals, thirteen of which received the same concentrations administered in group 1, described above, and 36 received the same concentrations as group 2. By means of this assay it was possible to verify the efficiency of the system in the increase and maintenance of the hematocrit, in addition to comparing the iCasp9/AP20187 and Tet-Off systems, in the control of the erythropoietin expression. Of the 13 animals of group 1, 4 did not present an increase in hematocrit (30,7%) and the others (n=9) presented a hematocrit increase of over 75%, during the 4th week after the plasmid injection. 5 of these animals (55<5%) maintained a high hematocrit level for over 15 weeks.

Of the 36 animals of group 2, 3 died and 10 (30, 3%) did not present hematocrit increase. The 23 animals left had a hematocrit increase of over 65% and were selected to receive the AP20187 drug. Seven of these (30,44%) responded to drug administration with a hematocrit decrease that reached basal levels, and 16 animals did not respond (69,56%).

Animals treated and not treated with CID were sacrificed in order to extract the injected muscle, verifying apoptosis by Tunel's assay. Caspase9 was not detected by PCR in group 1, and was positive in 91% of the animals in group 2, and in 83% of group 3.

The results led us to conclude that the administration of the systems together did not alter the efficiency of the EPO vector in the hematocrit increase, in spite of the effect being heterogenous. It was also possible to observe that the Tet-Off system was more efficient in controlling gene expression, presenting homogenous effects.

We concluded that the use of iCasp9 activated by a chemical inducer of dimerization and the control of the erythropoietin gene expression using the Tet-Off system are viable options for gene therapy safety.

INTRODUÇÃO

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoprotéico produzido principalmente pelos rins e em parte pelo fígado, sendo o principal fator de crescimento da linhagem eritróide e da regulação da produção de hemácias. Foi originalmente purificada da urina de pacientes com anemia aplástica. Possui peso molecular de 34,4-kD segundo determinado por eletroforese e contém 30% de carboidratos, dos quais 11% consistem de ácido siálico, 11% de hexose total e 8% de N-acetilglicosamina. A proteína possui 508 aminoácidos e o gene que a codifica encontra-se no braço longo do cromossomo 7 (7q21).

Diferentemente de outros fatores de crescimento hematopoiéticos, participa de um clássico mecanismo de "feedback". Sua regulação está condicionada à hipóxia, onde nesta condição ocorre aumento da produção do hormônio e do número de hemácias; por outro lado, em casos de hiperóxia ocorre redução nos níveis de EPO e conseqüentemente diminuição do número de hemácias. A principal estrutura responsiva à hipóxia no gene da EPO situa-se a cerca de 120 pares de bases após o início da região 3'. É também um marcador específico de células progenitoras eritróides. (Krantz, 1991).

A EPO mantém a estabilidade celular, promove a divisão e maturação morfológica das células e aumenta a síntese de hemoglobina. Exerce sua ação ligando-se ao receptor de eritropoetina (EpoR), o qual está expresso principalmente na superfície celular de células eritróides. O receptor de eritropoetina pertence à família dos receptores de citocina, juntamente com os receptores de IL-3, IL-4, IL-6, G-CSF e outros. As características conservadas da EPO inclui entre outros, receptores de citocinas em uma única região transmembrana e um domínio extracelular. O domínio intracelular do receptor é dividido em duas regiões funcionais. A região membrana-proximal contém dois domínios chamados Box-1 e Box-2, os quais são conservados como em outros receptores de citocinas.

Em geral, existem mil receptores da EPO por célula eritróide, embora este número possa variar de acordo com o estágio de diferenciação. As células respondem inicialmente ao hormônio, no estágio imaturo (BFU-E) e depois na forma de eritroblasto policromático. Normalmente uma molécula de EPO irá se ligar a dois receptores de

EPO formando um homodímero, iniciando a sinalização do complexo receptor-ligante que é subsequente internamente e degradado.

O EpoR não possui nenhuma atividade enzimática intrínseca, contudo várias proteínas de sinalização e o receptor em si são fosforilados após estímulo com EPO. JAK2 é a quinase primária responsável pela fosforilação do EpoR. Quando JAK2 está menos ativa as células são incapazes de se proliferar, diferenciar-se ou manter sua viabilidade em resposta à EPO. Uma vez que o receptor foi fosforilado por JAK2, as STATs ligam-se ao receptor específico de fosfotirosina que possuem afinidade com JAK2 e assim são fosforilados. Deste modo a STATs dimerizam-se e move-se para o núcleo, onde estimulam a transcrição gênica.

Recentemente foi demonstrado que a tirosina quinase LYN é importante na via de sinalização estimulada pela EPO, mas não na viabilidade. Esta também está pré-associada com o receptor de EPO e ativa-se segundo a estimulação de eritropetina. Esta proteína também pode se ligar a JAK2 e afetar a fosforilação da STAT5.

A EPO tem também ação antiapoptótica; de fato STAT5 ativa a expressão de muitos genes anti-apoptóticos nas células eritróides, como por exemplo, Bcl-X. Observações em linhagens celulares mostram que STATs e Bcl-X aumentam a expressão durante a maturação de células eritróides, com um aumento progressivo da expressão durante a diferenciação de BFU-E para CFU-E e rápido declínio em estágios posteriores de maturação (eritroblasto policromático e ortocromático). Alterações nas STATs podem induzir a uma morte prematura de precursores mielóides assim como relatado quando ocorre a diminuição de Bcl-2 e Bcl-X. (Testa, 2004, e Oda et al, 1998)

Estas vias são importantes no controle da eritropoese. Inúmeras vias de sinalização são ativadas em consequência da EPO além da via JAK/STAT, como a via e ras/MAP quinase (MAPK). A via ras/MAPK é uma via de sinalização mais complexa. Grb2 liga-se diretamente ou através da molécula Shc, uma tirosina fosforilada do EpoR. Grb2 pode por si só ativar a ligação entre SHP-2, cbl ou SOS as quais ativam a ras. Do mesmo modo, ras GTPase, proteína de ativação (GAP), é fosforilada, inibindo a desativação da ras. O GTP ativado, ligado ao ras, faz com que a raf seja fosforilada e

hemoglobina fetal, trazendo enorme benefício para pacientes com doenças falciformes e talassemias. No caso de mielodisplasias e hemoglobinopatias, este benefício só é observado após a utilização de altas doses de eritropoetina. Atualmente, a eritropoetina disponível no mercado é obtida por engenharia genética, mas seu custo é elevado tornando a utilização de altas doses inviável (Eschbach, 1994)

As anemias crônicas, hereditárias ou adquiridas, são tratadas com transfusões de hemácias fenotipadas e filtradas, sendo de alto custo para o Estado. A administração freqüente de hemácias determina, em muitos pacientes, a formação de anticorpos que inviabilizam a manutenção adequada do nível de glóbulos vermelhos sem grande despesa financeira para a busca de doadores de sangue compatíveis (Eschbach et al, 1989). Além disto, as transfusões crônicas não são livres de complicações. Além da disseminação de agentes virais, que nem sempre é possível conter, a hemocromatose é inevitável. Deste modo, um a dois anos após o início das transfusões, é necessária a administração subcutânea contínua de quelantes de ferro através de bombas de infusão (Hofmann e Koeffler, 2005, Arslan et al, 2004).

Visando buscar tratamentos seguros, eficazes e de custo acessível, iniciou-se então em 1994 os primeiros trabalhos utilizando o gene da eritropoetina na terapia gênica. Villeval et al (1994) realizaram a transferência do cDNA da eritropoetina murina, através de retrovírus, em células hematopoéticas, com posterior transplante de medula óssea de camundongos irradiados letalmente. O experimento foi relativamente bem sucedido, e animais normais apresentaram grande elevação do hematócrito, enquanto que em talassêmicos houve aumento discreto do hematócrito após 2 meses do transplante, com melhora do fenótipo em alguns destes. Entretanto, a ocorrência de policitemia fatal e melhora transitória em alguns animais mostraram que o método ainda precisaria de muitos ajustes.

No ano seguinte, utilizando-se adenovírus para transferência do cDNA da EPO, observou-se que a injeção subcutânea era mais eficiente do que a intraperitoneal, com elevação gradual do hematócrito por até 3 semanas após a injeção. Entretanto, o resultado indicava que não havia boa reprodutibilidade do ensaio e o efeito tinha curta duração (Setoguchi et al, 1994).

Hamamori et al (1995) transformaram mioblastos murinos com o gene da EPO inserido, num vetor não viral, e observaram que o implante destes mioblastos em camundongos com anemia por falência renal causava aumento do hematócrito por até 12 semanas após o implante.

Alguns estudos também demonstraram que células musculares lisas autólogas, obtidas de vasos sanguíneos, também expressavam a EPO, mas a manipulação destas células era difícil (Osborne et al, 1995 e Kessler et al, 1996).

Posteriormente demonstrou-se que células musculares esqueléticas eram um bom alvo para expressão da EPO através de transformação com adenovirus associado (AAV) (Ye et al, 1999). Porém, uma das limitações do uso do AAV é a dificuldade em se obter altos títulos para uso em humanos.

Estes trabalhos deram origem a outros, que visavam modificar *in vitro*, linhagens celulares de mioblastos murinos (C₂C₁₂), introduzindo o gene da EPO através de eletroporação, lipofecção ou infecção viral por adenovirus associado, para aplicação em humanos (Rinsch et al, 1997, Bohl et al, 1997, Regulier et al, 1998, Dalle et al, 1999, Serguera et al, 1999).

Neste período, a manipulação e a expansão de células humanas ainda era uma realidade distante e a possibilidade de se selecionar um clone de células estavelmente transformadas, com controle adequado da secreção de EPO, parecia ser mais viável. A vantagem deste método seria a facilidade de manipulação das células e a boa reprodutibilidade dos resultados. Estas células foram encapsuladas com membranas de poliestireno, para evitar os efeitos imunológicos do transplante xenogênico. Entretanto, a transmissão de doenças ainda desconhecidas era a grande limitação da técnica. Vários trabalhos foram realizados neste sentido e os resultados mostraram elevação de hematócrito em camundongos normais ou talassêmicos, porém, novamente com a ocorrência de policitemia (Dalle et al, 2000 e Bohl et al, 2000).

Deste modo, o controle da secreção de EPO é o grande desafio no desenvolvimento desta forma de terapêutica. Iniciou-se então a regulação da expressão pela tensão de oxigênio através da introdução na construção gênica, de seqüências do

promotor responsivas à hipóxia. Este sistema, entretanto, apesar de funcionar bem *in vitro*, se mostrou ineficiente *in vivo* (Payen et al, 2001, Binley et al, 2002).

Baseado nestes estudos prévios pode-se concluir que, para o uso da terapia gênica, de forma viável, como medida terapêutica em humanos, é necessário o controle estrito e reversível *in vivo* da expressão de elementos genéticos exógenos.

Muitos sistemas de regulação transcricionais vêm sendo descritos, alguns baseados no princípio geral de expressão do gene de interesse, baseados em elementos celulares endógenos, de promotores que respondam a sinais exógenos ou stress, como hormônios, hipóxia, citocinas ou íons. O uso de drogas indutoras da dimerização ou oligomerização de alguns genes também vem sendo estudado (Pollock e Clackson, 2002).

A oligomerização e a dimerização são mecanismos de controle biológicos que contribuem para a ativação de receptores de membrana celular, fatores de transcrição, fusão protéica e outras classes de proteínas intra e extracelulares. Métodos de regulação e ativação de dimerização por ligantes e terminação de vias de sinalização têm sido descritos (Spencer et al, 1993).

A utilização destes mecanismos para indução artificial da apoptose, seria uma alternativa para oferecer maior segurança à terapia gênica.

As vias da apoptose culminam com a ativação de uma série de enzimas denominadas caspases (proteases específicas de aspartato contendo cisteína). Cada caspase é uma proteína rica em cisteínas que, quando ativada, cliva proteínas-alvo em aspartatos específicos. Em humanos, já foram identificadas 14 caspases até o momento. Nas células normais, cada caspase está presente em um estado enzimaticamente inativo ou "forma zimogênio". Em geral, um zimogênio é um precursor inativo de uma enzima que contém uma cadeia polipeptídica mais longa que a enzima ativa final. Para transformar a forma zimogênio na caspase ativa, uma parte do polipeptídeo é removida por clivagem enzimática (Salvesen e Dixit, 1997).

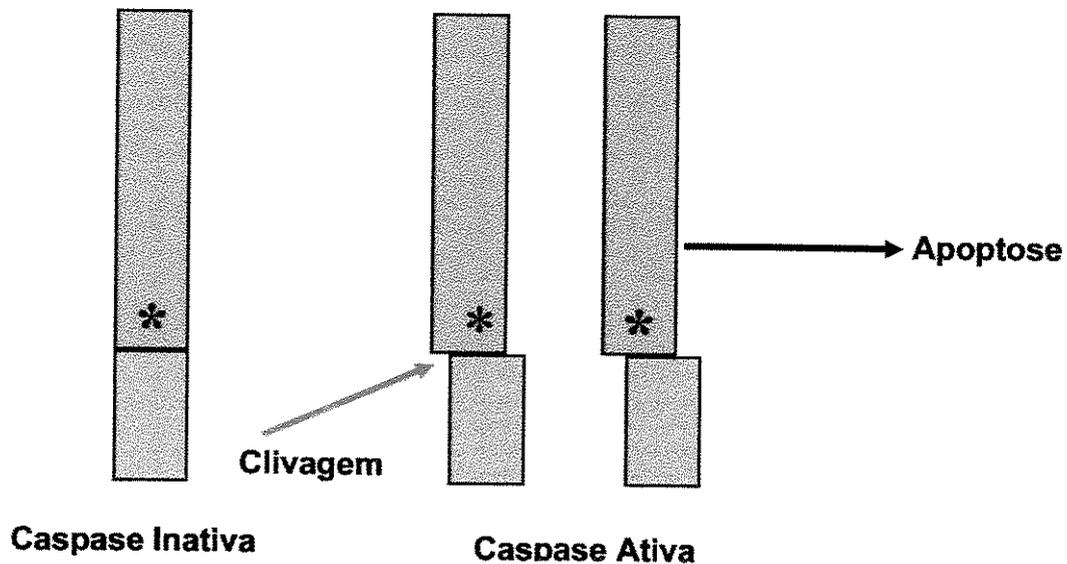


Figura 2: A caspase torna-se ativa após a clivagem de suas subunidades

Todos os membros da família das Caspases apresentam o domínio catalítico QACXG, onde a cisteína é o aminoácido ativo. As caspases são importantes no processo apoptótico e se dividem basicamente em dois grupos, as caspases executoras e as caspases efetoras.

O principal membro do grupo das caspases efetoras é a caspase-3 que, entre outras funções, cliva a subunidade inibitória do fator de fragmentação do DNA (DFF), também chamado iCAD, liberando a subunidade ativa desta molécula (CAD – Caspase ativada por Dnase), cuja função é migrar para o núcleo e fragmentar o DNA, gerando os fragmentos oligonucleossomais característicos da apoptose. Outros substratos importantes incluem proteínas do citoesqueleto, tais como fodrina, gelsolina, pectina e citoqueratina, cuja proteólise pelas caspases pode contribuir para o aparecimento das modificações na estrutura morfológica das células em apoptose. Também fazem parte do grupo executor as caspases-6 e 7.

O outro grupo é formado pelas caspases iniciadoras, do qual fazem parte as caspases-8, 9 e 10 e possivelmente, a caspase-2, cujo papel principal é ativar as caspases executoras (Riedl e Shi, 2004).

As caspases podem ser ativadas por vias intrínsecas e extrínsecas. A via intrínseca é mediada pela mitocôndria e em resposta a estímulos apoptóticos, muitas proteínas são requeridas no espaço transmembrana. Algumas destas proteínas estão

bem caracterizadas incluindo o citocromo c, SMAC (mitocôndria secundária – derivada de caspases ativadoras)/DIABLO (inibidor direto de apoptose (IAP)- proteína de ligação), AIF (fator indutor de apoptose), EndoG (endonuclease G) e OMI/HTRA2 (A2 proteína requerida em altas temperaturas). Todavia o passo mais empregado nesta via é a proteína citocromo c que se liga e ativa a proteína APAF-1 no citoplasma. Esta ligação induz uma conformação que se liga a ATP/dATP e forma o apoptosomo que leva à ativação da caspase-9 a qual desencadeia a cascata de ativação das caspases efetoras. As vias extrínsecas são iniciadas pela ligação extracelular a receptores de superfície celular como o FasL, ou a citocinas como Fas. Os receptores de superfície se ligam aos seus receptores formando um complexo que recruta fatores no citosol, como o FADD e a caspase-8, formando um complexo indutor de sinalização (DISC). A formação do DISC leva à ativação de caspases iniciadoras, a caspase-8 a qual cliva e ativa a caspase efetora, caspase-3 (Riedl e Shi, 2004).

Um sistema artificial de dimerização vem sendo testado, constituído por um indutor químico de dimerização (CID) que se liga a um adaptador específico, a proteína FKBP (FK506 – Binding Protein), que pode ser utilizado em construções gênicas. O FKBP é uma proteína de ligação com imunofilinas, presente em células linfóides T, e responsivo ao FK506, uma droga utilizada como imunossupressora no tratamento de reação de enxerto versus hospedeiro. Em condições normais, o FK506 se liga à célula, provocando dimerização das moléculas de FKBP, interação com calcineurina e imunossupressão. Baseado nestas propriedades do FKBP, a construção contendo esta molécula em fusão com o gene alvo vem sendo testada para a indução artificial da expressão gênica, como em 1996 por Freiberg et al que induziram a via Fas em células epiteliais humanas e em 1998, onde MacCorkle et al promoveram, *in vitro*, a ativação da cascata da apoptose através de construções contendo o cDNA do FKBP e o cDNA da caspases1 ou 3 (efetoras).

O sistema original de homodimerização foi realizado por Schreiber e Crabtree, em 1992. Um dímero de FKBP foi induzido através de ligação química de duas moléculas de FK506, denominado FK1012, o que eliminou a atividade imunossupressora da droga. Através desta foi possível ligar proteínas do tipo selvagem aos domínios do FKBP. A segunda geração de homodímeros começou a ser sintetizada

por cientistas da ARIAD/MIT, Cambridge, que desenvolveram o AP1510, sendo este sintético mais potente do que o FK1012. A atividade endógena do FKBP foi eliminada na terceira geração, através da síntese do AP1903 e AP20187, que se ligam especificamente a uma molécula de FKBP com a substituição do aminoácido fenilalanina por uma valina na posição 36 (Spencer et al, 1993 e Rivera 1998).

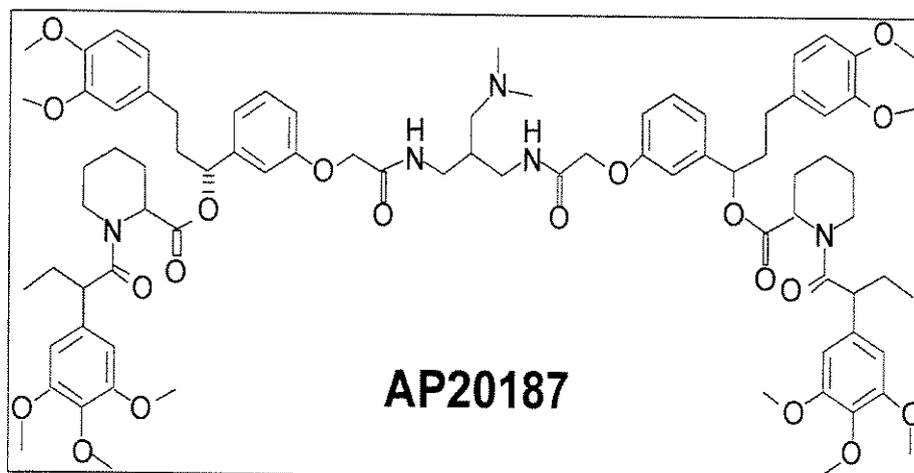


Figura 3: Indutor químico de dimerização, AP20187, produzido por ARIAD/MIT Pharmaceutical (Cambridge)

O AP1903 mostrou ser eficiente em células, mas o AP20187 obteve melhores resultados tanto em células quanto em animais. A administração do AP20187 a humanos saudáveis mostrou ser livre de toxicidade e não acarretou em reação imunológica (Xie et al, 2001, Li 2002 e Neff et al, 2002), podendo ser utilizado no controle da expressão gênica.

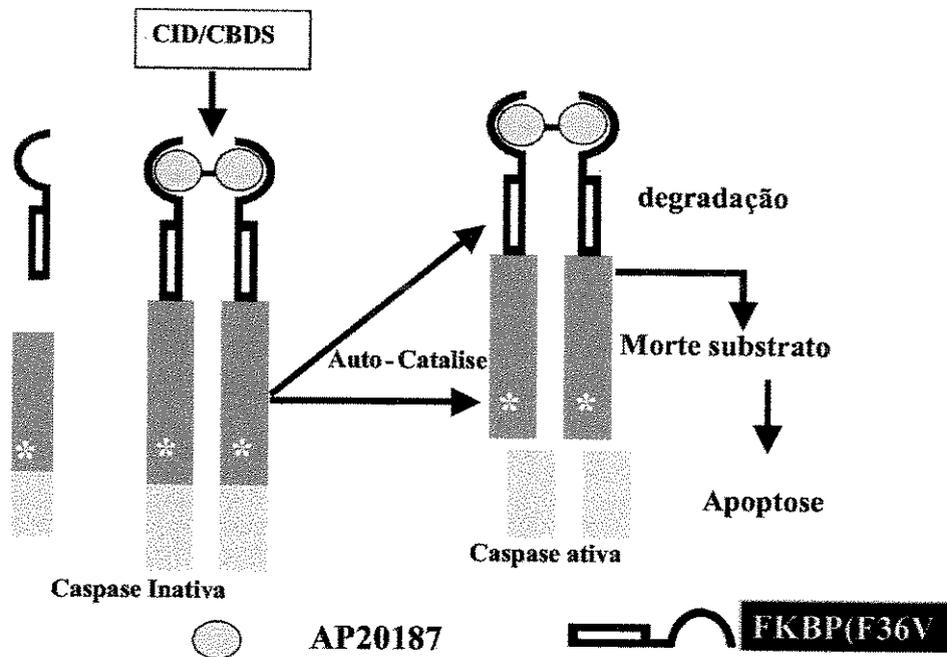


Figura 4: Modelo de ativação de dimerização através de um sistema artificial. Através da ligação do CID com a molécula do FKBP em fusão com a proteína alvo, ocorre a ativação da proteína que necessita se encontrar na forma de um dímero para ser expresso (Spencer et al, 1996 e Blau et al, 1997)

Outro sistema viável visando a segurança na terapia gênica é o do controle da expressão gênica pela tetraciclina, o sistema Tet-Off/Tet-On, vendido comercialmente.

Em *E.coli* a proteína Tet repressora regula negativamente o operon de resistência à tetraciclina. O TetR impede a transcrição gênica, ligando-se à seqüência do promotor (*tetO*) na ausência da tetraciclina (Tc). Este sistema tem sido amplamente utilizado em experimentos com células de mamíferos.

Um dos componentes do sistema contém o vetor de expressão da proteína denominada TetR. Este vetor possui o domínio VP16 do vírus Herpes simplex que forma o domínio de ativação que se localiza logo após o promotor de citomegalovírus, compondo assim o transativador tTA.

O segundo componente do sistema é o plasmídeo responsivo ao tTA (pTRE) no qual é inserido o gene de interesse, controlado pelo elemento responsivo a tetraciclina. O gene de interesse é clonado acima do promotor mínimo de citomegalovírus. Deste

modo, no sistema Tet-Off, a administração do antibiótico tetraciclina ou seu análogo doxociclina inibe a transcrição do gene alvo.

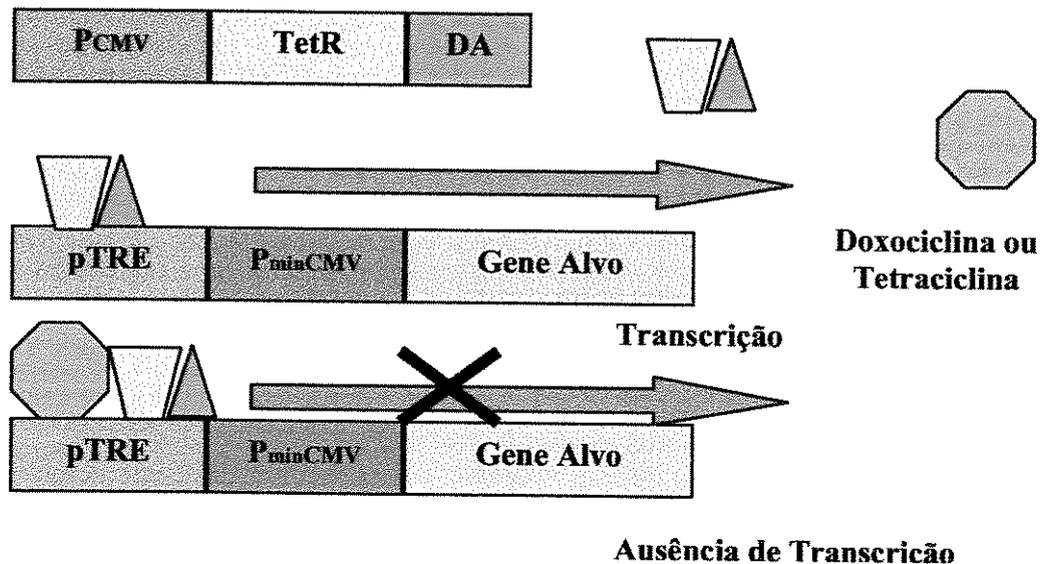


Figura 5: Modelo de ativação do sistema Tet-Off, onde na ausência do antibiótico ocorre a transcrição do gene alvo e na sua presença a afinidade do TetR pela tetraciclina inibe este processo

O sistema Tet-On difere do Tet-Off devido à mudança de quatro aminoácidos no TetR, levando este a tornar-se uma proteína repressora (tTetR). Assim a proteína híbrida, torna-se reversa rTA. Neste sistema a transcrição apenas ocorre após administração da doxociclina (Gossen et al, 1992 e Freundlieb et al, 1999)

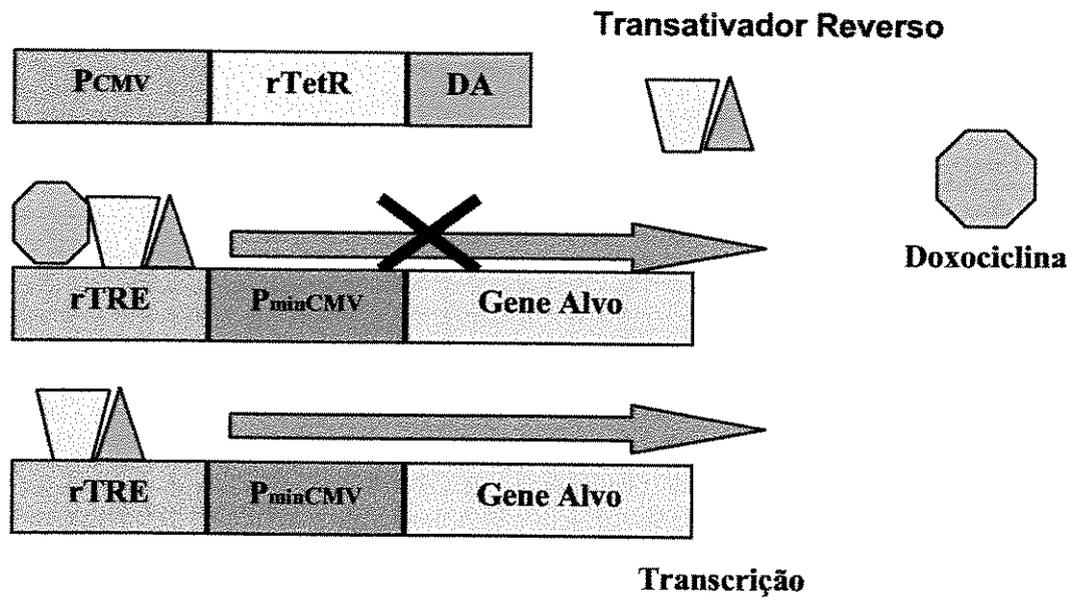
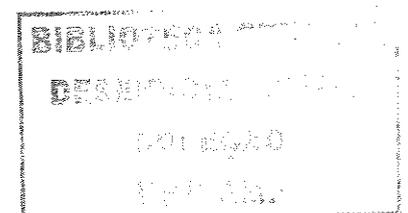


Figura 6: Sistema Tet-On. Diferencia do sistema Tet-Off por possuir um transativador reverso, que na ausência do antibiótico doxociclina inibe a transcrição gênica, enquanto que na sua presença, ocorre a transcrição

Estes sistemas vêm sendo utilizados há algum tempo no controle da expressão de vários genes, como o controle do fator de transcrição AP-1 em tumores cerebrais (Liu et al, 2002), regulação da expressão do gene CD97 em linhagens de carcinoma de cólon (Steinert et al, 2002), inclusive o gene da eritropoetina *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se muito eficiente (Payen et al, 2001 e Sommer et al, 2002).

Portanto, baseados nestes estudos, nosso projeto foi iniciado visando a investigação de sistemas de controle da expressão de genes alvos que viabilizem o uso seguro da terapia gênica na prática clínica.



OBJETIVOS

Diante do exposto, foram objetivos do estudo:

- Verificar a eficiência do sistema FKBP – iCasp9 em induzir a apoptose em células murinas.
- Verificar a eficiência do sistema FKBP – iCasp9 em regular a expressão do gene da eritropoetina
- Comparar a eficiência do sistema FKBP – iCasp9 com o sistema Tet-Off no controle da expressão da eritropoetina

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Obtenção dos plasmídeos

O vetor iCasp9 (pSH1/Sn-E-Fv¹-FvIs1-casp9), contendo duas moléculas do cDNA do FKBP ligadas em tandem e uma molécula do cDNA da caspase-9, utilizado para estudos *in vitro* e *in vivo*, foi gentilmente cedido pelo Dr. David M. Spencer, do departamento de Imunologia da Faculdade de Medicina Baylor em Houston.

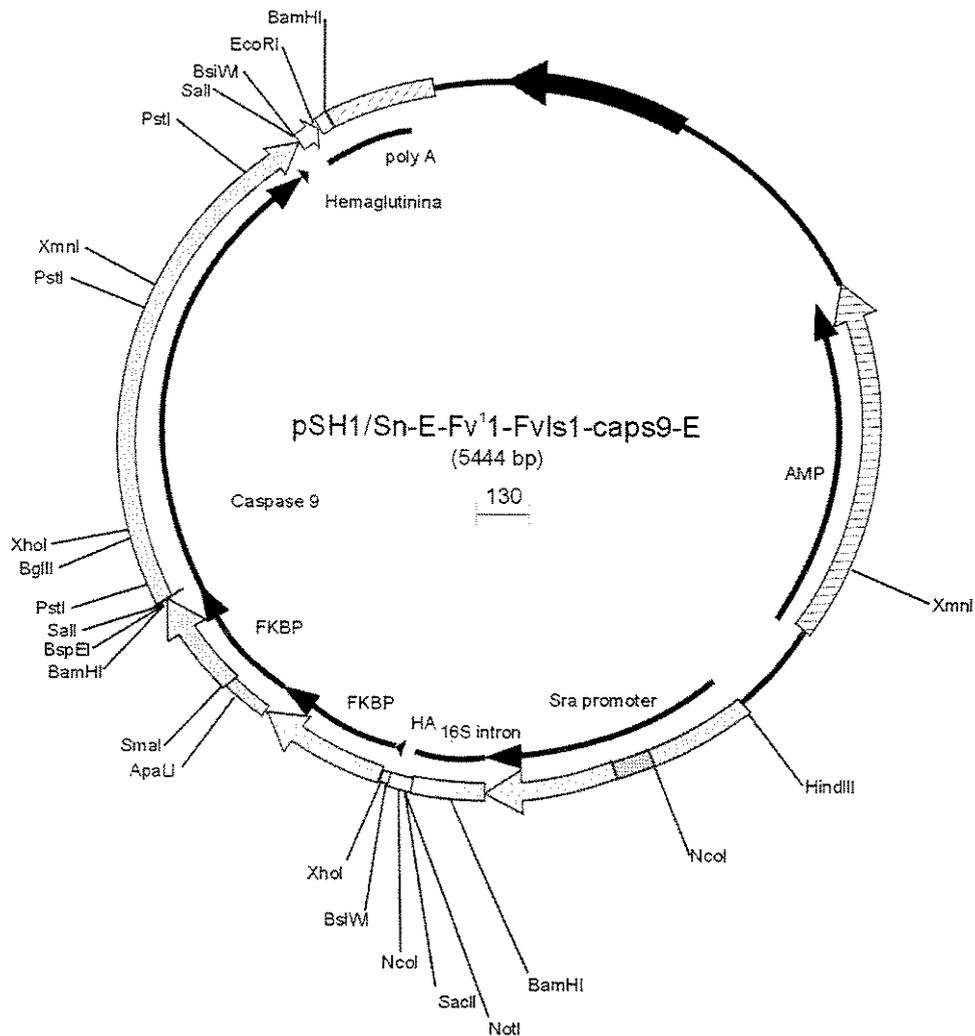


Figura 7: Vetor iCasp9 (pSH1/Sn-E-Fv¹-FvIs1-casp9), utilizado nos estudos *in vitro* e *in vivo*

Para estudos *in vivo*, além do vetor iCasp9, também foram utilizados dois plasmídeos do sistema Tet-Off (Clontech Laboratories). Um dos vetores, contendo o cDNA da eritropoetina murina ou pBS-mEpoD, e o vetor denominado transativador, ptet-tTA, foram cordialmente cedidos pelo Laboratório de Terapia Gênica, Instituto de Hematologia Universitário, Hospital Saint Louis, Paris.

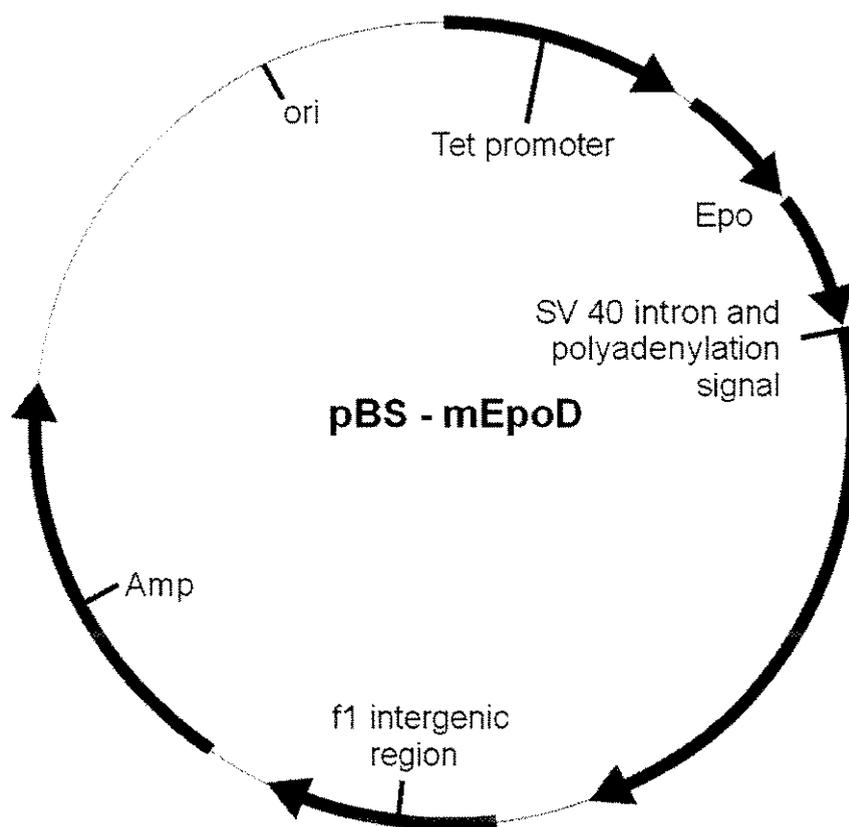


Figura 8: Plasmídeo pBS-mEpoD contendo duas moléculas do cDNA da EPO murina, sob controle do vetor ptet-tTA.

Ambos os vetores (pBS-mEpoD e ptet-tTA) contendo as construções foram utilizados para transformar bactérias DH5 α competentes, cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) com Ampicilina e o DNA isolado por maxi-preparação (Plasmid Maxi Kit - Qiagen) e em seguida purificados duplamente, através de centrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio (CsCl₂) (Molecular Cloning – A laboratory manual). A

técnica consiste em usar 1g de CsCl₂ para cada ml de plasmídeo, adicionar 0,8ml de solução de brometo de etídeo (10mg/ml em água) para cada 10ml de solução (DNA/CsCl₂), centrifugar a 7.700 g. Coletar o sobrenadante e transferir para tubo de 13x51mm centrifugando-se a 194.000 g por 18 horas a 20°C. Em seguida remove-se o brometo de etídeo.

2. Administração do CID

A administração do AP20187 (figura), *in vitro* e *in vivo*, foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (ARIAD Pharmaceuticals).

Para a administração *in vitro* do AP20187, deve-se dissolver o material liofilizado em ETOH 100%, sendo 175µl de ETOH para cada 250µg do produto, deixando a solução estoque com uma concentração de 1mM. O produto deve ser diluído em meio RPMI e administrado às células na concentração de 100 nM. Após 24 horas de tratamento, as células são lavadas com PBS e coletadas para análise.

Para estudos *in vivo*, o fabricante aconselha que à solução estoque, seja adicionado 16µl de ETOH 100% para cada 1mg da droga liofilizada, obtendo assim uma concentração de 62,5mg/ml. A diluição do estoque para administração *in vivo*, foi realizada em ETOH 100%, PEG-400 e Tween 20 (2%), devido ao AP20187 ser muito volátil. Cada animal de 30g recebeu 0,06mg de AP20187 em um volume total de 240µl.

Estudos *in vitro*

3. A – Cultura de células C₂C₁₂

Células murinas C₂C₁₂, derivadas do músculo esquelético da pata de camundongos adultos C3H, foram obtidas através de American Type Culture collection (ATCC; CRL 1777, MD, USA) e crescidas em meio Dulbecco's Eagle's modificado, com meio essencial mínimo contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37 °C em estufa de CO₂.

4. B – Obtenção da Linhagem Estável com plasmídeo da Caspase9

A transfecção estável foi realizada para obtermos clones de células C₂C₁₂ murinas, contendo o vetor iCasp9, onde pudemos detectar a expressão da proteína caspase 9 humana e testamos a resposta ao AP20187.

Transfecção Estável – durante a transfecção estável as células C₂C₁₂ foram colocadas em placas de Petri de 10 cm na densidade de 1×10^5 céls/placa. As células foram transfectadas com 20µg de iCasp9 com 1µg de vetor pMC1neoPolyA (Stratagene, Saint Quentin en Yvelines, France), 1440µl OptiMEM (Invitrogen Life Technologies), e 60µl de Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acordo com o manual de instruções do fabricante (Invitrogen Life Technologies). As células foram incubadas por 45 minutos, e foi adicionado mais 4,5ml de OptiMEM (Invitrogen Life Technologies). As células foram lavadas com PBS e OptiMEM (Invitrogen Life Technologies) e replaqueadas em 6ml de Opti mix de transfecção. Após 4 horas, a 37 °C foi adicionado 20ml de DMEM com 10% FBS.

As células foram selecionadas através do antibiótico neomicina, 1000 µg/ml (Invitrogen Life Technologies), por duas semanas e os clones foram testados através de PCR para detectar a presença do vetor iCasp9 e por Western Blotting para detecção da proteína de fusão (uma molécula de Caspase-9 e duas de FKBP)

Dois clones estavelmente transfectados e exibindo alta expressão de iCasp9 foram escolhidos para realização de transfecção transitória utilizando vetor contendo o gene da luciferase.

Transfecção Transitória – células C₂C₁₂ foram colocadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10^4 céls/poço. As células foram transfectadas transitoriamente com 0,5µg a 1µg de iCasp9 (pSH1/Sn-E-Fv⁻-FvIs-casp9) em 50µl de OptiMEM (Invitrogen Life Technologies) e 0,04µg de plasmídeo Renilla (*Renilla* – Luciferase Assays System – Promega) expressando luciferase, utilizado como um controle interno da transfecção, e 2,5 µl de lipofectamina, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen Life Technologies). Após 45 minutos de incubação, as células foram lavadas com PBS. A lipofecção foi realizada durante 3 horas, a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Em seguida, foi adicionado 1ml de DMEM contendo 20% de FBS permanecendo assim por 24 horas.

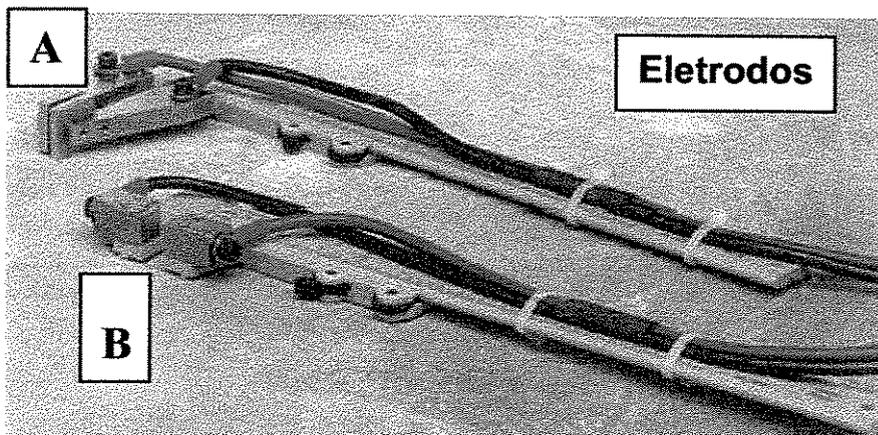
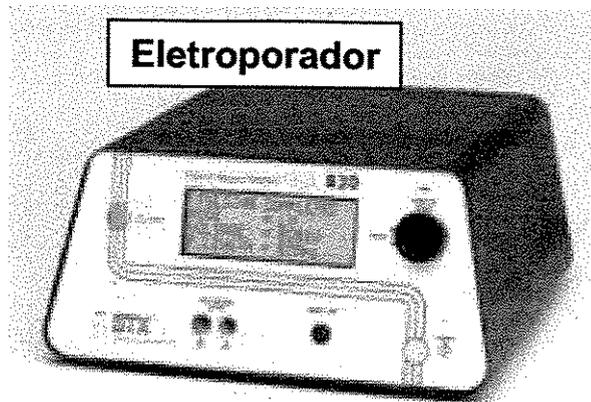
5. Análise da Expressão da Luciferase em linhagens estáveis expressando a construção iCasp9

A atividade da luciferase foi medida usando kit de quantificação de luciferase *Renilla* da Promega. Brevemente as células foram coletadas e centrifugadas a 13000 rpm em tubos de 1,5 ml, através de pequenos pulsos. Para lisar as células, foram adicionados 100 µl de tampão de lise e estas células foram congeladas a -20°C, em seguida foram descongeladas e adicionou-se 20 µl de solução tampão *Renilla* e a quantificação foi realizada em luminômetro (LuminometroTD-20e). A medida de luminescência foi realizada de acordo com curva padrão de luciferase.

Estudos *in vivo*

Para os estudos *in vivo*, o projeto foi inicialmente aprovado pelo comitê de ética animal da Unicamp. Utilizamos camundongos fêmeas C57Bl/6 de oito a doze semanas de idade, obtidos no CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp.

Os 82 animais utilizados foram inicialmente marcados com furador de orelha, e colocados em tubos Falcon (50ml) contendo pequena fenda na lateral para conter os animais. O sangue utilizado para medida do hematócrito (basal) foi obtido de pequeno corte, utilizando um bisturi, na cauda do animal. O sangue foi disposto em capilares heparinizados, centrifugados em centrífuga de microhematócrito (FANEM) por 3 minutos a 8000 rpm. Após coleta de hct, estes foram anestesiados com quetamina (8mg/kg) e xilasina (3mg/kg) intraperitonealmente (IP). Em seguida foi realizada raspagem do pêlo dos animais, da pata inferior esquerda, com auxílio de lâmina de barbear, e os vetores foram injetados , com auxílio de seringa de insulina, no músculo tibial cranial, seguido de eletroporação de 8 pulsos – 20ms- 200V/cm – Freqüência de 1 HZ, utilizando o eletroporador ECM 830 da marca BTX Molecular Delivery Systems. O eletroporador contém um eletrodo que é fixado à pata do animal para que as descargas elétricas sejam realizadas.



A: garra do eletrodo para animais de grande porte e **B:** garra do eletrodo para animais de pequeno porte

Foram realizados três experimentos. As concentrações de vetores estão demonstradas nas tabelas abaixo:

Tabela 1: Experimento 1: Teste de concentração ideal de vetor iCasp9

[] Plasmídeos	Grupo 1 (n=11)	Grupo 2 (n=11)	Grupo 3 (n=11)
lCasp9	∅	6,0 µg	10,0 µg
pBS-mEpoD	5,0 µg	5,0 µg	5,0 µg
ptet-tTA	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
pUC18	10,0 µg	4µg	∅

Tabela 2: Experimento 2: Teste para verificar sustentação do hematócrito e administração do AP20187

[] Plasmídeos	Grupo 1 (n=13)	Grupo 2 (n=36)
iCasp9	∅	6,0 µg
pBS-mEpoD	5,0 µg	5,0 µg
ptet-tTA	0,5 µg	0,5 µg
pUC18	6,0 µg	∅

O AP20187 foi administrado aos animais que, na quarta semana após injeção de plasmídeos, obtiveram elevação no hct acima de 65%.

O terceiro experimento foi realizado para comparar a eficiência do sistema iCasp9/AP20187 e o sistema da Tet-Off no controle da expressão do gene da eritropoetina. Foram utilizados seis animais do experimento 2, os quais não

responderam ao AP20187. Estes animais receberam doxociclina, via oral, por duas semanas.

Tabela 3: Experimento 3 : Sistema ptet-mEpoD

[] Plasmídeos	Grupo 1 (n= 6)
iCasp9	6,0 µg
pBS-mEpoD	5,0 µg
ptet-tTA	0,5 µg
pUC18	∅

Ao término dos experimentos os animais foram novamente anestesiados e foi realizado deslocamento cervical.

6. Medida da eficiência do sistema pBS-mEpoD/iCasp9 na elevação do hematócrito

A eficiência foi testada a partir da quarta semana, após a injeção dos plasmídeos, através de coleta do sangue da cauda por capilares durante quinze semanas após administração de vetores.

Em dez animais foi realizada coleta de sangue via retro-orbital e posterior sacrifício por deslocamento cervical para retirada do músculo injetado que foi submetido à análise imunohistoquímica e PCR.

7. Administração do CID/AP20187

O CID/AP20187 foi administrado (IP), em um volume total de 240µl, aos animais que apresentaram elevação do hematócrito acima de 65%, na quarta semana após injeção de vetores, em uma concentração de 3mg/kg, sendo que os animais pesavam

cerca de 30g. Este tratamento foi monitorado nas semanas após a aplicação do CID, sendo coletado hematócrito.

8. Administração de Tetraciclina/Doxociclina aos camundongos

Foi administrada a seis animais com hct acima de 65%, Doxociclina (Vibramicina-Doxociclina monohidratada – 100mg Laboratórios Pfizer Ltda), um análogo da Tetraciclina, diluída em água estéril, na concentração de 200µg/ml com 5% de sucrose. A administração foi realizada oralmente através de bebedouros, por duas semanas.

9. Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de PCR foi realizada para testar a presença da construção iCasp9, e o plasmídeo iCasp9 foi utilizado controle positivo. Para a extração do DNA genômico, tanto das células C2C12 quanto do músculo injetado com os vetores, dos animais sacrificados, foi utilizado kit de extração de DNA da Gibco (easyDNA, Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. A reação de PCR ocorreu em volume final de 50 µl contendo 25 mM KCl; 10mM Tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1 mM de cada desoxinucleotídeo dATP, dCTP, dGTP e dTTP; 500 ng de DNA genômico e 2 unidades de Taq DNA polimerase recombinante (Life Technologies, Inc). O fragmento esperado de 400 pares de bases foi obtido utilizando-se 100 ng de cada iniciador sense (**CAP9s** 5' CGG AAA CAC CCA GAC CAG TG 3') e antisense (**CAP9as** 5' CGA CAC AGG GCA TCC ATC TG 3') sintetizados por Integrated DNA Tech. A reação foi realizada em termociclador envolvendo 35 ciclos de incubação sendo 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento a 56°C e 1 minuto de extensão a 72°C. O fragmento da reação foi visualizado em gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo.

10. Western Blotting

Foi utilizado para detectar a expressão da proteína iCasp9 em células. A proteína foi obtida através do extrato total das células, onde concentrações iguais desta proteína foram fracionadas em gel de Poliacrilamida 12% contendo SDS. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e a membrana foi incubada com anticorpo policlonal anti-caspase-9 (H-83, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Ca, 1/1000) e anticorpo secundário ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). A membrana foi exposta e revelada em filme de raio-x.

11. Reação de TUNEL

Para esta técnica, cortes de 4µm foram realizados nos tecidos incluídos em parafina, com auxílio de micrótomo. Os tecidos desparafinizados ou as células C2C12 foram colocados em lâminas de microscopia com auxílio de micropipeta. A seguir, as lâminas foram tratadas com proteinase K por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida lavadas com PBS e realizada a fixação do material com paraformol 4% em PBS por 5 minutos, seguido de lavagem dupla das lâminas com PBS, por 5 minutos.

A análise da apoptose, das células transfectadas estavelmente e no músculo injetado de camundongos com vetor iCasp9 e tratados com AP20187, foi realizada pela técnica de TUNEL através do kit comercial DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL System (Promega – Bioagency), onde as lâminas foram incubadas com tampão de equilíbrio por 10 minutos a 37°C; a seguir adicionou-se TdTEnzyme e Nucleotide Mix, e incubou-se por 1 hora a 37°C em câmara úmida e escura. Após a incubação as lâminas foram lavadas com SSC, duas vezes por 15 minutos, e com PBS por 5 minutos. Foi realizada coloração com iodeto de propídeo (1µg/ml) em PBS, em câmara escura por 15 minutos; lavou-se as lâminas por 3 vezes com água destilada. Adicionou-se “anti-fading solution” às lâminas e estas foram seladas e colocadas para secar de 5 a 10 minutos em câmara escura.

A detecção da fluorescência por esta técnica é realizada através de conjugados com peroxidase, e a viabilidade foi observada em microscópio de fluorescência verde 520nm e vermelho 620nm.

12. Análise Estatística

O objetivo da análise estatística foi comparar o hct dos animais injetados com plasmídeo da EPO murina sob o controle do sistema de expressão Tet-Off, analisar a eficiência do sistema da indução da morte celular através da Caspase-9 junto ao indutor químico de dimerização AP20187 e comparar com a eficiência do sistema da tetraciclina.

Os testes utilizados foram: Mann-Whitney, uma prova não paramétrica, destinada a comparar duas amostras independentes de mesmo tamanho ou desigual, e Wilcoxon que é uma prova não paramétrica destinada a comparar dados pareados de uma amostra em ocasiões distintas: antes e depois. O nível de significância aceito, foi de 0,05.

O programa Instat foi utilizado para os dados estatísticos e utilizamos o programa Excell para construção dos gráficos.

RESULTADOS

Estudos *in vitro*

13. Obtenção de Linhagem C₂C₁₂ Estavelmente Transfectada com plasmídeo iCasp9

Foram obtidos 136 clones de C₂C₁₂ transfectados estavelmente selecionados com antibiótico neomicina. Por técnica de PCR foi possível detectar a presença do inserto em 120 destes clones, onde três clones foram selecionados para estudo.

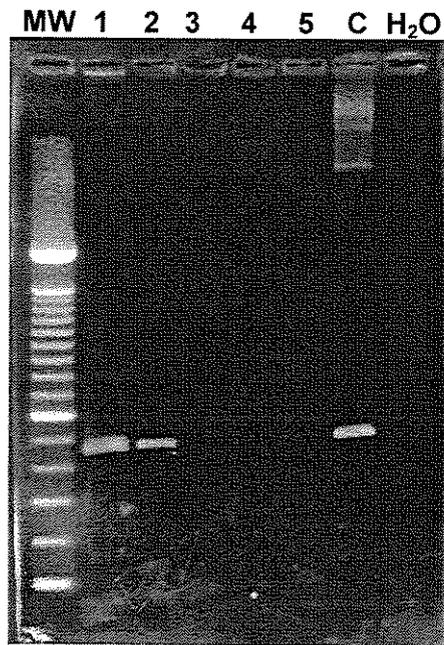


Figura 9: MW= marcador de peso molecular ladder 100pb, 1 a 5 = clones C₂C₁₂ transfectados estavelmente com cDNA da Caspase-9, C= controle positivo

Usando a técnica de Western Blotting, com anticorpo anti-caspase-9 (Santa Cruz), detectamos a presença da caspase-9 humana. A proteína de fusão possui peso molecular de 66kD, correspondendo à caspase-9 (46 kD) e duas moléculas de FKBP (cerca de 10kD cada molécula).

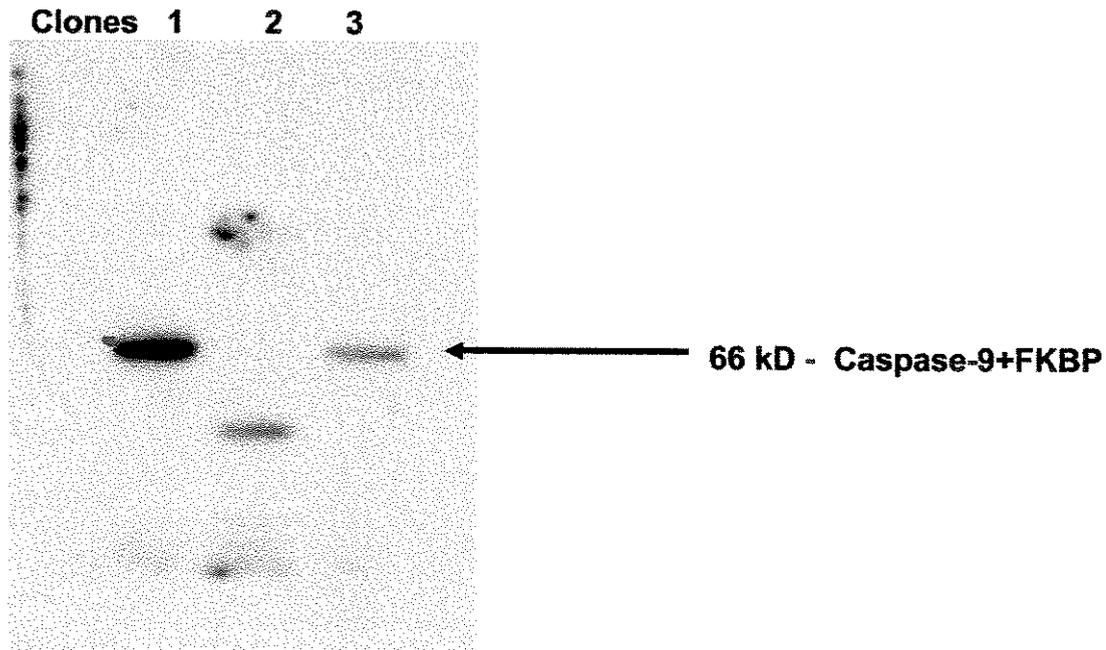
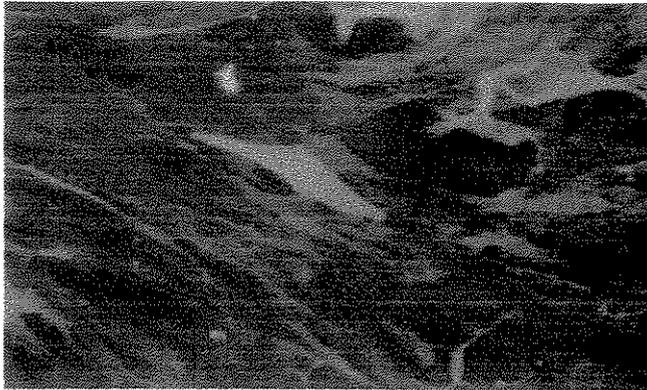


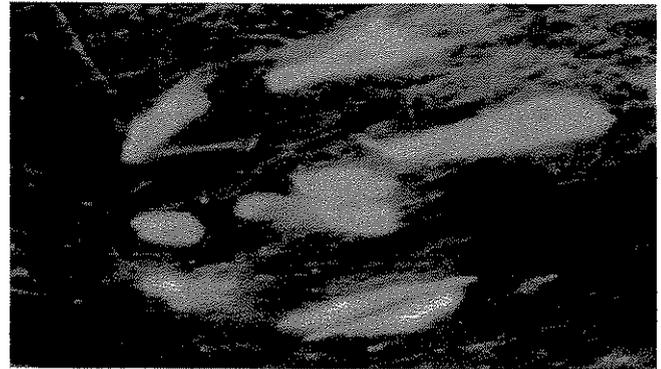
Figura 10: Western blotting de clones de células C₂C₁₂ transfectadas estavelmente com vetor iCasp9

14. Resposta ao CID/AP20187

Os clones de células C₂C₁₂ transfectadas estavelmente com iCasp9, foram tratados com 100 nM de AP20187 durante 24 horas, e em seguida, foi realizada técnica de TUNEL para detecção de apoptose. Através deste experimento demonstrou-se que o AP20187 se ligou à molécula de FKBP induzindo a morte celular, pois 90% das células entrarem em apoptose.



(A)



(B)

Figura 11: Reação de TUNEL em células C_2C_{12} , transfectadas estavelmente. (A) células não tratadas com CID, (B) células tratadas com AP20187. Observe que após o tratamento com a droga, ocorreu fragmentação celular detectada pela incorporação de iodeto de propídio no DNA fragmentado com consequente emissão de fluorescência, indicando assim a ativação da caspase-9

15. Análise da Expressão da Luciferase em linhagens estáveis expressando a construção da Caspase-9/FKPB (F36V)

Houve redução de 70 a 90% na atividade de Luciferase após indução com AP20187, nos clones 1e 3, sugerindo que as células entraram em apoptose.

Um clone controle, transfectado apenas com o vetor da luciferase, não obteve variação na atividade de luciferase após indução com AP20187.

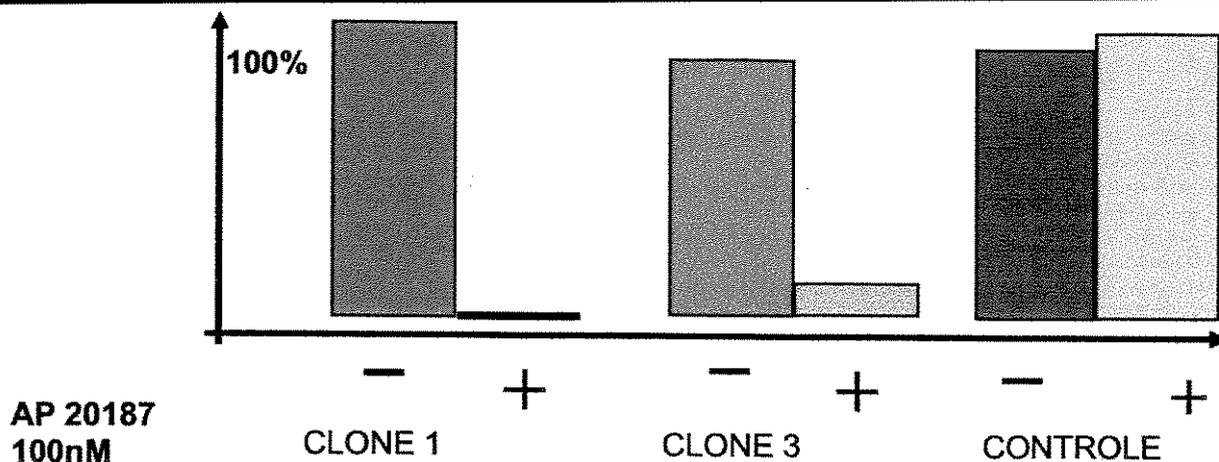


Gráfico 1: Atividade da Luciferase após administração do CID (AP20187)

Estudos *in vivo*

16. Eficiência do sistema pBS-mEpoD/iCasp-9 na elevação e sustentação do hematócrito

Os animais apresentam em média, em condições basais, hematócrito de 55%. Após a injeção do plasmídeo foi considerado como aumento relevante, animais que apresentaram hct acima de 65% (Tabela 4).

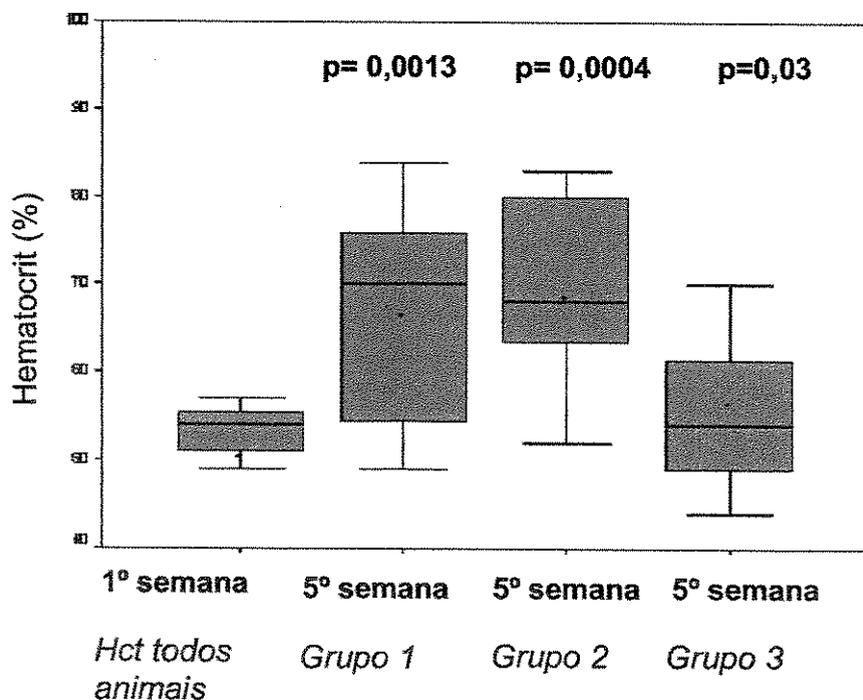


Gráfico 2: Elevação do hematócrito dos animais do grupo 1 a 3, que receberam pBS-mEpoD (5,0 µg) e iCasp9 (5,0 µg – grupo 2; e 10,0 µg – grupo 3)

Como vemos, o hematócrito mediano inicial é de 55%. Após a injeção de plasmídeo pBS-mEpoD (ver grupo 1) o hematócrito destes animais aumentou consideravelmente, atingindo mediana aproximada de 70%. Aos grupos 2 e 3 além da administração do vetor pBS-mEpoD, também foi administrado o vetor iCasp9 em 5,0µg e 10,0 µg respectivamente. No grupo 2 observamos que o aumento do hct é um pouco menor, porém de diferença irrelevante. O mesmo não ocorre no grupo 3, onde não ocorreu aumento significativo no hematócrito, sugerindo que altas concentrações do plasmídeo iCasp9 interfere na expressão da Epo.

Tabela 4: Dados da eficiência do sistema Tet-Off/iCasp-9 na elevação do hematócrito (%), antes e após, administração dos plasmídeos

n	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
	Basal	4ª semana	Basal	4ª semana	Basal	4ª semana
1	54	55	55	82	53	57
2	52	73	54	52	52	62
3	60	84	50	62	57	65
4	55	70	54	65	52	83
5	56	49	58	83	50	50
6	57	67	55	67	55	47
7	54	80	55	68	53	55
8	56	65	57	80	49	58
9	55	51	53	80	50	51
10	56	79	59	42	58	61
11	59	71	52	62	55	64

Com base neste estudo inicial, realizamos novo experimento, onde injetamos os plasmídeos em um grupo maior de animais, nas concentrações administradas anteriormente aos grupos 1 e 2 respectivamente [grupo 1, n=13: pBS-mEpoD (5,0 µg); grupo 2, n=36: pBS-mEpoD (5,0 µg) e iCasp9 (5,0 µg)]. No grupo 1, 4 animais (30,76%) não apresentaram elevação do hematócrito e os demais (n=9, 69,24%) obtiveram níveis de hematócrito variando de 75% a 83%. Destes nove animais, 5 (55,55%) sustentaram o hematócrito acima de 65% por mais que 15 semanas (gráfico 3

e tabela 5). Os animais acompanhados somente até a 12^a semana (n=4) foram sacrificados para outras análises.

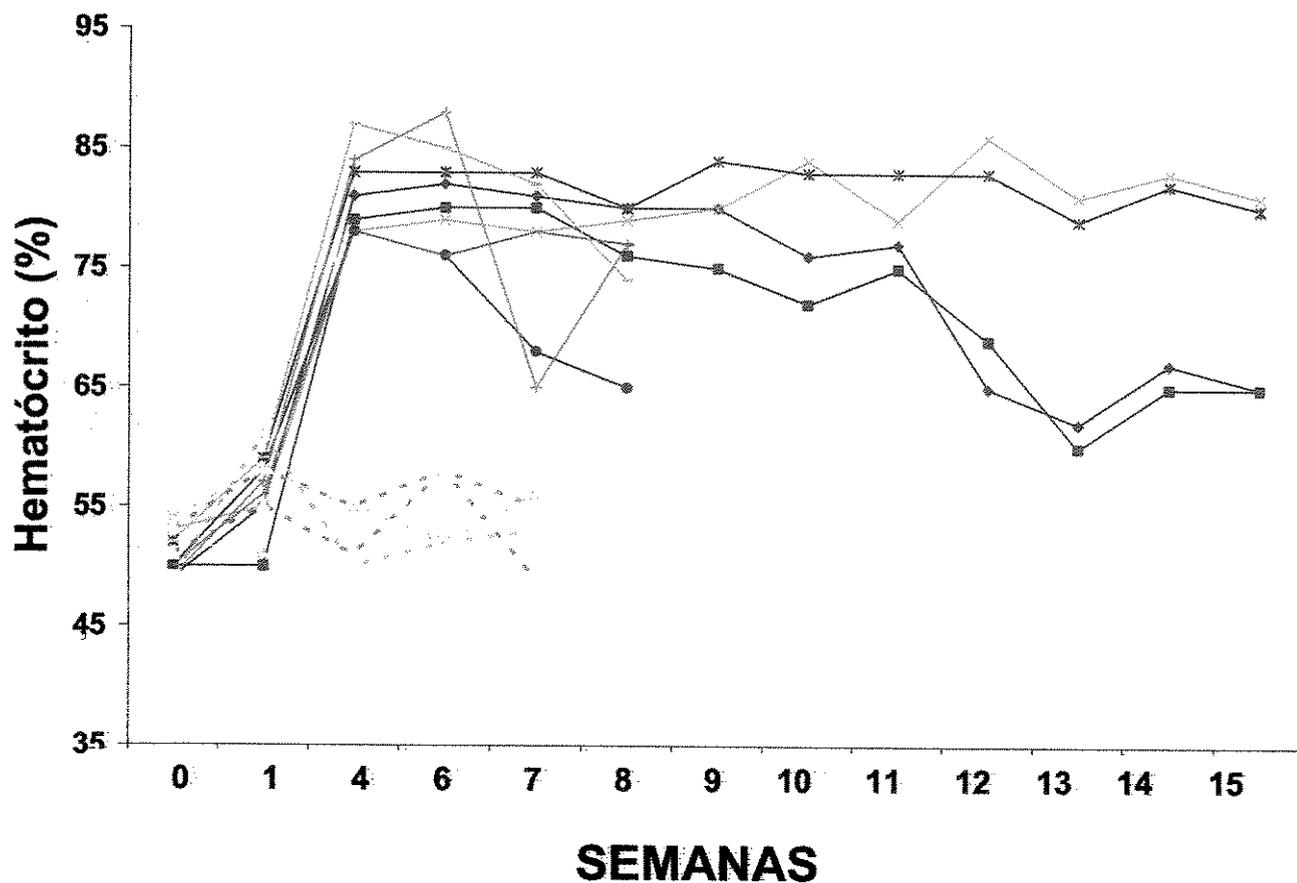


Gráfico 3: Animais injetados com pBS-mEpoD (n=9) mostrando, em 5 animais, sustentação do hct (> 65%) por até 15 semanas após purificação dupla com CsCl₂.

No grupo 2, dos 36 animais que receberam ambos os sistemas pBS-mEpoD e iCasp9, 3 animais foram a óbito (8,33%); 10 animais não obtiveram elevação do hct (30,3%) e 23 animais (63,9%) tiveram elevação do hct variando de 65 a 90%. Estes animais foram selecionados para receber a droga AP20187. Observamos que aqueles que não responderam à droga conseguiram sustentar o hct acima de 78% por mais que 15 semanas (gráfico 4 a, b; tabela 6). Em relação aos 3 animais que foram a óbito, em 1 o óbito foi constatado logo após a eletroporação e em 2 destes o óbito ocorreu logo após a primeira semana, provavelmente devido à trombose pela elevação precoce observada no hct.

Tabela 5: Medida do hematócrito (%) antes e após a administração do sistema pBS-mEpoD - TetOff . (Grupo 1)

n	Basal	1ª Sem	4ª Sem	6ª Sem	7ª Sem	8ª Sem	9ª Sem	10ª Sem	11ª Sem	12ª Sem	13ª Sem	14ª Sem	15ª Sem
1	53	55	58	49									
2	49	50	52	53									
3	51	51	58	55									
4	54	55	52	56									
5	50	59	78	76	68	65							
6	49	55	84	88	65	77							
7	50	57	78	76	78	77							
8	52	53	87	85	82	74							
9	49	59	81	82	81	80	80	76	77	65	62	67	65
10	50	58	79	80	80	76	75	72	75	69	60	65	65
11	52	61	82	83	82	83	85	80	80	82	74	79	80
12	53	55	78	79	78	79	80	84	79	86	81	83	81
13	52	58	83	83	83	80	84	83	83	83	79	82	80

Legenda – Animais sem elevação do hct= 4 (30,76%), Animais que sustentaram hct >65% por mais que oito semanas = 4 (45,55%), Animais que sustentaram o hct >65% por mais que 15 semanas = 5 (55,55%).

Tanto no grupo de animais que recebeu somente o vetor pBS-mEpoD (controle) quanto no grupo que recebeu pBS-mEpoD e iCasp9 (estudo) e não respondeu ao CID, a mediana basal inicial do hct era de aproximadamente 52%; na quarta semana após injeção de vetores esta sobe para 82% chegando a décima quinta semana com mediana do hct de 80% (gráfico 3 e 4, tabelas 5 e 6).

17. Resposta ao CID/AP20187

O CID foi administrado aos animais injetados com os vetores pBS-mEpoD e iCasp9 que obtiveram elevação do hct acima de 65%. Foi realizada aplicação intraperitoneal na concentração de 3mg/kg por animal.

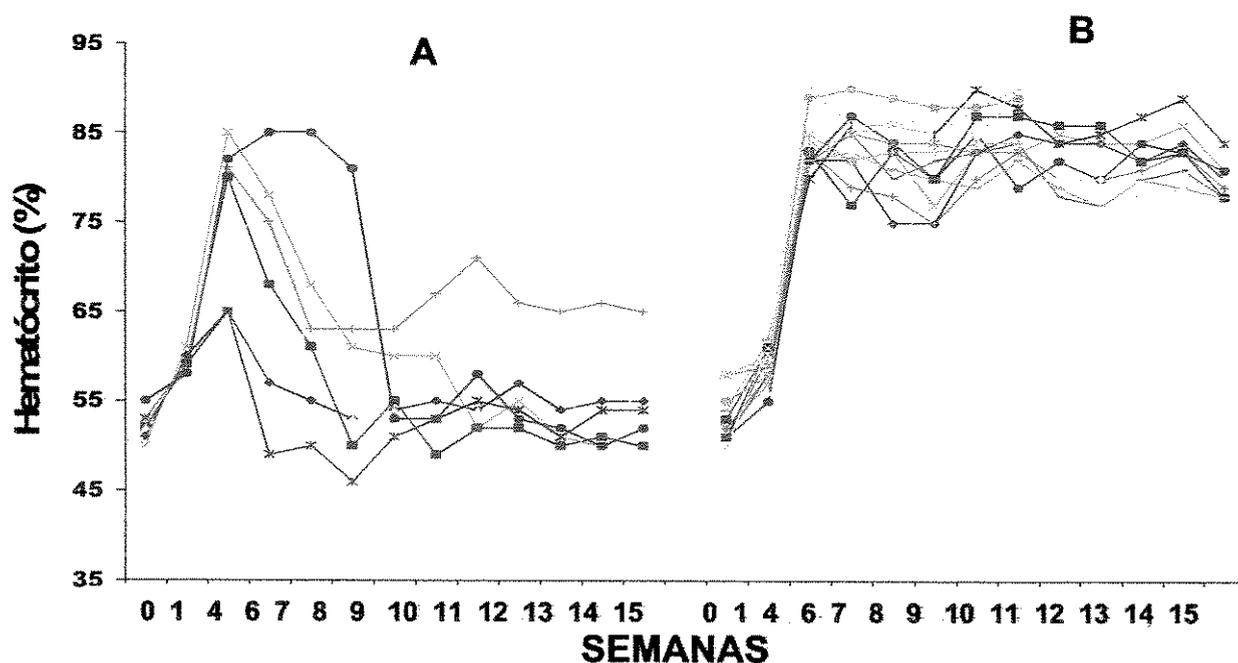


Gráfico 4: Hematócrito no grupo tratado com AP20187. (A) animais que responderam ao tratamento (n=7), e em (B) animais que não responderam (n=16). A administração da droga foi realizada na semana 4

Tabela 6: Medida do hematócrito (%) antes e após a administração do sistema pBS-mEpoDTetOff / iCasp9 (Grupo 2). Os animais que apresentaram elevação do hematócrito acima de 65% receberam o CID (AP20187) na semana 4

n	Basal	1ª Sem	4ª Sem	6ª Sem	7ª Sem	8ª Sem	9ª Sem	10ª Sem	11ª Sem	12ª Sem	13ª Sem	14ª Sem	15ª Sem
1	51	74	*										
2	50	76	*										
3	53	*											
4	54	55	55	55									
5	48	50	55	48									
6	52	55	57	49									
7	52	52	53	51									
8	55	55	55	51									
9	52	56	55	61									
10	53	55	54	52									
11	51	52	53	54									
12	50	55	62	57									
13	54	55	55	52									
14	51	50	56	57	55	53	54	55	54	57	54	55	55
15	52	59	50	58	61	50	55	49	52	52	50	51	50
16	52	55	65	86	57	59	54	58	54	61	55	59	56
17	50	61	65	78	58	61	60	60	52	55	51	50	52
18	53	59	65	49	50	46	51	53	55	54	51	54	54
19	55	58	82	85	85	81	53	53	58	53	52	50	52

n	Basal	1ª Sem	4ª Sem	6ª Sem	7ª Sem	8ª Sem	9ª Sem	10ª Sem	11ª Sem	12ª Sem	13ª Sem	14ª Sem	15ª Sem
20	53	59	61	75	63	69	83	67	71	86	63	66	65
21	51	60	82	82	75	75	83	85	84	84	82	84	80
22	53	61	83	77	83	80	87	87	86	86	82	83	78
23	52	56	84	82	81	68	75	83	76	80	80	81	79
24	52	57	85	82	83	77	83	83	85	84	84	86	81
25	51	61	80	86	86	85	90	88	84	85	87	89	84
26	51	55	82	87	84	80	85	79	82	80	84	83	81
27	52	58	83	79	78	75	80	83	80	80	81	83	79
28	51	58	82	85	80	82	83	84	78	77	80	81	78
29	54	62	82	83	81	80	79	82	79	77	80	79	78
30	55	59	84	83	82	78	85	84	80	80	78	79	80
31	55	59	89	85	86	87	85	89					
32	57	60	90	89	89	88	89	90					
33	50	61	90	86	86	85	88	90					
34	58	59	83	85	84	84	83	83					
35	55	58	89	90	89	88	88	89					
36	58	60	84	82	83	83	84	84					

Legenda – Animais que morreram = 3 (8,33%), Animais sem elevação do hct = 10 (30,30%), Animais que responderam ao AP20187 = 7 (30,43%), Animais que não responderam ao AP20187 = 16 (69,57%).

O estudo foi realizado com dezessete animais onde sete tiveram drástica redução do hct após administração do AP20187 e dezesseis não responderam ao tratamento (Tabela 6). A análise estatística mostra que a redução do hct dos animais que responderam ao AP20187 começa a ser significativa a partir da semana 8 (Wilcoxon test, $p=0,03$). Os animais ($n=6$) demonstrados no grupo B até a décima semana foram retirados para estudos com o sistema Tet-Off.

18. Detecção do vetor iCasp9 no músculo injetado

A presença da caspase-9 foi detectada através de técnica de PCR. O DNA foi extraído do músculo dos animais sacrificados. O produto obtido foi visto em gel de agarose 1,5% com tampão TAE.

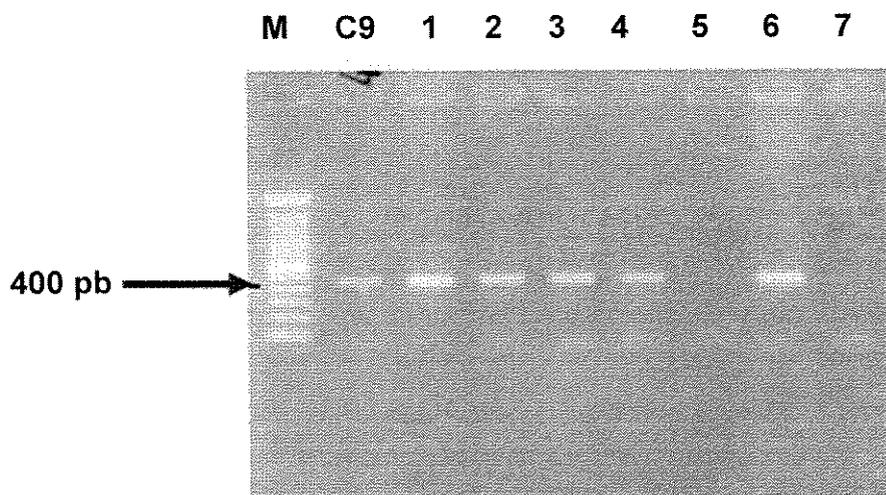


Figura 12: Detecção do vetor iCasp9 no músculo injetado. De 1 a 6 músculo de animais injetados com CID e 7 músculo de animais não injetados. M marcador de peso molecular, ladder 100pb, C9 controle positivo

19. Análise Histológica

O músculo injetado de animais tratados e não tratados com AP20187, foi retirado para realização da reação de TUNEL. Esta técnica nos permite ver a apoptose que ocorreu no tecido.

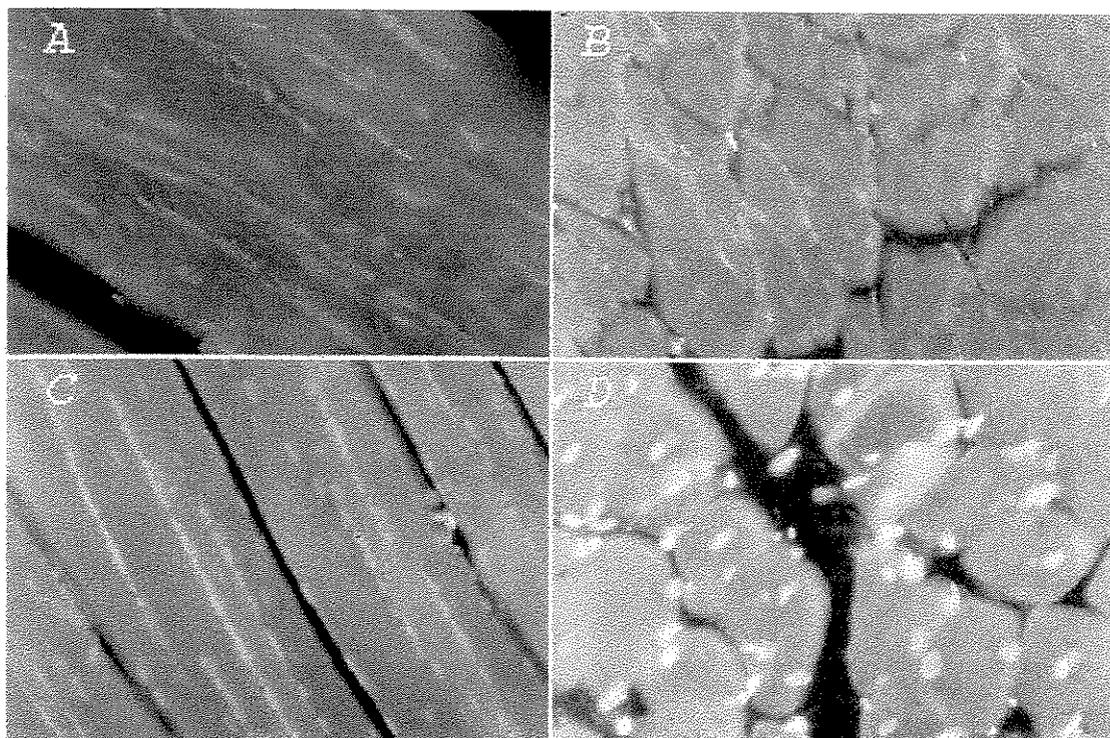


Figura 13: A e C mostram reação negativa de TUNEL, devido a integridade nas células, em animais não tratados com AP20187. B e D mostram reação positiva em animais tratados com AP20187, onde vemos fragmentação celular detectada pela incorporação de iodeto de propídeo no DNA fragmentado, com consequente emissão de fluorescência.

20. Administração de Tetraciclina/Doxociclina aos camundongos

Foi administrada doxociclina (200µg/ml) via oral aos animais (Tabela 7) com hematócrito acima de 65%, durante as semanas 4 e 5. Uma única dose foi suficiente para controlar a expressão do gene durante aproximadamente 4 semanas, mostrando assim a eficiência do sistema. Os animais apresentavam mediana de 89% na 4ª semana. Após a administração da doxociclina, na semana 7 estes apresentavam mediana de 52,5% (Wilcoxon test, $p=0,03$).

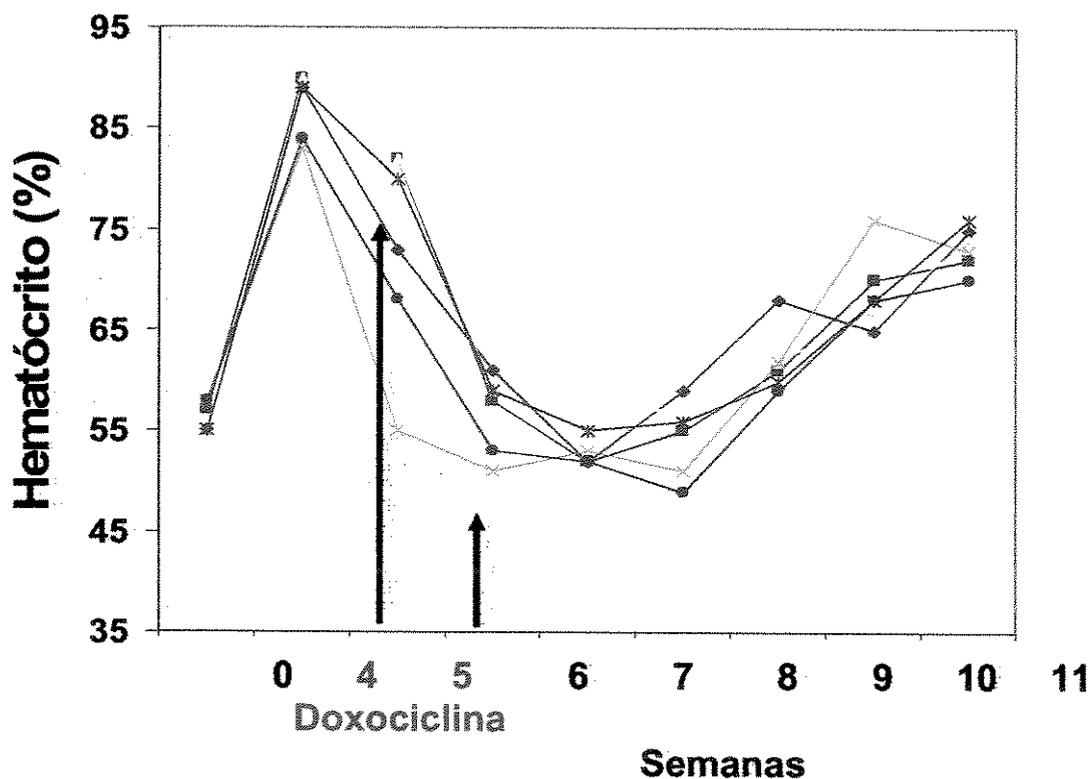
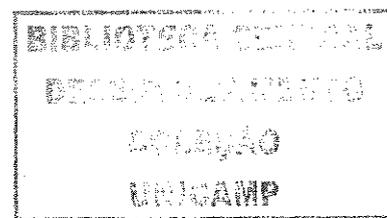


Gráfico 5: Sistema Tet-Off no controle da expressão do gene da eritropoetina. A doxociclina foi administrada nas semanas 4 e 5.

Tabela 7: Hct (%) dos animais que receberam doxociclina (semanas 4 e 5) oralmente, antes e após a administração do sistema Tet-Off/EPO

N	Basal	4ª Sem	5ª Sem	6ª Sem	7ª Sem	8ª Sem	9ª Sem	10ª Sem	11ª Sem
1	55	89	73	61	52	59	68	65	75
2	57	90	82	58	52	55	61	70	72
3	50	90	82	59	55	58	62	67	74
4	58	83	55	51	53	51	62	76	73
5	55	89	80	59	55	56	60	68	76
6	58	84	68	53	52	49	59	68	70



DISCUSSÃO

A terapia gênica oferece a perspectiva de tratamento de várias doenças incuráveis pelos métodos terapêuticos convencionais, contudo ainda existem muitas limitações com relação à eficiência, segurança e controle dos vetores de transferência atualmente conhecidos.

Terapia gênica utilizando o gene da eritropoetina (EPO) teria papel na melhora da anemia de pacientes com insuficiência renal crônica, anemias induzidas pelo câncer e AIDS, e mais recentemente nas displasias de medula óssea e hemoglobinopatias. Em pacientes com beta-talassemia ou anemia falciforme, a eritropoetina recombinante em altas doses aumenta a hemoglobina circulante e os níveis de hemoglobina fetal. Em vista desses resultados, vários autores vêm estudando a liberação de altas doses de eritropoetina por terapia gênica para camundongos talassêmicos, com resultados animadores. O uso da eritropoetina na terapia gênica apresenta aspecto facilitador devido a este ser um hormônio, normalmente secretado pelos rins, atingindo rapidamente a corrente circulatória.

Portanto, qualquer célula do organismo que expresse esta proteína e secrete-a para a circulação, poderá servir de veículo para a introdução do gene modificado. Aparentemente, uma pequena expressão do gene é suficiente para elevar substancialmente o hematócrito de animais anêmicos. De fato, observa-se que as construções gênicas contendo vetores, virais e não virais, introduzidas no músculo destes animais, levam à reversão do fenótipo talassêmico. Entretanto, com frequência ocorre um aumento exagerado na elevação do hematócrito, causando trombozes, sendo necessário uma melhor regulação da secreção da eritropoetina.

Devido aos efeitos ocasionados pela transferência do gene da EPO, o que inviabiliza sua utilização em humanos, no presente estudo testamos a utilização de sistemas possivelmente capazes de controlar a expressão da eritropoetina.

O uso de indutores químicos de dimerização (CID's), no controle de interações entre proteínas, ainda não está bem estabelecido, e têm sido testado para expressar proteínas alvo ligadas a domínios de ativação. Desde o estudo inicial com FK1012, um dímero semi-sintético de FK506, os CID's vêm sendo usados na indução de inúmeras proteínas que são naturalmente ativadas por oligomerização.

Em 2001, Daniel et al induziram *in vitro* a morte de células T, via Fas, após administração de AP1903. Experimento semelhante foi realizado em 2004, porém em um modelo primata não humano, no qual se observou pequena resposta imune ao transgene (Berger et al, 2004).

No mesmo ano, Cotugno et al, conseguiram a regulação do receptor de insulina através de construção gênica em vetor viral, imitando a ação do hormônio, transfectando células Ba/F3, onde se obteve a indução da atividade na síntese de glicogênio e proliferação celular após administração de AP20187 (Cotugno et al, 2004). A indução da dimerização também pode ser usada no controle da expressão gênica, através da ligação da droga a domínios de ligação do DNA e domínios de ativação de fatores de transcrição. Assim, o uso de dimerizadores ativaria o fator de transcrição, iniciando a expressão do gene de interesse com um promotor apropriado. Em conclusão, este método tem poderoso potencial terapêutico e vem sendo testado especialmente para a indução da expressão gênica.

Então por que não usá-lo para destruir uma célula através da ativação de vias de apoptose e controlar a expressão gênica desregulada? Foi neste sentido que este projeto foi desenhado.

A utilização de caspases efetoras, como a caspase-3, seria mais eficiente para levar à morte celular porém, estudos iniciais realizados em nosso laboratório utilizando o sistema FKBP/Caspase-3, mostraram que este não possui boa resposta ao CID e deste modo optou-se por utilizar o gene da caspase-9 .

A ativação da caspase-9 através do AP20187 na terapia gênica foi inicialmente testada em 2001 *in vitro* , constatando-se que o sistema, quando regulado por promotor apropriado , era capaz de induzir a apoptose de células de câncer de próstata ou vasos sanguíneos (Xie et al, 2001, Nor et al, 2002, Song et al, 2005). Nestes trabalhos foram utilizados como vetores, plasmídeos e adenovirus .

A caspase-9 faz parte da classe de caspases executoras e possui peso molecular de 46kD. Consiste de três domínios: um pró-domínio amino terminal pesando 16kD, e duas subunidades, maior (20kD) e menor (10kD), que são comuns à família das caspases e torna-se ativa depois da associação com Apaf-1. A seqüência amino

terminal da caspase-9 e Apaf-1 contêm o domínio de recrutamento da caspase (CARD) o qual é indispensável para sua interação. Depois desta associação, a caspase-9 está pronta para ser ativada e processar sua atividade (Kuida, 2000, Johnson e Jarvis, 2004).

Nossos experimentos *in vitro* mostraram a eficiência do AP20187 na ativação da caspase-9 em células murinas, pois 90% das células entraram em apoptose após tratamento com a droga. Entretanto, nos ensaios *in vivo*, observou-se que apenas 30,43% dos animais, que obtiveram aumento nos níveis de EPO e receberam o CID, responderam à droga, mostrando assim uma resposta heterogênea do sistema.

Observamos que a purificação e dosagem correta dos vetores é fator limitante na expressão e sustentação do efeito da EPO na elevação do hematócrito. Altas concentrações do vetor iCasp9 impedem a expressão da eritropoetina, mas a administração de 5µg de iCasp9 permitiu a expressão da EPO por mais de quinze semanas.

Alguns animais (30,70%) não apresentaram aumento no hematócrito, e apenas 55,50% sustentaram o hematócrito, acima de 65%, por mais de quinze semanas, provavelmente pela utilização, neste estudo, de plasmídeos como vetor de expressão que, como descrito na literatura, possuem menor taxa de transfecção, apesar de ocasionarem menor resposta imunológica do que vetores virais.

O fato de plasmídeos apresentarem menor taxa de transfectantes pode ser amenizado através da injeção intramuscular seguida de eletroporação. Apesar do músculo esquelético não apresentar características de um tecido endócrino, na maioria das vezes leva o produto de interesse para circulação sistêmica (Goldspink, 2003)

É comum o uso de vetores virais para expressão da EPO, porém estudos recentes realizados em 2004, por Chenauaud et al e Gao et al, mostraram que a administração em macacos do cDNA da eritropoetina, através de adenovírus associado, acarretou em uma profunda anemia correlacionada, aparentemente, com a produção de anticorpos endógenos anti-Epo. Os animais não apresentaram hemólise ou hemorragia, mas análises clínicas mostraram total ausência de reticulócitos no sangue periférico.

Entretanto, recentemente em fevereiro de 2005, Rivera et al demonstraram o controle da expressão do gene da eritropoetina, por até seis anos. Foram realizadas quatro construções gênicas, complexas, utilizando como vetor adenovírus associado (AAV) ligado a domínios de ativação, promotores de Citomegalovírus (CMV) e três moléculas de FKBP. A expressão foi condicionada a administração de rapamicina ou análogos como AP22594, AP22660, AP21370 e AP23054, através de injeção intravenosa ou via oral do AP22594. A longo prazo, a indução foi observada em treze primatas, onde não foi observada resposta imune ou efeitos adversos. Vale lembrar, que os vetores foram purificados por cloreto de cério ou coluna de cromatografia e também por outro processo de purificação, com colunas de sefarose, livrando os adenovírus de endotoxinas, processo este não descrito por Chenuaud ou por Gao, o que poderia ser a chave, além da complexidade do novo sistema, do não desencadeamento de resposta imune.

Além do risco de resposta imunogênica, ainda existe a possibilidade da integração de seqüências virais ao genoma. Até recentemente acreditava-se que plasmídeos estavam livres deste efeito porém, estudos atuais mostraram que a utilização de plasmídeos ainda não é totalmente segura. Em 2004, Wang et al, demonstraram que a injeção, *in vivo*, de plasmídeo contendo o gene da eritropoetina murina, seguida de eletroporação, além de aumentar consideravelmente os níveis do hormônio no soro, o vetor se associou ao DNA genômico. Foi realizada uma nova metodologia para confirmar a integração de regiões repetidas, denominado RAIC. Através deste foram identificados quatros eventos de integração independentes, três dos quais confirmados encontrando-se seqüências repetidas do plasmídeo no genoma (Wang et al, 2004)

O sistema Tet-Off tem sido usado na regulação da invasão e proliferação de células em câncer de mama (Belguise et al, 2004); na regulação da expressão do promotor pdx-1, utilizando células embrionárias em processo de diferenciação; promovendo a expressão de insulina, somatostatina, glucoquinase e outras proteínas, *in vitro* (Miyazaki et al, 2004); assim como na indução de Bax/Bcl-x, ativando a cascata da caspase, em linhagem celular de carcinoma humano (Hasenjager et al, 2004).

Em nosso estudo, este sistema mostrou ser eficiente no controle da expressão gênica corroborando dados da literatura (Dalle et al, 2001). Vimos que uma única dose de antibiótico foi suficiente para controlar a expressão gênica em todos os animais. A literatura já descreveu o uso de vetores contendo o gene da EPO murina sob o controle da doxociclina (Tet-On), revertendo o quadro beta-talassêmico com a expansão de BFU-E (unidades formadoras de burst eritróide) e aumentando a síntese de hemoglobina (Samakoglu et al, 2002).

Concluimos que o sistema Tet-Off foi eficiente e tem boas chances de reprodutibilidade devido aos resultados homogêneos obtidos. Bons resultados também têm sido obtidos em animais de grande porte (Sommer B, 2002, Tietge UJ, 2003) . O sistema iCasp9, embora eficiente, mostra falhas de resposta que podem ser atribuídas a diferenças na captura de ambos os vetores pelo músculo esquelético, má resposta à droga pelo animal tratado ou ineficiência do sistema do plasmídeo para transferência gênica. É possível que esta ineficiência venha sendo notada por outros autores, pois nos últimos 2 anos as publicações com o sistema icasp9 mostram utilização de adenovirus associado (AAV) (Straathof KC, 2005) ou adenovirus (Xie X, 2001). ao invés de plasmídeos.

Com relação à droga utilizada, AP20187, outros compostos mais eficientes vêm sendo desenvolvidos (Rivera et al, 2005).

Finalmente, é de grande importância a investigação de métodos de transferência gênica e sistemas de controle da expressão de genes alvo que viabilizem o uso seguro da terapia gênica na prática clínica.

CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos, concluímos que:

- 1 . O sistema FKBP – iCasp9 pode ser utilizado em modelos de células murinas, com eficiência da indução da apoptose pelo AP20187 .
2. O sistema FKBP – iCasp9 pode ser utilizado com o sistema TetOff/EPO , permitindo a expressão eficiente da eritropoetina e seu controle pela doxociclina
3. O sistema FKBP – iCasp9 é eficiente para suprimir a expressão de genes alvo e pode ser utilizado como medida de segurança para terapia gênica , mas mostra resposta heterogênea
4. O sistema Tet-Off é eficiente em controlar a expressão da eritropoetina e induz resposta homogênea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSLAN M, EVRENSEL T, KURT E, DEMIRAY M, GONULLU G, KANAT O, MANAVOGLU. Comparison of clinical outcomes of different erythropoietin usage strategies. *Tumori*. 2004;90:394-398.
- ATAKA K, MARUYAMA H, NEICHI T, MIYAZAKI J, GEJYO F. Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am J Nephrol*. 2003; 23:315-323.
- BELGUISE K, KERSUAL N, GALTIER F, CHALBOS D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene*. 2004; 20: *in press*
- BERGER C, BLAU CA, HUANG ML, IULIUCCI JD, DALGARNO DC, GASCHET J, HEIMFELD S, CLACKSON T, RIDDELL SR. Pharmacologically regulated Fas-mediated death of adoptively transferred T cells in a nonhuman primate model. *Blood*. 2004;103:1261-1269.
- BINLEY K, ASKHAM Z, IQBALL S, SPEARMAN H, MARTIN L, DE ALWIS M, THRASHER AJ, ALI RR, MAXWELL PH, KINGSMAN S, NAYLOR S. Long-term reversal of chronic anemia using a hypoxia-regulated erythropoietin gene therapy. *Blood*. 2002; 100:2406-2413.
- BLAU CA, PETERSON KR, DRACHMAN JG, SPENCER DM. A proliferation switch for genetically modified cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:3076-3081.
- BOHL D, HEARD JM. Delivering erythropoietin through genetically engineered cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11 Suppl 16:S159-62.

- BOHL D, NAFFAKH N, HEARD JM. Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med* 1997; 3:299-305.
- BROWN BD, LILLICRAP D. Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy. *Blood*. 2002; 100:1133-1140.
- CAZZOLA M, MERCURIALI F, BRUGNARA C. Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia. *Blood*. 1997; 89:4248-4267.
- CHENUAUD P, LARCHER T, RABINOWITZ JE, PROVOST N, CHEREL Y, CASADEVALL N, SAMULSKI RJ, MOULLIER P. Autoimmune anemia in macaques following erythropoietin gene therapy. *Blood*. 2004; 103:3303-4.
- CLARKE H, PALLISTER CJ The impact of anaemia on outcome in cancer *Clin Lab Haematol*. 2005; 27:1-13.
- COTUGNO G, POLLOCK R, FORMISANO P, LINHER K, BEGUINOT F, AURICCHIO A. Pharmacological regulation of the insulin receptor signaling pathway mimics insulin action in cells transduced with viral vectors *Hum Gene Ther*. 2004 ; 15:1101-1108.
- DALLE B, PAYEN E, BEUZARD Y. Modulation of transduced erythropoietin expression by iron. *Exp Hematol* 2000; 28:760-764.
- DALLE B, PAYEN E, REGULIER E, DEGLON N, ROUYER-FESSARD P, BEUZARD Y, AEBISCHER P. Improvement of mouse beta-thalassemia upon erythropoietin delivery by encapsulated myoblasts *Gene Ther* 1999; 6:157-161.
- DANIEL C. THOMIS, SARAH MARKTEL, CHIARA BONINI, CATIA TRAVERSARI, MICHAEL GILMAN, CLAUDIO BORDIGNON, AND TIM CLACKSON A Fas-based

- suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease *Blood*, 1 March 2001; 97:1249-1257
- ESCHBACH JW, EGRIE JC, DOWNING MR, BROWNE JK, ADAMSON JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med*. 1987; 316:73-78.
- ESCHBACH JW, KELLY MR, HALEY NR, ABELS RI, ADAMSON JW. Treatment of the anemia of progressive renal failure with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med*. 1989; 321:158-163.
- ESCHBACH JW. Erythropoietin: the promise and the facts. *Kidney Int Suppl*. 1994; 44:70-76.
- FREIBERG RA, SPENCER DM, CHOATE KA, PENG PD, SCHREIBER SL, CRABTREE GR, KHAVARI PA. Specific triggering of the Fas signal transduction pathway in normal human keratinocytes *J Biol Chem*. 1996; 271:31666-31669.
- GOLDSPINK G. Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003; 17:211-222.
- GOSSEN M, BUJARD H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:5547-5551.
- GOSSEN M, FREUNDLIEB S, BENDER G, MULLER G, HILLEN W, BUJARD H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. 1995; 268:1766-1769.

- GUANGPING GAO, CORINNA LEBHERZ, DANIEL J. WEINER, REBECCA GRANT, ROBERTO CALCEDO, BETH MCCULLOUGH, ADAM BAGG, YI ZHANG, AND JAMES M. WILSON Erythropoietin gene therapy leads to autoimmune anemia in macaques Blood. 2004; 103:3300-3302.
- HAMAMORI Y, SAMAL B, TIAN J, KEDES L. Myoblast transfer of human erythropoietin gene in a mouse model of renal failure. J Clin Invest 1995; 95:1808-1813.
- HASENJAGER A, GILLISSEN B, MULLER A, NORMAND G, HEMMATI PG, SCHULER M, DORKEN B, DANIEL PT. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-x(L) in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells. Oncogene. 2004; 23:4523-4535.
- HOFMANN WK, KOEFFLER HP Myelodysplastic syndrome Annu Rev Med. 2005 ; 56:1-16.
- JOHNSON CR, JARVIS WD. Caspase-9 regulation: an update. Apoptosis. 2004 ; 9:423-427.
- KESSLER PD, PODSAKOFF GM, CHEN X, MCQUISTON SA, COLOSI PC, MATELIS LA, KURTZMAN GJ, BYRNE BJ. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:14082-14087.
- KRANTZ SB. - Erythropoietin. Blood. 1991 Feb 1;77(3):419-34 2004; 18:1176-1199.
- KUIDA K. Caspase-9. Int J Biochem Cell Biol. 2000; 32:121-124.
- LI ZY, OTTO K, RICHARD RE, NI S, KIRILLOVA I, FAUSTO N, BLAU CA, LIEBER A. Dimerizer-induced proliferation of genetically modified hepatocytes Mol Ther. 2002 ; 5:420-426.

LIU Y, LUDES-MEYERS J, ZHANG Y, MUNOZ-MEDELLIN D, KIM HT, LU C, GE G, SCHIFF R, HILSENBECK SG, OSBORNE CK, BROWN PH. Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene*. 2002; 21:7680-7689.

MACCORKLE RA, FREEMAN KW, SPENCER DM. Synthetic activation of caspases: artificial death switches *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:3655-3660.

MIYAZAKI S, YAMATO E, MIYAZAKI J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells *Diabetes*. 2004 ; 53:1030-1037.

NEFF T, HORN PA, VALLI VE, GOWN AM, WARDWELL S, WOOD BL, VON KALLE C, SCHMIDT M, PETERSON LJ, MORRIS JC, RICHARD RE, CLACKSON T, KIEM HP, BLAU CA. Pharmacologically regulated in vivo selection in a large animal. *Blood*. 2002; 100:2026-2031.

NOR JE, HU Y, SONG W, SPENCER DM, NUNEZ G. Ablation of microvessels in vivo upon dimerization of iCaspase-9. *Gene Ther*. 2002; 9:444-451.

ODA A, SAWADA K, DRUKER BJ, OZAKI K, TAKANO H, KOIZUMI K, FUKADA Y, HANDA M, KOIKE T, IKEDA Y. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of Jak2, STAT5A, and STAT5B in primary cultured human erythroid precursors. *Blood*. 1998 Jul; 92:443-451.

OLIVIERI NF, FREEDMAN MH, PERRINE SP, DOVER GJ, SHERIDAN B, ESSENTINE DL, NAGEL RL. Trial of recombinant human erythropoietin: three patients with thalassemia intermedia. *Blood*. 1992; 80:3258-3260.

- OSBORNE WR, RAMESH N, LAU S, CLOWES MM, DALE DC, CLOWES AW.
Gene therapy for long-term expression of erythropoietin in rats. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:8055-8058.
- PAYEN E, BETTAN M, HENRI A, TOMKIEWITCZ E, HOUQUE A, KUZNIAK I, ZUBER J, SCHERMAN D, BEUZARD Y. – Oxygen tension and a pharmacological switch in the regulation of transgene expression for gene therapy – J Gene Med 2001; 3: 498-504.
- POLLOCK R, CLACKSON T. Dimerizer-regulated gene expression . Curr Opin Biotechnol. 2002;13:459-467.
- RICHARD RE, BLAU CA. Small-molecule-directed mpl signaling can complement growth factors to selectively expand genetically modified cord blood cells. Stem Cells. 2003; 21:71-78.
- RIEDL SJ, SHI Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5:897-907.
- RINSCH C, REGULIER E, DEGLON N, DALLE B, BEUZARD Y, AEBISCHER P.A Gene therapy approach to regulated delivery of erythropoietin as a function of oxygen tension. Hum Gene Ther. 1997; 8:1840-1841.
- RIVERA VM. Controlling gene expression using synthetic ligands. Methods. 1998 ; 14:421-429.
- RIVERA VM, GAO GP, GRANT RL, SCHNELL MA, ZOLTICK PW, ROZAMUS LW, CLACKSON T, WILSON JM. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. Blood. 2005; 105:1424-1430.

SALVESEN GS, DIXIT VM Caspases: intracellular signaling by proteolysis Cell. 1997 ; 91:443-446.

SAMAKOGLU S, BOHL D, HEARD JM Mechanisms leading to sustained reversion of beta-thalassemia in mice by doxycycline-controlled Epo delivery from muscles. Mol Ther. 2002; 6:793-803.

SCHREIBER SL, CRABTREE GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506 Immunol Today. 1992; 13:136-142.

SERGUERA C, BOHL D, ROLLAND E, PREVOST P, HEARD JM. Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells. Hum Gene Ther 1999; 10:375-383.

SETOGUCHI Y, DANIEL C, CRYSTAL RG Stimulation of erythropoiesis by in vivo gene therapy: physiologic consequences of transfer of the human erythropoietin gene to experimental animals using an adenovirus vector. Blood 1994; 84:2946-2953.

SONG W, SUN Q, DONG Z, SPENCER DM, NUNEZ G, NOR JE. Antiangiogenic gene therapy: disruption of neovascular networks mediated by inducible caspase-9 delivered with a transcriptionally targeted adenoviral vector. Gene Ther. 2005; 12:320-329.

SPENCER DM, BELSHAW PJ, CHEN L, HO SN, RANDAZZO F, CRABTREE GR, SCHREIBER SL. Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. Curr Biol. 1996; 6:839-847.

SPENCER DM, WANDLESS TJ, SCHREIBER SL, CRABTREE GR. Controlling signal transduction with synthetic ligands. Science. 1993; 262:1019-1024.

STEINERT M, WOBUS M, BOLTZE C, SCHUTZ A, WAHLBUHL M, HAMANN J, AUST G. Expression and regulation of CD97 in colorectal carcinoma cell lines and tumor tissues. *Am J Pathol.* 2002; 161:1657-1667.

STRAATHOF KC, PULE MA, YOTNDA P, DOTTI G, VANIN EF, BRENNER MK, HESLOP HE, SPENCER DM, ROONEY CM. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood.* 2005 Feb 22; *in press*

TARNG D.-C.; HUANG T.-P.; TZEN WEN CHEN; YANG W.-C. Erythropoietin hyporesponsiveness: From iron deficiency to iron overload *Kidney Int Suppl.* 1999 ; 69:107-118.

TESTA U – Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis *Leukemia.* 2004; 18:1176-1199.

TIETGE UJ, KOZARSKY KF, DONAHEE MH, RADER DJ - A tetracycline-regulated adenoviral expression system for in vivo delivery of transgenes to lung and liver. *J Gene Med.* 2003; 5:567-575.

TILBROOK PA, KLINKEN SP. The erythropoietin receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31:1001-1005.

VILLEVAL, ROUYER-FESSARD P, BLUMENFELD N, HENRI A, VAINCCHENKEER W, BEUZARD Y Retrovirus-mediated transfer of the erythropoietin gene in hematopoietic cells improves the erythrocyte phenotype in murine beta-thalassemia. *Blood* 1994; 84:928—933.

WANG Z, TROILO PJ, WANG X, GRIFFITHS TG, PACCHIONE SJ, BARNUM AB, HARPER LB, PAULEY CJ, NIU Z, DENISOVA L, FOLLMER TT, RIZZUTO G, CILIBERTO G, FATTORI E, MONICA NL, MANAM S, LEDWITH BJ. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 2004; 11:711-721.

XIE X, ZHAO X, LIU Y, ZHANG J, MATUSIK RJ, SLAWIN KM, SPENCER DM. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:6795-6804.

YE X, RIVERA VM, ZOLTICK P, CERASOLI F JR, SCHNELL MA, GAO G, HUGHES JV, GILMAN M, WILSON JM. Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science* 1999; 283:88-91.