

# O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) como Vetor de Transferência Gênica para Células de Linhagem Hematopoética e Estroma de Medula Óssea Murina

---

**Eduardo Filipe Avila Silva**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul visando a  
obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

*Orientação: Profa. Dra. Nance Beyer Nardi*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular  
Porto Alegre – Fevereiro de 2002

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Profa. Dra. Nance Beyer Nardi. O projeto foi financiado com recursos do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). O autor foi bolsista do CNPq durante o período de execução do projeto.

## AGRADECIMENTOS

À meus pais e irmãos, pelo carinho, amizade, pelo apoio em todos os momentos, e principalmente pelo clima de conforto e felicidade que me proporcionam em casa.

À Profa. Dra. Nance Beyer Nardi, pela confiança na minha capacidade, pela coragem de abraçar este projeto comigo, pelos inúmeros préstimos como orientadora, e por me proporcionar a possibilidade de trabalhar em um laboratório excelente, com material humano e instalações de qualidade. Minha gratidão pela oportunidade.

Aos colegas de laboratório, Andrés, Patrícia, Léo, Ale, Cris, Lindolfo, Maísa, Elvira, Dona Dilma, Igor, Aline, Tassi, Pedro, Ivan, Cami, Tábita, Ciça, Carol, Tetê, e aos outros que eu possa ter esquecido, pelos momentos de diversão e alegria, pela acolhida, pelo companheirismo e por todos os agradáveis dias passados no laboratório.

Ao grupo do vírus (Flavinha e Fafá, atividade galera...), pela extrema competência, grande amizade, incentivo, e toda a colaboração sem a qual o projeto não terminaria. Vocês proporcionaram uma ajuda inestimável em todos os momentos. Esse trabalho é de vocês. E ao Claudi, pelo apoio, por acreditar no FIV, e por ter sido o colega que dividiu comigo as idéias e resultados encontrados.

Aos meus amigos do Departamento de Genética e aos meus colegas de mestrado, por me receberem muito bem nesse local e fazerem desses dois anos um período extremamente feliz da minha vida.

Ao Elmo e Ellen, pela ajuda sempre constante, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos. Muito obrigado, vocês são pessoas especiais.

Ao pessoal da Drosófila (Schirley, Ana, Negro Fei, Norma), da Mutagênese (Kênia, Maurício, Vivi, Meg e as gurias da iniciação), da Genética Vegetal (Evandro, Jú, Rogéria, Alessandra, Sílvia), da Citogenética Animal (Vanina, Cris, Elise, Gabi, Jú) e os demais que eu esqueci de citar (mas não por isso menos importantes), pela amizade, auxílio técnico e disponibilidade dos equipamentos nos seus laboratórios. Valeu, pessoal!!

Aos professores José Artur Bogo Chies, Marion Schiengold, Heloísa Andrade e Carmen Saavedra, pelas conversas e discussões interessantes, dicas, e pelos inúmeros livros, fitas e CDs emprestados.

À minha família, principalmente minhas tias, pela preocupação constante e pelas inúmeras preces pela saúde dos “bichinhos”.

À Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo e aos colegas do IRFA, por me apresentarem ao encantador universo dos lentivírus e contribuírem na minha formação.

Aos amigos de São Paulo e da Argentina, por me possibilitarem oportunidades de adquirir e expandir os conhecimentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Pablo Gusmão, por ter estado sempre lá.

À Lícia Seibt, pelo apoio, amizade, carinho, compreensão, e por compartilhar comigo todos os momentos. Obrigado por tudo!!!!

À todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse projeto, e mesmo não citados, tenham certeza da minha amizade, gratidão e admiração por todos.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
RESUMO E CONCLUSÕES .....	iv
<i>SUMMARY AND CONCLUSIONS</i> .....	v
INTRODUÇÃO .....	1
OBJETIVOS .....	20
MATERIAL E MÉTODOS .....	21
<i>Cultura de células</i> .....	21
<i>Plasmídeos de expressão viral</i> .....	22
<i>Produção do vetor viral</i> .....	25
<i>Transdução das células alvo</i> .....	26
<i>Estudo da viabilidade celular e toxicidade</i> .....	26
<i>Análises por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência</i> .....	27
<i>Titulação dos estoques virais</i> .....	28
<i>Ensaio de identificação de vírus auxiliares</i> .....	28
<i>Segurança</i> .....	29
RESULTADOS .....	30
<i>Produção do vetor lentiviral</i> .....	30
<i>Transferência gênica de células mediada por vetores virais baseados no FIV</i> .....	34
<i>Transdução de células 293T e expressão da proteína GFP</i> .....	34
<i>Transdução de linhagens hematopoéticas K562 e Daudi</i> .....	36
<i>Transdução de cultura primária de estroma de medula óssea de camundongo</i> .....	43
<i>Ensaio resgate para verificação do surgimento de vírus auxiliares</i> .....	46
DISCUSSÃO .....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: Enzima Adenosina Desaminase

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*acquired immunodeficiency syndrom*)<sup>γ</sup> <sup>e</sup> <sup>z</sup>

BGH p(A): Sinal de Poliadenilação do Hormônio do Crescimento Bovino  
(*bovine growth hormone polyadenilation signal*)

BH: Brometo de Hexadimetrino

CAEV: Vírus da Artrite Encefalite Caprina (*caprine arthritis-encephalitis virus*)

CMV: Citomegalovírus

cPPT: Trato Central Polipurínico (*central polypurine tract*)

CTE: Elemento de Transporte Constitutivo (*constitutive transport element*)

CTS: Seqüência Central de Terminação (*central termination sequence*)

DOU: Diário Oficial da União

EIAV: Vírus da Anemia Infeciosa Equina (*equine infectious anemia virus*)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*)

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina (*feline immunodeficiency virus*)

FSC: *Forward Scatter*

GALV: Vírus da Leucemia de Gibões (*gibbon ape leukemia virus*)

GFP: Proteína de Fluorescência Verde (*green fluorescent protein*)

HBS: Tampão Hepes Salino (*hepes buffer salt*)

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana (*human immunodeficiency virus*)

HSC: Célula Tronco Hematopoética (*hematopoietic stem cell*)

IRES: Sítio Interno de Entrada de Ribossomo (*internal ribosome entry site*)

LTR: Repetições Terminais Longas (*long terminal repeats*)

MAR: Região de Ligação à Matriz (*matrix attachment region*)

MMLV: Vírus da Leucemia Murina de Moloney (*moloney murine leukemia virus*)

MOI: Multiplicidade de Infecção (*multiplicity of infection*)

MPMV: Vírus de Macacos de Mason-Pfizer (*mason-pfizer monkey virus*)

MSC: Célula Tronco Mesenquimal (*mesenchymal stem cell*)

MSCV: Vírus de Células Tronco Murina (*murine stem cell virus*)

MVV: Vírus Maedi Visna (*maedi visna virus*)

ORF: Fase Aberta de Leitura (*open reading frame*)

PB: Tampão Fosfato Salino (*phosphate buffer salt*)

PBS: Sítio de Ligação do *Primer* (*primer binding site*)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*polymerase chain reaction*)

PI: Iodeto de Propídeo (*propidium iodide*)

RCR: Recombinantes Virais Replicação Competentes (*replication competent recombinant*)

RRE: Elemento de Resposta ao Rev (*Rev response element*)

SCID: Imunodeficiência Severa Combinada (*severe combined immunodeficiency*)

SIV: Vírus da Imunodeficiência de Símios (*simian immunodeficiency virus*)

SSC: *Side Scatter*

UI: Unidades Infecciosas

VSV: Vírus da Estomatite Vesicular (*Vesicular Stomatitis Virus*)

VSV-G: Glicoproteína G de envelope do Vírus da Estomatite Vesicular

WPRE: Elemento Regulatório Póstranscricional do Vírus da Hepatite de Marmotas  
(*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*)

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema do Ciclo Infeccioso Lentiviral .....	4
FIGURA 2 – Esquema da Organização Genômica do FIV .....	11
FIGURA 3 – Esquema da Produção de Vetores e Transferência Gênica .....	14
FIGURA 4 – Esquema do Plasmídeo de Empacotamento CF1 $\Delta$ env .....	23
FIGURA 5 – Esquema do Plasmídeo Vetor CTAGCB .....	24
FIGURA 6 – Citometria de Fluxo de Células 293T Controle e Transfectadas .....	31
FIGURA 7 – Microscopia de Células 293T Controle e Transduzidas .....	35
FIGURA 8 – Citometria de Fluxo da Linhagem K562 Normal .....	37
FIGURA 9 – Citometria de Fluxo da Linhagem K562 Transduzida .....	38
FIGURA 10 – Citometria de Fluxo da Linhagem Daudi Normal .....	41
FIGURA 11 – Citometria de Fluxo da Linhagem Daudi Transduzida .....	42
FIGURA 12 – Citometria de Fluxo de Estroma Primário Normal e Transduzido .....	44
FIGURA 13 – Microscopia de Estroma Primário Controle e Transduzido .....	47



## RESUMO E CONCLUSÕES

A família dos retrovírus tem sido usada como uma das mais importantes ferramentas de transferência gênica em estudos de terapia gênica. Recentemente, os lentivírus vêm ganhando crescente popularidade devido ao seu potencial de infectar células quiescentes. A busca de vetores mais seguros tem destacado a importância dos lentivírus de mamíferos não-primatas, sendo que o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) surge como alternativa na construção de vetores com maior eficiência e segurança. Modificações na estrutura molecular do genoma desse vírus possibilitaram a infecção estável de células humanas, bem como ampliação do tropismo celular e estabilidade viral.

Neste trabalho, vetores lentivirais baseados no FIV, codificando o gene repórter *gfp* e pseudotipados com a proteína de envelope VSV-G foram produzidos por cotransfecção transiente de células empacotadoras 293T com os plasmídeos empacotador, vetor e envelope, pelo método de coprecipitação com fosfato de cálcio. A presença de partículas virais infecciosas, bem como o título obtido, foi avaliada com titulação do vetor em células não transfectadas da linhagem 293T, com obtenção de títulos superiores a  $10^4$  UI/mL. Os vetores foram capazes de transduzir células das linhagens hematopoéticas humanas K562 e Daudi, além de culturas primárias de estroma de medula óssea murina, com eficiência bastante elevada. Os níveis de expressão do transgene obtidos foram reduzidos, ocasionando um aumento de duas vezes na fluorescência basal dos diferentes tipos celulares. A transferência gênica foi estável, com expressão da GFP durante todo o período de manutenção das culturas transduzidas. A viabilidade das células expostas ao vetor foi medida com ensaio do iodeto de propídeo, indicando uma pequena toxicidade associada ao procedimento em algumas linhagens celulares. Não foi possível a detecção de formação de recombinantes virais capazes de replicação independente pelo ensaio de resgate utilizado. Os resultados sugerem que o FIV pode ser utilizado como vetor de transferência gênica para células humanas, embora certas modificações nos elementos presentes nas construções plasmidiais sejam necessárias para melhoria das características de segurança, eficiência e níveis de expressão obtidos.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

Members of the retrovirus family have been employed as one of the most important tools for gene transfer in gene therapy studies. More recently, lentiviruses are gaining popularity for their potential to infect quiescent cells. The search for safer gene vectors has emphasized the importance of lentiviruses from non-primate mammals, and the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is being explored for the construction of more efficient, safer vectors. Modifications in its genomic molecular structure have allowed the stable infection of human cells, as well as an increase on cell tropism and viral stability.

In this work, lentiviral vectors based on FIV, coding for the reporter gene *gfp* and pseudotyped with the envelope protein VSV-G, were produced by transient cotransfection of the packaging cell line 293T with the packing, vector and envelope plasmids, using the calcium phosphate coprecipitation method. The presence of infectious viral particles, as well as the titre, were analyzed by titration of the vector on non-transfected 293T cells, with the obtention of titres higher than  $10^4$  UI/mL. The vectors were capable to transduce cells from the human hematopoietic lines K562 and Daudi, besides primary cultures of murine bone marrow stroma, with high efficiency. The levels of expression of the transgene were relatively low, with a two-fold increase on the background fluorescence level of the different cell types studied. Gene transfer was stable, and GFP was expressed through all the period of maintenance of the transduced cultures. The viability of the cells exposed to the vector, analyzed with the propidium iodide assay, indicated some toxicity associated to the procedure in some of the cells. The rescue assay employed was not able to detect the formation of viral recombinants capable of independent replication. The results suggest that FIV can be used as a vector for cell transfer to human cells, although some modification on the elements present in the plasmidial constructs is necessary in order to increase the safety, efficiency and level of expression of the transgene.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a terapia gênica tem ganhado espaço no meio médico e científico como uma abordagem com excelentes perspectivas no desenvolvimento de novos tratamentos e profilaxias para diversos tipos de patologias. Esse ramo da ciência, apesar de relativamente novo, apresenta grande capacidade de expansão e perspectiva de crescimento em importância num futuro próximo. A terapia gênica é um procedimento baseado na transferência de material genético (na forma de DNA, RNA ou mesmo oligonucleotídeos) para células-alvo, objetivando o tratamento ou prevenção de doenças. Este processo visa a correção de síndromes genéticas monogênicas, combate a organismos infecciosos como vírus, fungos e bactérias, ou ainda tratamento de patologias adquiridas ou com predisposição genética, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer. Com estes conceitos, acredita-se que a adição de fatores genéticos possa suprir as deficiências advindas de mutações que gerem proteínas não funcionais ou mesmo ausência de expressão gênica, bem como seja capaz de regular ou mesmo inibir a expressão de genes deletérios importantes no desenvolvimento de tumores ou na patogenicidade de organismos infecciosos (Verma, 1990; Friedmann, 1997).

Apesar do grande desenvolvimento da terapia gênica nos últimos anos, poucos resultados práticos no estabelecimento de novos métodos terapêuticos têm sido obtidos. O primeiro protocolo clínico utilizando essa abordagem foi iniciado em setembro de 1990, por R.M. Blaese e cols. (1990), no *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda, MD, EUA). Esse estudo foi realizado visando a correção da deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA), síndrome genética rara que causa um comprometimento severo do sistema imune em crianças conhecido como SCID (Imunodeficiência Severa Combinada). Linfócitos T periféricos de dois pacientes foram retirados e modificados *ex vivo* através de um vetor retroviral baseado no Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MMLV) carreando o gene da ADA e reimplantados por reinfusão autóloga. A essas crianças foi administrada, simultaneamente, a enzima ADA bovina purificada conjugada com polietilenoglicol (PEG-ADA). Apesar dos resultados terem sido animadores, não foram obtidas evidências conclusivas quanto à contribuição específica da transferência gênica independentemente do tratamento alternativo (Blaese e cols., 1995; Bordignon e cols., 1995). Entretanto, no ano de 2000, foi noticiado o primeiro caso clínico de correção total de uma síndrome genética, utilizando a terapia gênica como instrumento. Cavazzana-Calvo e cols. (2000) relataram a completa reversão da Síndrome da Imunodeficiência

Combinada Severa (SCID) ligada ao X em dois pacientes, através da introdução de um gene  $\gamma c$  (que codifica o receptor de citocinas  $\gamma c$ , envolvido em processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência de progenitores linfóides) funcional, defeituoso nos indivíduos portadores dessa patologia. O tratamento foi realizado de forma semelhante ao caso anteriormente relatado, com correção *ex vivo* de células precursoras hematopoéticas CD34<sup>+</sup> através de um vetor retroviral codificante de uma forma funcional do gene defeituoso. Este relato levou a um novo incentivo na pesquisa em terapia gênica, e muitas abordagens para diversas doenças monogênicas e infecciosas, bem como voltadas para o combate de diversas formas de câncer, vêm sendo testadas (Romano e cols., 2000). Em dezembro de 2001, o órgão oficial que regulamenta e autoriza a aplicação de ensaios de terapia gênica nos Estados Unidos, denominado RAC (*Recombinant DNA Advisory Committee*, pertencente ao *Office of Biotechnology Activities*, do *National Institutes of Health*, EUA), registrava 472 protocolos clínicos utilizando técnicas de transferência gênica em execução nesse país (OBA, 2001). Dados de setembro de 2001 (*Journal of Gene Medicine*, 2001) indicam a realização de 596 estudos no mundo todo, com o total de 3464 pacientes. A maior parte desses tratamentos visa o combate a tumores (63,1 %), doenças monogênicas (12,6%) e doenças infecciosas, principalmente a AIDS (6,4%). Um número grande de procedimentos encontra-se ainda em fases iniciais de estudo (protocolos em fase I constituem 66,3% do total), enquanto uma pequena quantidade (0,7%) encontra-se em fase III de aplicação, mostrando que muitos experimentos vêm sendo testados, mas poucos têm resultado em benefício clínico efetivo.

Vários fatores são determinantes na dificuldade de aplicação de procedimentos de terapia gênica em escala clínica. O principal dentre eles é a dificuldade de obtenção de vetores com características de segurança, eficiência e especificidade adequadas para aplicação em humanos (Verma e Somia, 1997). Vetores são todos os sistemas que funcionam como transportadores de material genético para as células-alvo. Entre os maiores problemas enfrentados na construção, desenvolvimento e aplicação de vetores podemos citar a diminuição ou perda da expressão do transgene (também conhecido como silenciamento), o desenvolvimento de reações imunológicas contra o vetor ou ativação de resposta imunológica dirigida aos produtos de expressão gênica, a baixa eficiência de transformação obtida com certos sistemas de transferência gênica e a falta de especificidade para célula-alvo *in vivo* (Naldini, 1998b; Robbins e cols., 1998; Romano e cols., 1999). Muitos dos sistemas hoje disponíveis encontram uma aplicação limitada, e a escolha do vetor mais adequado em procedimentos terapêuticos deve sempre obedecer a

critérios a serem considerados de acordo com a natureza da doença, célula ou tecido-alvo a serem tratados, bem como eficiência, duração da expressão do transgene necessária e via de administração (Dani, 1999; Peng, 1999).

Os métodos de transferência gênica atualmente em uso podem ser divididos em três categorias: químicos, físicos e biológicos. Entre os químicos, podemos destacar a transfecção por fosfato de cálcio (importante na geração de vetores lentivirais por transfecção transiente) (Sambrook e cols., 1989) e transfecção com compostos catiônicos (complexos lipídicos, protéicos, poliméricos ou mistos) (Frézard, 1999; Ropert, 1999; Brown e cols., 2001; Hashida e cols., 2001; Khaw e cols., 2001; Oku e cols., 2001; Pastorino e cols., 2001; Safinya, 2001; Sato e cols., 2001; Tachibana e cols., 2001; Varga e cols., 2001). Biobalística ou *gene gun*, eletroporação, microinjeção e injeção direta são os métodos físicos mais comuns (Ledley e Ledley, 1998; Pouton e Seymour, 1998; Lin e cols., 2000; Somiari e cols., 2000; Hecker e cols., 2001; Oh e cols., 2001; Spack e Sorgi, 2001). Existem ainda os métodos biológicos de transferência gênica, que atualmente são os de uso mais difundidos e utilizados em diferentes estudos. Entre esses métodos, o mais empregado nos diversos protocolos clínicos e testes em andamento envolve transferência mediada por vetores virais. Várias famílias virais têm sido modificadas por técnicas de biologia molecular, visando a substituição de genes relacionados à patogenicidade e de genes envolvidos na capacidade replicativa desses vírus por genes exógenos, geralmente de interesse terapêutico ou cujo produto protéico possua atividade repórter. Assim, os vírus recombinantes podem ser examinados quanto à sua capacidade de atuação como vetor de transferência gênica, bem como segurança quanto à atividade patogênica. Entre os vírus estudados, podemos relacionar alguns como retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado, vaccinia, herpesvírus, espumavírus (um tipo de retrovírus), alfavírus, influenza, baculovírus, políoma, poxvírus e bacteriófagos. Desses, os mais utilizadas na pesquisa e na clínica são os retrovírus (principalmente lentivírus e oncovírus), parvovírus (representados pelos vírus adeno-associados), herpesvírus (cuja importância reside no alto tropismo natural por células nervosas) e os adenovírus (Kaplitt e Pfaff, 1996; Reynolds e cols., 1999; Danthinne e Imperiale, 2000; Hewson, 2000; Romano e cols., 2000; Strayer e cols., 2000; Ehrenguber e cols., 2001).

Os retrovírus têm despertado um grande interesse como vetores para transferência gênica, devido principalmente a certas características específicas relacionadas ao ciclo replicativo dos representantes dessa família. Os retrovírus são vírus de RNA, cuja replicação envolve a utilização de um intermediário de DNA, que se integra ao genoma da

célula hospedeira sendo então chamado de próvirus. As partículas virais consistem de duas fitas idênticas de RNA simples, contidas em um capsídeo juntamente com enzimas utilizadas na replicação viral e cercadas por um envelope viral, composto por lípideos oriundos da membrana da célula hospedeira e glicoproteínas codificadas pelo vírus. Características básicas do ciclo replicativo são mostrados na figura 1. A infecção inicia com a entrada do vírion na célula-alvo suscetível, através de interações específicas entre as glicoproteínas de envelope e receptores na superfície da célula-alvo. Fusão e internalização do vírion resultam em liberação do capsídeo no citoplasma, onde enzimas virais contidas no capsídeo medeiam a conversão do RNA viral em DNA, que é transportado ao núcleo e sofre integração sítio-inespecífica ao genoma da célula hospedeira. O próvirus é então replicado durante o ciclo celular normal da célula, e transmitido à descendência dessa, sendo desta forma importante na transmissão regular e permanente de genes exógenos para a célula-alvo. O DNA viral é transcrito (podendo, em certas situações, sofrer *splicing*) e o RNA resultante transportado até o citoplasma, onde pode ser tanto traduzido em proteínas virais como ligar-se a essas dando origem a um novo núcleocapsídeo, que após contato com as glicoproteínas de envelope são liberadas por brotamento, originando uma progênie de novas partícula virais maduras (Buchschacher e Wong-Staal, 2000; Knipe e cols., 2001).

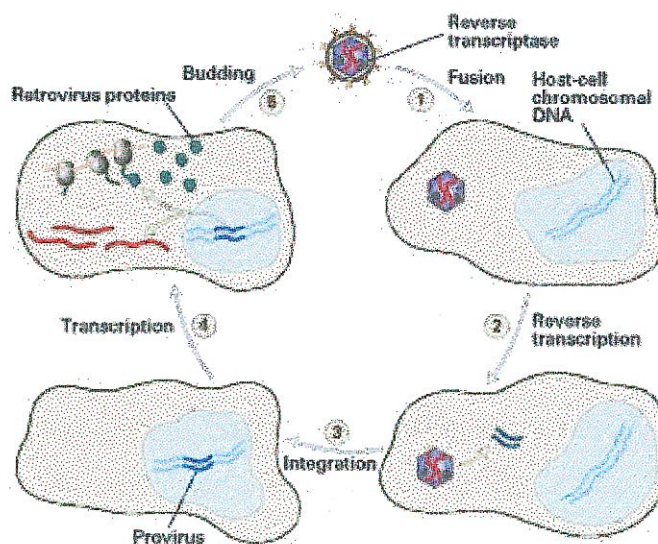


Figura 1. Esquema representando o ciclo infeccioso dos lentivírus (de Lodish e cols., 1999)

Os retrovírus são sistemas de transferência gênica com características peculiares, como expressão estável e contínua devido à integração do genoma viral no cromossomo da célula hospedeira e imunogenicidade e citotoxicidade relativamente baixas quando comparadas com outros vetores virais. Diversos experimentos já demonstraram a manutenção da expressão de genes exógenos por períodos da ordem de vários meses ou mesmo anos (Rivière e cols., 1995; Naldini e cols., 1996a; Cavazzana-Calvo e cols., 2000), tornando esse sistema bastante interessante em casos onde a expressão estável do transgene é desejada, como no tratamento de síndromes monogênicas ou doenças neurodegenerativas. Além disso, grande capacidade de inserção gênica e amplo tropismo celular justificam o interesse no aprimoramento de vetores baseados em retrovírus (Strauss, 1997; Hewson, 2000). No entanto, algumas questões referentes à segurança na utilização destes vírus ainda devem ser superadas, como a possibilidade de ocorrência de mutagênese insercional devido à integração sítio-inespecífica do genoma viral no cromossomo da célula hospedeira (Cornetta e cols., 1991; Miyoshi e cols., 1998), resultando em ativação de proto-oncogenes ou mesmo inativação de genes por inserção aleatória no interior de regiões codificantes ou regulatórias de genes celulares. Donahue e colaboradores (1992) mostraram que a utilização de vetores não otimizados pode desencadear o surgimento de processos carcinogênicos, como observado após transdução de células tronco hematopoéticas de macacos *ex vivo* e desenvolvimento de leucemia linfóide nesses animais após reinfusão das células modificadas. Além disso, a atividade mutagênica de vetores retrovirais pode ser relacionada ao surgimento de variantes retrovirais formadas por eventos de recombinação homóloga entre os plasmídeos que codificam o vetor, ou mesmo por recombinação com vírus selvagens, que ocasionam o aparecimento de vírus mutantes capazes de realizar sua replicação independente na célula-alvo. Tais variantes também podem ser formadas por incorporação de retrovírus endógenos existentes no genoma humano e de vários mamíferos, principalmente através de regiões homólogas, fornecendo o material gênico capaz de reativar estas formas virais (Chong e cols., 1998; Patience e cols., 1998). Como forma de minimizar esses riscos, o delineamento de novos vetores inclui a deleção de grande parte das regiões homólogas entre diferentes plasmídeos (Sheridan e cols., 2000). O silenciamento da expressão de transgenes exógenos é outro problema a ser superado com o desenvolvimento de vetores mais eficazes de transferência gênica. Acredita-se que este problema esteja relacionado a alterações na estrutura da cromatina, principalmente devido à condensação dessa e a alterações químicas de histonas (principalmente metilação e desacetilação), que tornam as

regiões promotoras do provírus inacessíveis aos fatores de transcrição celulares (Chen e Townes, 2000). Inativação específica de enzimas responsáveis pela alteração na estrutura da cromatina através de inibição por tratamento químico e/ou inclusão de seqüências de DNA específicas (como promotores com atividade forte e insuladores de cromatina) são estratégias utilizadas para minimizar ou evitar o silenciamento da expressão, sendo importantes no desenvolvimento de vetores gênicos e procedimentos clínicos (Chen e cols., 1997; Emery e cols., 2000).

Vários representantes da família dos retrovírus vêm sendo estudados, com grande destaque para o oncovírus MMLV (Vírus da Leucemia Murina de Moloney), e os lentivírus EIAV (Vírus da Anemia Infecciosa Equina), SIV (Vírus da Imunodeficiência de Símios), HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina). Dentre esses, o único já utilizado em protocolos clínicos como vetor para transferência gênica é o MMLV, por ser o mais extensivamente pesquisado e por não possuir tropismo natural por células humanas. Até o presente momento, esse vírus é o único aprovado <sup>→ USA?</sup> para emprego em procedimentos e testes clínicos em humanos. Apesar de sua grande utilização, esse sistema é bastante incompleto, pois os oncovírus como o MMLV são capazes de infectar exclusivamente células em divisão, já que necessitam do rompimento da membrana nuclear (que ocorre durante a mitose) para atingir o núcleo. Muitas células quiescentes são alvos preferenciais para terapia gênica, como neurônios e progenitores hematopoéticos. Devido a este fato, a utilização de lentivírus como carreadores gênicos tem aumentado em grandes proporções.

Inúmeros vetores baseados no HIV têm sido relatados e descritos. Estes vetores têm como característica principal a capacidade de infectarem células que não sofrem mitose, representando um grande avanço em relação ao uso de vetores oncovirais (Naldini e cols., 1996b). Os vetores baseados em HIV-1 já provaram sua eficácia para transdução em diversos tipos celulares, como hepatócitos, neurônios, células musculares, fibroblastos, células da retina, córnea e células de linhagem hematopoética tanto *in vivo* como *in vitro* (Blömer e cols., 1997; Kafri e cols., 1997; Miyoshi e cols., 1997; Case e cols., 1999; Wang e cols., 2000). Inúmeros avanços também têm sido obtidos no desenvolvimento de vetores baseados no HIV-1 com maior eficiência e segurança para utilização em humanos. Entre eles podemos citar os vetores auto-inativantes, nos quais certas regiões com atividade promotora da LTR 3' são deletadas, sendo transmitidas à LTR 5' no primeiro ciclo infeccioso. Assim, ambas LTRs perdem a capacidade de ativação da transcrição, permitindo regulação da expressão do transgene por cassetes de



expressão internos (Miyoshi e cols., 1998; Zufferey e cols., 1998); vetores de inclusão de íntrons (Ismail e cols., 2000), onde a inclusão de novos sítios doadores de *splicing* promove um aumento na expressão do transgene; vetores baseados na remoção de códons AUG da sequência líder não traduzida, que minimizam a expressão de proteínas aberrantes por códons iniciadores contidos nessa região, aumentando assim a segurança (pela minimização da possibilidade de recombinação homóloga) e diminuindo a imunogenicidade (relacionada aos produtos de expressão aberrantes gerados por códons AUG da sequência líder) (Hildinger e cols., 1999); vetores mínimos (também conhecidos como de 3<sup>a</sup> geração) contendo somente as seqüências indispensáveis em *cis* para o funcionamento como vetor, com a retirada de grande parte dos genes acessórios e auxiliares, e decorrente aumento da segurança e diminuição da citotoxicidade (Kim e cols., 1998; Gasmi e cols., 1999); vetores indutíveis, onde a expressão é restrita a determinados alvos celulares ou dependente de indução química, através da utilização de promotores tecido específicos ou dependentes de ligação química com indutores (Grande e cols., 1999; Kafri e cols., 2000); sistemas para expressão simultânea de mais de um gene, baseado no mecanismo de regulação de *splicing* natural do vírus ou na introdução de sítios internos de entrada de ribossomo (IRES) (Zhu e cols., 2001); desenvolvimento de linhagens celulares de empacotamento para vetores baseados no HIV, capazes de produzir vetores em escala clínica e com expressão de proteínas virais indutível (Srinivasakumar e cols., 1997; Klages e cols., 2000; Wu e cols., 2000; Pacchia e cols., 2001; Sparacio e cols., 2001; Xu e cols., 2001); vetores derivados do HIV tipo 2, cuja patogenicidade é menor que a do HIV tipo 1 e, conseqüentemente, apresenta maior segurança para uso em humanos (Poeschla e cols., 1998b).

Mesmo com todos os avanços no melhoramento e segurança dos vetores lentivirais baseados no HIV, ainda existem inúmeras restrições na sua utilização em protocolos clínicos, impossibilitando ensaios *in vivo* em humanos. O risco de recombinação com HIV selvagem e a possibilidade do aparecimento de vírus capazes de replicação independente (RCRs ou *Helper Virus*) originados através de mecanismos de recombinação homóloga entre os elementos usados na produção do vetor, impedem que o HIV seja utilizado na terapêutica. Além disso, a produção, manipulação, administração e estoque das quantidades de vetores HIV necessárias para utilização clínica exigem elevados níveis de segurança, como laboratórios contendo instalações com classificação de segurança III (CDC, 1999). Outro problema relacionado à utilização do HIV como vetor de transferência gênica está na soroconversão dos pacientes tratados, que desenvolvem

anticorpos anti-HIV, impossibilitando a diferenciação sorológica desses pacientes daqueles naturalmente infectados. Uma alternativa para a superação desses problemas foi sugerida com a utilização de vetores baseados em lentivírus de mamíferos não-primatas, e entre eles destacam-se o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e o Vírus da Anemia Infeciosa Equina (EIAV). A utilização desses vírus como vetor tornou obsoleta a utilização de vetores baseados em HIV (Naldini, 1998a; Romano e cols., 2000).

O FIV é um retrovírus linfotrófico que foi primeiramente identificado em felinos domésticos (gatos) na cidade de Davis, Califórnia. Baseado nas características morfológicas e bioquímicas, tropismo celular, transcriptase reversa  $Mg^{++}$ -dependente, organização genética e propriedades antigênicas, o FIV é classificado, juntamente com o HIV e outros já citados, como um lentivírus, apresentando grande homologia com o Vírus Maedi Visna (Hartmann, 1998; Crystal, 1999). A partícula viral do FIV tem 105-125 nm de diâmetro, possui forma esférica a elipsoidal (elíptica), com poucas e curtas projeções em seu envelope e contendo 2 cópias idênticas do genoma RNA. O genoma de 9,4 Kb do FIV está organizado como o dos demais retrovírus, com os genes estruturais *env*, *gag* e *pol* e com o adicional de 7 ORFs (*open reading frame*), algumas codificantes de proteínas (Miyazawa e cols., 1994; Elder e Phillips, 1995).

O tipo selvagem do FIV apresenta tropismo para células T, B, macrófagos, astrócitos e micróglia. Uma vez na célula, o FIV tem um ciclo de vida similar ao de outros retrovírus. Gatos infectados por FIV desenvolvem uma linfadenopatia aguda, neutropenia e febre. Assim como na síndrome de imunodeficiência em humanos, produzida pelo HIV, a doença apresenta uma fase assintomática, seguida por uma linfadenopatia generalizada, febre recorrente, apatia, leucopenia, anemia, anorexia, perda de peso, estomatite e problemas de comportamento. Finalmente, há uma fase terminal como na AIDS marcada por infecções oportunistas, neoplasias e anormalidades neurológicas (Hartmann, 1998; Crystal, 1999).

A infecção do FIV ocorre por interação específica de glicoproteínas do envelope com receptores da superfície celular, sendo muito semelhante aos demais lentivírus. Willett e colaboradores (1997) sugeriram a utilização do receptor de quimiocina CXCR4, de superfície celular, como mecanismo comum de infecção entre os lentivírus de primatas e não primatas, mostrando que as glicoproteínas de envelope do FIV podem reconhecer as formas humana e felina do receptor CXCR4, mediando a fusão do vírus com a célula-alvo. Além do trabalho acima citado, diversos outros descrevem a importância da participação das glicoproteínas de envelope na etapa de infecção da célula alvo,

mostrando que o tropismo decorrente da interação glicoproteína de envelope-receptor celular pode ser modificado com alterações de um único aminoácido na estrutura dessas proteínas (Verschoor e cols., 1995; Vahlenkamp e cols., 1997). Poeschla e Looney (1998) igualmente relataram a necessidade dos receptores de quimiocina CXCR4 para lentivírus de não-primatas. A expressão artificial da molécula CXCR4 (via transfecção do gene que codifica esta proteína) em células CXCR4 negativas, humanas e de ratos, resultou em infecção pelo FIV e fusão celular CXCR4-dependente. Esse mesmo trabalho descreve infecção produtiva do FIV em células humanas, caracterizando a baixa atividade transcricional da região U3 da LTR 5' como sendo o fator determinante na restrição da fase produtiva de replicação em células humanas. Essa atividade reduzida pode estar associada aos diversos sítios de ligação a proteínas plasmáticas existentes nessa região, que são importantes reguladores da atividade promotora viral. Assim, a ausência de proteínas felinas que atuem como elementos *cis*-ativadores em sítios como AP-1, AP-4, ATF, C/EBP e NF- $\kappa$ B, em células humanas, pode ser o fator determinante na improdutividade da infecção do FIV nessas células (Sparger e cols., 1992; Kawaguchi e cols., 1995; Inoshima e cols., 1996; Ikeda e cols., 1998).

O genoma do FIV (representado na figura 2) é composto por 3 genes estruturais: o primeiro deles é o gene *gag*, que é transcrito e traduzido juntamente com o gene *pol*, dando origem à poliproteína Gag/Pol. Após ação da protease viral, as proteínas maduras codificadas por *gag* são as proteínas da matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) [p15, p25 e p7 (p10), respectivamente]. Essa última possui importância por ser crítica na dimerização do RNA genômico em eventos na fase de pré-integração (Elder e Phillips, 1995). O gene *pol* codifica as enzimas do vírus, e é transcrito na mesma fase de leitura que o gene *gag*. As enzimas do FIV são quatro, e possuem grande semelhança com as do HIV e outros lentivírus. A protease (PR), responsável pela clivagem da poliproteína Gag/Pol em seus produtos maduros, possui especificidade de clivagem entre resíduos de tirosina e prolina (Schnolzer e cols., 1996). A enzima transcriptase reversa (RT) é responsável pela conversão do RNA viral em DNA (próvirus). A enzima deoxiuridina trifosfatase (DU), inexistente no HIV, não é essencial para a replicação do vírus, e possui função provável de reduzir a possibilidade de incorporação errônea de uracila no DNA do próvirus (Wagaman e cols., 1993). Por fim, a enzima integrase (IN) promove a integração do próvirus no genoma da célula hospedeira, de forma inespecífica. O último gene estrutural é o *env*, que codifica as glicoproteínas de envelope precursora (gp 140), superfície (SU - gp100) e transmembrana (TM - gp 36). Essas proteínas, e

principalmente a gp100, estão envolvidas nos processos de reconhecimento e entrada nas células-alvo, através de interação com receptores de superfície (Olmstead e cols., 1989b). Além dos genes estruturais, existem alguns genes acessórios e auxiliares, localizados em pequenas ORFs nas regiões central 3' do genoma do FIV e que codificam proteínas com funções reguladoras dos diversos processos envolvidos na replicação viral. São eles os genes *vif* (com funções equivalentes ao *vif* do HIV, sendo indispensável na infecção de algumas linhagens celulares) (Schacklett e Luciw, 1994), o gene *orfA* (cujo produto é um transativador, semelhante à proteína Tat do HIV, embora de fraca atividade) (de Parseval e Elder, 1999) e o gene *rev* (cuja proteína tem como principal função atuar no transporte das moléculas de RNA do núcleo para o citoplasma) (Phillips e cols., 1992). A interação da proteína Rev com o RNA viral ocorre através de uma região do genoma conhecida como RRE (*Rev Response Element*), que é reconhecido pela Rev. A presença dessa proteína é indispensável no ciclo replicativo dos lentivírus, já que a proteína Rev facilita o transporte do RNA não processado (genoma RNA do vírus) para o citoplasma, que de outra forma é retido no núcleo (Miller e cols., 2000). No genoma dos retrovírus existem também regiões flanqueadoras de seqüência repetida, denominadas LTRs (*Long Terminal Repeats*), responsáveis pela regulação de diversas etapas do ciclo replicativo viral. As LTRs estão localizadas nas extremidades 3' e 5' do DNA proviral (apresentando seqüências idênticas em ambas extremidades e com orientação direta), podendo ser divididas em três regiões distintas: U3, onde encontram-se os elementos promotores e ativadores da transcrição (como *TATA Box* e seqüências de regulação da transcrição viral, como sítios de ligação a proteínas plasmáticas); a região R, onde localiza-se o sítio de poliadenilação do RNA viral; e a região U5, envolvida no processo de encapsidação do genoma do vírus (parte do sinal de encapsidação). Além disso, as LTRs contêm seqüências necessárias no mecanismo de transcrição reversa (sítios de ligação do primer de tRNA, ou PBS?) e outras relacionadas à etapa de integração do próviro. O fator de encapsidação é mais um componente importante do genoma do FIV e dos demais lentivírus, sendo também identificado pela letra grega  $\psi$  (psi). A localização exata desta região não é bem conhecida, mas sabe-se que inclui a região não transcrita *downstream* a LTR 5', estendendo-se por aproximadamente 200-250 nucleotídeos pelo gene *gag*. Esta porção do genoma é bastante importante, pois é reconhecida pelas proteínas do capsídeo e promove a incorporação da molécula de RNA (genoma do vírus) na partícula viral, através de interação com motivos de dedos de zinco da proteína de nucleocapsídeo (Talbot e cols., 1989; Elder e Phillips, 1995; Tomonaga e Mikami, 1996).

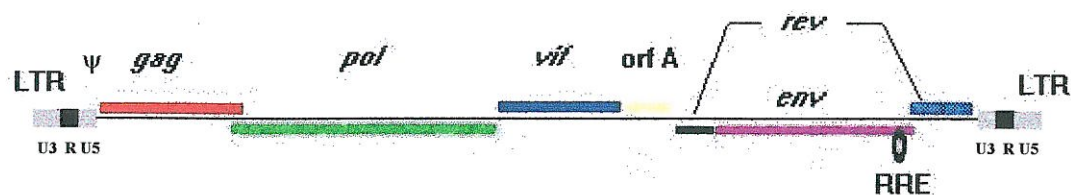


Figura 2. Esquema representando a organização genômica do FIV.  $\Psi$  equivale ao fator de encapsidação.

A utilização do FIV como vetor de transferência gênica é considerada um avanço na tecnologia da produção de vetores (Romano e cols., 2000). Até há pouco tempo, não se conheciam as barreiras naturais que impediam a infecção de células humanas pelo FIV. Além da já mencionada fraca atividade do Rev desse vírus em células humanas (Tomonaga e cols., 1994; Poeschla e Looney, 1998), a pequena atividade transcricional da LTR do FIV em humanos (Miyazawa e cols., 1992; Sparger e cols., 1992) também foi proposta como fator determinante dessa condição. A superação dessas limitações é indispensável na produção de vetores que apresentem características adequadas de segurança, já que a utilização de células de empacotamento de origem felina pode ocasionar a mobilização de retrovírus endógenos. Como exemplo, podemos citar o RD 114, um retrovírus tipo C endógeno, indutível, com capacidade de replicação e relacionado com retrovírus de primatas, que existe em múltiplas cópias no genoma de felinos. O RD114 replica-se em células humanas, é capaz de misturar-se fenotipicamente com o FIV e outros retrovírus e resiste à inativação pelo sistema complemento humano, representando risco de inserção na população de elementos virais xenotrópicos (Takeuchi e cols., 1994). Poeschla e colaboradores (1998a) relataram que o único impedimento para infecção produtiva em células humanas pelo FIV era a baixa atividade transcricional do LTR em células humanas. Assim, a substituição da região U3 da LTR 5' (onde se encontram a maior parte dos elementos promotores do vírus) por um promotor constitutivo eucarioto com atividade transcricional forte foi suficiente para tornar o FIV infectivo em células humanas. O promotor utilizado foi o CMV (derivado do citomegalovírus humano). Desta forma, o FIV foi capaz de replicar eficazmente em células humanas, podendo ser utilizado em experimentos de transferência gênica.

Outro fator importante está relacionado ao tropismo de vetores baseados no FIV, já que um número muito grande de alvos celulares para terapia gênica não apresenta expressão dos receptores necessários para a entrada desse vírus na célula. Retrovírus

recombinantes podem ser construídos de forma que o genoma encapsidado seja envelopado por proteínas de envelope de outros vírus. A substituição das glicoproteínas do envelope viral do FIV por uma proteína de envelope do Vírus da Estomatite Vesicular permitiu que o tropismo do FIV por células humanas fosse ampliado. Esse processo foi descrito inicialmente por Burns e cols. (1993) em preparações de vetores baseados no MMLV e é conhecido por pseudotipagem, sendo amplamente utilizado na produção de vetores retro e lentivirais. Nele, a proteína do envelope dos retrovírus é substituída pela proteína G do envelope do Vírus da Estomatite Vesicular (conhecida como VSV-G), um rabdovírus. A VSV-G é uma glicoproteína que reconhece e se liga à fosfatidilserina, um lipídeo constituinte da membrana celular que possui ampla distribuição em células animais. A ausência de um receptor protéico específico acarreta uma ampliação do tropismo do natural do vetor, permitindo que esse tenha um aumento no número de alvos celulares possíveis. Foi demonstrado também que a inclusão da VSV-G no vírion aumenta a estabilidade do envelope, permitindo que este sofra processos físicos de concentração sem perda significativa da infectividade ou do título viral (Burns e cols., 1993; Ory e cols., 1996; Reiser e cols., 1996).

Ainda não foram descritas linhagens celulares de empacotamento para o FIV. Assim sendo, a produção de vetores virais baseados nesse vírus é feita pelo método da cotransfecção de três plasmídeos descrita por Soneoka e colaboradores (1995). Neste sistema, 3 plasmídeos distintos são transfectados simultaneamente em linhagens celulares adequadas pelo método da coprecipitação com fosfato de cálcio, visando a produção transiente de vetores virais. A figura 3 ilustra este processo e descreve a função de cada uma das construções plasmidiais. Um dos plasmídeos (de empacotamento) codifica as proteínas necessárias para síntese das partículas virais (genes estruturais *gag* e *pol*), sendo responsável pela produção, nas células empacotadoras, das enzimas e proteínas do capsídeo. Um outro plasmídeo (envelope) carrega a informação para a proteína de envelope, sendo o mais comum o gene codificante para VSV-G, no processo de pseudotipagem já descrito. O último plasmídeo (vetor) contém, além do gene exógeno a ser transferido para a célula-alvo (geralmente localizado num cassete de expressão interno), as seqüências mínimas necessárias em *cis* para integração do vírus e expressão do transgene. Além disto, essa construção contém o fator de encapsidação  $\psi$ , para que o RNA transcrito a partir desse plasmídeo seja eficientemente incorporado na partícula viral. Este sistema garante que os genes necessários para a produção de novas partículas virais (genes estruturais existentes nos dois primeiros plasmídeos) não sejam

encapsidados e incorporados nas células-alvo, impossibilitando a ocorrência de outro ciclo de replicação viral. A utilização da técnica de cotransfecção com 3 plasmídeos possibilita também um avanço na questão da segurança do sistema de produção de vetores, já que com a utilização de 3 construções distintas seriam necessários pelo menos 2 eventos simultâneos de recombinação para formação de mutantes capazes de replicação independente (RCRs). O desenho e construção de plasmídeos que não contenham seqüências superpostas (mesmo gene ou região genômica em mais de um plasmídeo) diminuem a probabilidade de ocorrência de recombinação homóloga. A utilização de construções contendo apenas as seqüências mínimas em *cis* para obtenção de uma transdução eficiente também é um expediente utilizado para desenvolvimento de vetores mais seguros. Estas seqüências mínimas já foram determinadas tanto para o HIV (Kim e cols., 1998) quanto para o FIV (Johnston e cols., 1999). Para o FIV, observou-se que, entre os genes acessórios e auxiliares, apenas o *rev* é essencial para o funcionamento do vetor, podendo ser fornecido em *trans*. A região RRE também é importante em *cis*, onde atua no transporte do RNA na célula empacotadora. Os genes estruturais *gag* e *pol* são fornecidos em *trans* para síntese do vírion. O gene *env*, do envelope viral, pode ser removido e substituído por fornecimento em *trans* de outra proteína de envelope (a já referida VSV-G). Os genes *vif* e *orfA* do FIV podem ser removidos sem nenhuma alteração no título viral ou eficiência de transdução (Johnston e cols., 1999).

O emprego do FIV como vetor é relativamente recente, e o número de relatos na literatura que utilizam este vírus como carreador gênico são poucos. Poeschla e colaboradores (1998a) foram os primeiros a descrever um vetor de transferência gênica baseado no FIV. Nesse estudo, os autores provaram ser possível a transdução de diversas linhagens de células felinas, murinas e também humanas. O FIV foi capaz de infectar neurônios, hepatócitos, epiderme e outras linhagens humanas, provando ser efetivo na transdução de células quiescentes e mitóticas com igual eficiência.

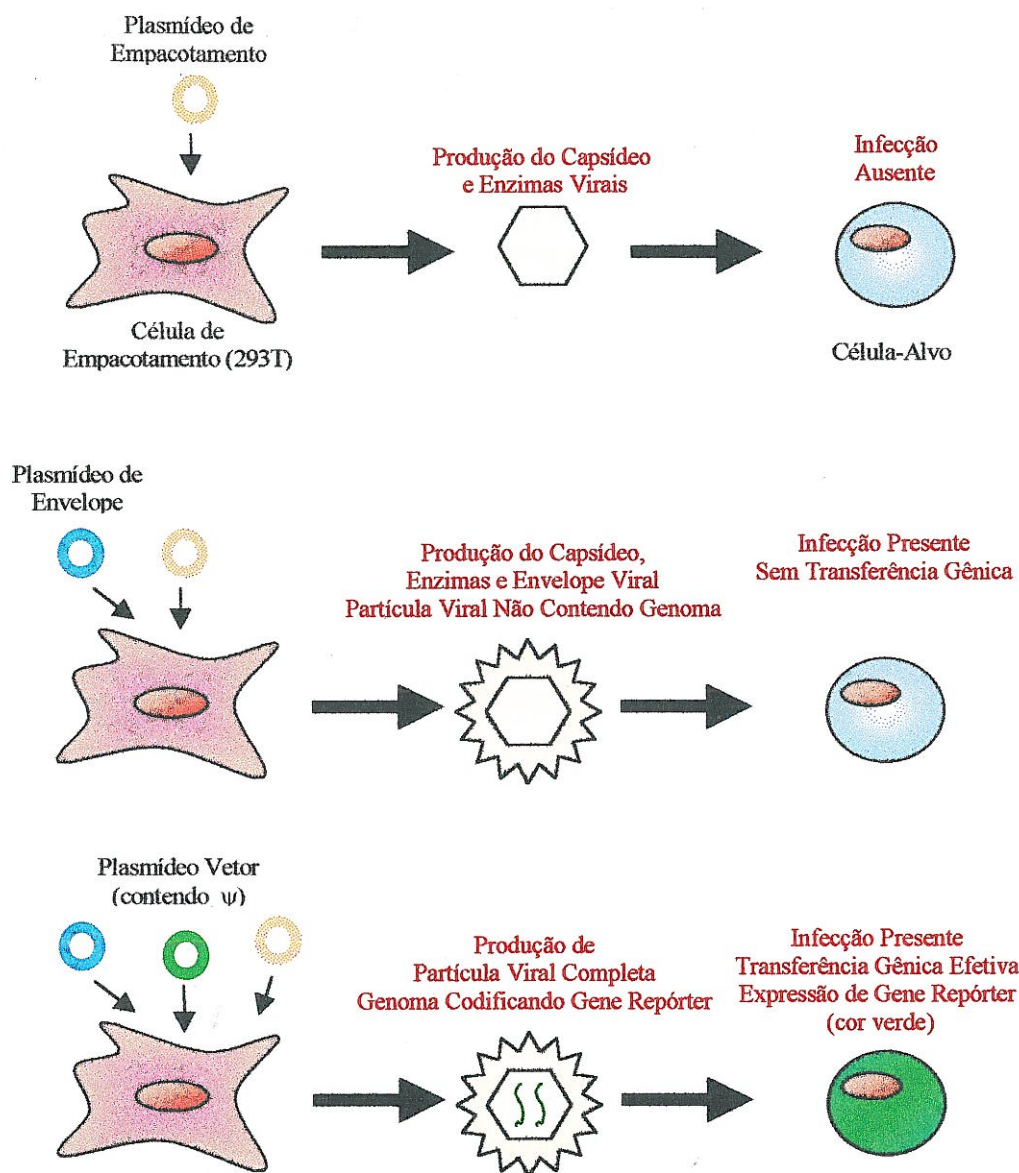


Figura 3: Produção de vetores e transferência gênica utilizando cotransfecção com 3 plasmídeos. A gravura é ilustrativa, procurando mostrar a função de cada um dos construtos utilizados.

Em ensaios pré-clínicos de terapia gênica, assim como em estudos de desenvolvimento e aprimoramento de vetores, é bastante comum a utilização de genes repórteres para controle e avaliação da eficiência da transferência gênica e para o monitoramento da expressão do transgene. A utilização de tal expediente permite uma análise da eficiência do método de transferência gênica em estudo, em diferentes tipos celulares, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (An e cols., 2000). A detecção, em geral, é feita por métodos indiretos, que requerem a presença de substratos, marcação mediada por anticorpo ou fixação celular. Entre estes genes podemos citar os genes da  $\beta$ -galactosidase



( $\beta$ -gal), luciferase (LUC) e proteínas marcadoras de superfície celular (Strair e cols., 1990; Phillips e cols., 1996). A proteína verde fluorescente GFP foi descrita em 1994 por Chalfie e colaboradores; isolada a partir do organismo *Aequoria victoria* (uma espécie de água-viva), tem sido usada como importante marcador em experimentos de transferência gênica. Esta proteína emite fluorescência verde (509 nm) quando excitada por luz ultravioleta (395-470 nm) independentemente de substratos ou cofatores, podendo ser facilmente monitorada de forma direta, não invasiva e muito simples, através de citometria de fluxo e/ou microscopia de fluorescência. Algumas variantes de GFP foram desenvolvidas visando alterações na capacidade de detecção do gene, aumento na intensidade de fluorescência, estabilidade e características de absorção e emissão. Por isso, GFP e seus diversos derivados vêm sendo utilizados como importantes marcadores celulares em diversos organismos e tipos celulares, em experimentos de monitoração de expressão gênica, localização de proteínas e elementos celulares (Naylor, 1999; Billinton e Knight, 2001).

Inúmeros tipos de células e tecidos são utilizados como alvo em ensaios clínicos e pré-clínicos de terapia gênica. A escolha dos alvos celulares está relacionada a características das patologias e tecidos afetados por essas, bem como ao tipo de abordagem terapêutica desejada. Nesse contexto, o sistema hematopoético representa interessante modelo em estudos de transferência gênica, e diversas propriedades como renovação constante (aproximadamente  $10^{11}$  células repostas diariamente), tempo de vida celular relativamente curto, ampla distribuição no organismo (proporcionando contato íntimo e dinâmico com diversos outros tecidos) são essenciais na caracterização desse. Ao processo de formação de células sanguíneas dá-se o nome de hematopoese, que ocorre a partir da maturação e diferenciação de determinadas células primordiais indiferenciadas, capazes de originar todas as demais linhagens sanguíneas (multipotenciais) e que possuem ainda potencial de auto-renovação. Essas células primordiais são denominadas células tronco hematopoéticas (HSCs) e envolvem, no processo de diferenciação e comprometimento com certas linhagens sanguíneas específicas, perda da capacidade de auto-renovação e da multipotencialidade (Ogawa e cols., 1983). As HSCs são relativamente raras (1 em cada  $10^4$  células da medula óssea, e cerca de 100 vezes menos comuns no sangue periférico), sendo mantidas em níveis homeostáticos durante a vida adulta. Níveis similares aos da medula óssea são encontrados em sangue de cordão umbilical (Pranke e cols., 2001).

As células tronco hematopoéticas possuem tempo de vida longo, embora sejam normalmente encontradas em estado de quiescência. Até o presente momento, a caracterização biológica dessas células é definida quase que exclusivamente por sua capacidade de reconstituição das diferentes linhagens hematopoéticas (mielóide e linfóide) em ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A caracterização fenotípica tem se mostrado controversa, e embora a presença e/ou ausência de determinados marcadores de superfície (entre eles CD34, CD 38, Thy-1 e KDR e c-kit) sejam os métodos atualmente mais utilizados, tais sistemas têm se mostrado imprecisos, sugerindo a investigação e o desenvolvimento de novos parâmetros de caracterização biológica dessas células (Lange e cols., 1999; Ziegler e cols., 1999; Dorrel e cols., 2000). Devido a essas dificuldades na caracterização, bem como à complexidade das células tronco hematopoéticas, fontes alternativas de modelos do sistema hematopoético têm sido utilizadas na tentativa de obtenção de maiores detalhes sobre a biologia dessas células. Diversas linhagens celulares hematopoéticas estabelecidas em laboratório são rotineiramente usadas como modelos de hematopoese, visando a caracterização dos processos de expansão e diferenciação celular, ou como parâmetros na padronização de métodos de transferência gênica e na avaliação da eficiência de vetores (Grande e cols., 1999; Ramezani e cols., 2000; Teixeira e cols., 2001).

A regulação da hematopoese é um processo extremamente complexo, envolvendo interações entre diversos componentes celulares. Entre os fatores que regulam a proliferação, diferenciação e manutenção das diversas linhagens hematopoéticas encontramos células não-móveis do estroma hematopoético (fibroblastos, macrófagos, adipócitos, células reticulares e endoteliais), matriz extracelular e fatores solúveis (glicoproteínas como citocinas e fatores de crescimento). Estes elementos, combinados, são conhecidos como microambiente hematopoético, que além da regulação da hematopoese também fornece o suporte físico estrutural para que essa ocorra. Um número grande de citocinas é envolvido no processo de hematopoese (como Interleucinas, *Stem Cell Factor*, *Colony Stimulating Factors*, Eritropoetina e Trombopoetina), e as interações de células estromais entre si e com células hematopoéticas podem ocorrer tanto através desses fatores solúveis quanto através de contato entre moléculas de adesão e proteínas de superfície (Whetton e Graham, 1999). Conexões celulares do tipo *gap junctions* possuem também função importante no suporte à hematopoese (Cancelas e cols., 2000).

As células tronco hematopoéticas são, juntamente com os demais componentes celulares do sistema hematopoético, alvos promissores para terapia gênica. A capacidade

de auto-renovação e diferenciação em outras linhagens contribui para esse fato. Entretanto, a dificuldade na caracterização desse tipo celular envolve o estabelecimento de técnicas de transferência gênica para linhagens hematopoéticas em geral, com o objetivo de aperfeiçoar os protocolos de terapia gênica para alvos desse tipo. A transferência gênica para uma célula tronco desse sistema promove a modificação do repertório gênico e conseqüente perpetuação do transgene por toda a sua progênie (Miyoshi e cols., 1999). As HSCs são ainda facilmente purificadas a partir de diversas fontes no organismo (Huss, 2000) e manipuladas *ex vivo*, sendo possível o reimplante no paciente através de transplantes autólogos, já que essas possuem mecanismos de *homing* para sítios de hematopoese (Whetton e Graham, 1999). Estudos mostram que a reinfusão de células tronco hematopoéticas é capaz de reconstituir totalmente as funções sangüíneas em modelos animais imunodepletados, com diferenciação efetiva nas diversas linhagens hematopoéticas (Bhatia e cols., 1998; Lange e cols., 1999). Uma outra vantagem na transferência gênica em células hematopoéticas é que essas possuem uma distribuição por praticamente todo o organismo, possibilitando a dispersão de células que funcionem como veículos carreadores de genes. Muitas doenças, tanto hereditárias quanto adquiridas, têm sido alvos de estratégias terapêuticas envolvendo o sistema hematopoético, como hemoglobinopatias, síndromes de imunodeficiência, distrofia muscular de Duchenne, artrite reumatóide, hemofilias, doenças de acúmulo lisossomal (entre as hereditárias) e AIDS, câncer e outras doenças infecciosas (entre as adquiridas), mostrando que o uso dessas células não está restrito ao tratamento de distúrbios hematológicos. A ampla distribuição do sangue pelas mais diversos tecidos do organismo permite que essas células sejam utilizadas no tratamento de patologias variadas (Baum e cols., 1997; Kohn, 1997; Asahara e cols., 2000). Entretanto, certas limitações na manipulação das células tronco hematopoéticas e outras linhagens desse sistema ainda são um problema no desenvolvimento de protocolos clínicos utilizando essas células. A manutenção e expansão de HSCs em cultura durante períodos prolongados geralmente levam a uma diferenciação das células precursoras e perda de sua capacidade de hematopoese (Bathia e cols., 1998; Tisdale e cols., 1998; Dorrel e cols., 2000). Estudos que permitam um melhor conhecimento da biologia dessas células são muito importantes, bem como o desenvolvimento de novos protocolos que permitam uma melhor sobrevivência e expansão de progenitores hematopoéticos em cultura (Audet e cols., 1998; Hoffman, 1999). Inúmeros relatos descrevem a transdução eficiente de células hematopoéticas utilizando vetores retrovirais, mostrando que esses apresentam uma alternativa promissora

na transferência gênica para esse tipo de célula. Além disso, a expressão do transgene foi acompanhada e verificada na progênie destas células, mostrando que a inserção viral não ocasiona perda ou alteração da função hematopoética (Case e cols., 1999; Miyoshi e cols., 1999; An e cols., 2000).

O estroma hematopoético tem recentemente despertado atenção no meio científico por possuir características que o tornam um alvo muito interessante em experimentos de transferência gênica. Uma delas é a importante função na regulação da manutenção da hematopoese, onde a manipulação genética desse tecido pode ser útil no tratamento de disfunções hematopoéticas possivelmente relacionadas a anormalidades no compartimento estromal (Nardi e Alfonso, 1999). Uma outra característica do estroma é apresentar um tipo celular com capacidade de diferenciação em diversas outras linhagens de origem mesenquimal. Essa célula foi descrita recentemente na literatura, e é conhecida como célula tronco mesenquimal (MSC, *Mesenchymal Stem Cell*), possuindo capacidade de proliferação extensiva e diferenciação *in vitro* em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos e cardiomíoblastos, além de neurônios e células da micro e macroglia (Huss, 2000). Muraglia e colaboradores (2000) sugeriram que a capacidade de diferenciação clonal das MSCs obedece um modelo hierárquico similar ao encontrado no sistema hematopoético, com comprometimento progressivo nas diversas linhagens derivadas e conseqüente perda da capacidade de diferenciação. Pouco se sabe a respeito da regulação da diferenciação das células tronco mesenquimais no organismo, mas acredita-se que essa ocorra em resposta a fatores solúveis, de origem protéica e hormonal. Em cultura, a adição de compostos químicos acarreta a diferenciação fenotípica e expressão de proteínas específicas de determinadas linhagens mesenquimais, caracterizando a diferenciação (Pittenger e cols., 1999).

A caracterização da célula tronco mesenquimal é, a exemplo da sua equivalente hematopoética, ainda bastante difícil, e baseada principalmente na capacidade funcional de diferenciação em múltiplas linhagens e proliferação. Inúmeros protocolos vêm sendo descritos na tentativa de purificação dessas células, baseados principalmente no isolamento da fração aderente a plástico do estroma de medula óssea (Colter e cols., 2000; Huss e cols., 2000), permitindo a obtenção de frações enriquecidas de MSCs. Essas frações podem ser manipuladas *ex vivo* e administradas a pacientes, pois apresentam a capacidade de *homing* e estabilização em diversos locais do organismo, inclusive medula óssea (Cilloni e cols., 2000), baço (Fan e cols., 2001) e sistema nervoso central (Kopen e cols., 1999). As células tronco mesenquimais têm sido exploradas como veículo de

transferência gênica principalmente por suas capacidades de reconstituição de tecidos e transferência do gene exógeno para a sua progênie. Além disso, podem garantir a produção local de proteínas exógenas e mesmo substituir a função de genes responsáveis por defeitos em proteínas circulantes. Ensaios para a correção de doenças como hemofilia B e *osteogenesis imperfecta* severa, através da introdução dos genes do fator IX e colágeno tipo 1, respectivamente, foram descritos utilizando técnicas de transferência gênica para células tronco mesenquimais (Cherington e cols., 1998; Horwitz e cols., 2001). Essas células já foram eficientemente transduzidas utilizando vetores adenovirais (Conget e Minguell, 2000) e retrovirais (Kitano e cols., 2000), sendo que a transferência gênica não causa alterações na capacidade proliferativa e de diferenciação das MSCs. A transdução estável de células tronco mesenquimais já foi também descrita por Lee e colaboradores (2001), através da utilização de um vetor baseado no MMLV. A expressão do transgene foi acompanhada durante vários meses, e a proteína codificada pelo gene exógeno foi detectada na progênie das células tronco transduzidas, em cultura e após administração por diversas vias, indicando que a expressão do transgene é mantida durante a expansão e diferenciação. Esses resultados ilustram o potencial clínico na aplicação das MSCs como veículos celulares para transferência gênica sistêmica, inclusive para tecidos onde a utilização de células hematopoéticas geneticamente modificadas não é possível, como sistema nervoso central. A capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica e diferenciação em diferentes tipos celulares neurais, como neurônios, micróglia e astróglia permitem aplicações como reestabelecimento de função enzimática por adição gênica no sistema nervoso central (em indivíduos afetados por determinados erros inatos do metabolismo) e reposição celular em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Kopen e cols., 1999; Mezey e cols., 2000).

## OBJETIVOS

A utilização de lentivírus de não primatas em estudos de transferência gênica propicia um inestimável instrumento na tentativa de estabelecer protocolos de terapia gênica eficazes e seguros. Para isso, são necessários o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de vetores com grande capacidade de transdução das células alvo e com suficiência na expressão do transgene. Visando contribuir para uma melhor compreensão dos processos envolvidos na transferência gênica, foram propostos os seguintes objetivos:

- 1) Estabelecimento da técnica de utilização de vetores lentivirais baseados no Vírus da Imunodeficiência Felina, visando a transdução de diversos alvos celulares de maneira estável, com otimização das condições de produção do vetor e padronização da metodologia de transferência gênica em células hematopoéticas e estromais, além da avaliação da eficiência obtida nos ensaios e dos níveis de produção do transgene;
- 2) Monitoramento da expressão do gene repórter durante a proliferação e expansão celular, bem como a mensuração da toxicidade inerente ao processo;
- 3) Acompanhamento do surgimento de formas mutantes recombinantes do vírus, para avaliação da segurança na utilização deste vetor.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, foram realizados experimentos de produção de um vetor lentiviral baseado no Vírus da Imunodeficiência Felina, através da técnica de transfecção transiente de células empacotadoras com plasmídeos para a produção desses vetores. A transfecção foi feita através do método da coprecipitação do DNA com fosfato de cálcio. Os vetores produzidos por esse método foram utilizados na transferência de um transgene para vários tipos celulares, e a expressão da proteína exógena foi avaliada por diversos métodos. Neste trabalho, diferentes modelos celulares foram utilizados. A manipulação das linhagens hematopóéticas K562 e Daudi teve como objetivo a análise de dados referentes à expressão do gene exógeno de maneira estável e à suscetibilidade dessas culturas aos métodos de transferência gênica aplicados. Dessa forma, as informações obtidas com esses modelos podem fornecer suporte em futuros estudos utilizando células tronco hematopóéticas. A utilização de culturas de estroma hematopóético como alvo para transferência gênica justifica-se pela presença, nesses cultivos, de células tronco mesenquimais, cuja transformação genética pode ocorrer simultaneamente aos demais componentes do estroma. Assim, a transdução do estroma total pode ser capaz de alterar algumas células multipotenciais, e essas serem posteriormente purificadas e testadas quanto à capacidade proliferativa, de diferenciação e manutenção da expressão do transgene na progênie celular.

### *Cultura de células*

As células da linhagem 293T (cedidas por Carolina Marchetto, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo, Brasil) foram cultivadas em meio DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), solução antibiótica-antimicótica na concentração recomendada pelo fabricante (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) e 2 mM de L-glutamina (Gibco). O cultivo foi realizado em garrafas de 80 cm<sup>2</sup> (Nalge Nunc Int, Roskilde, Dinamarca). As linhagens hematopóéticas Daudi (células linfoblastóides humanas isoladas de um paciente com linfoma de Burkitt) e K562 (linhagem mielóide eritrocitária derivada de paciente com leucemia mielóide crônica em crise blástica) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma) sem vermelho de fenol, já que a presença desse indicador pode

interferir na detecção da GFP (Billinton e Knight, 2001). Esse meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e solução antibiótica-antimicótica nas condições já citadas, em placas de cultura de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). Todas as linhagens foram mantidas em estufa a 37° C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com duas passagens por semana. No repique da linhagem 293T as células eram lavadas com PB e tratadas com tripsina (Cultilab) por no máximo 30 segundos.

Para obtenção de estroma, células de medula óssea de camundongos foram coletadas através da injeção de Solução Salina Balanceada de Hank (Sigma) na cavidade medular do fêmur e da tíbia de camundongos adultos da linhagem BALB/c. As células assim extraídas foram recuperadas por centrifugação a 400 g por 5 minutos e suspensas em meio de cultura IMDM (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e solução antibiótica-antimicótica (Gibco), como descrito anteriormente. As células foram cultivadas em placas de cultura de 6 poços (TPP) sobre lamínula de microscopia, em concentrações que variavam de  $2 \times 10^5$  até  $5 \times 10^6$  células por mL. Após 4 horas de cultura a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, foi retirada a fração não aderente (composta principalmente de células de origem hematopoética) e adição de meio de cultura fresco. A fração aderente da medula óssea (composta por células de origem mesenquimal, hematopoiética e endotelial) foi mantida em cultura em condições idênticas às demais linhagens, visando à proliferação e expansão do tapete celular. Repiques foram realizados nas culturas primárias de estroma quando essas atingiam confluência total (tempo em torno de 15 a 20 dias), através de adição de 1 mL de tripsina (Cultilab) por poço e incubação por 5 minutos, seguida de ressuspensão vigorosa, lavagem e replaqueamento. As células assim cultivadas foram utilizadas nos experimentos de transdução viral e produção transiente de vetores virais.

### *Plasmídeos de expressão viral*

Os plasmídeos utilizados para a produção de vetores baseados no FIV foram cedidos pela Dra. Flossie Wong-Stall (Lentivector Core Program, UCSD, San Diego, CA, EUA). Essas construções foram desenhadas e publicadas originalmente por Poeschla e colaboradores (1998a), constituindo a primeira geração de vetores baseados no FIV. Todos os plasmídeos baseados no Vírus da Imunodeficiência Felina foram desenvolvidos a partir do clone molecular p34TF10 da cepa Petaluma do FIV, produzido por Olmsted e colaboradores (1989a). O plasmídeo de empacotamento, chamado CF1Δenv, é responsável pela produção das proteínas estruturais (entre outras) utilizadas na montagem



dos vírions, e foi construído através da clonagem de parte do p34TF10 na região de múltiplos sítios de clonagem do plasmídeo de expressão pRC/CMV (Invitrogen, San Diego, CA, EUA). Os elementos constituintes desse construto são apresentados na figura 4. A expressão dos produtos dos genes *gag*, *pol*, *vif* e *rev* é regulada por um promotor CMV, que substitui a LTR 5' e cuja junção com o genoma viral ocorre a 97 nucleotídeos *upstream* ao sítio doador de *splicing* principal. A LTR 3' do FIV foi, da mesma forma, substituída por um sinal alternativo de poliadenilação BGH p(A), pertencente ao gene de hormônio do crescimento bovino. Assim, a sequência de encapsidação  $\Psi$ , bem como o sítio de ligação do *primer* de tRNA do FIV (FIV PBS), e as regiões U3, R e U5 das LTRs 5' e 3' estão ausentes, caracterizando a falta dos elementos mínimos necessários para a ocorrência dos processos de encapsidação, transcrição reversa e integração. O CF1 $\Delta$ env possui ainda uma deleção de 881 nucleotídeos do gene *env* (na junção das seqüências codificantes para as glicoproteínas de superfície e transmembrana), que além de causar alteração na fase de leitura retira nucleotídeos importantes na codificação dos produtos gênicos de *env*, impossibilitando a síntese das glicoproteínas de envelope mas mantendo intactas as regiões de sobreposição com o gene *rev*. A expressão do gene *ORF2* não ocorre neste sistema pela presença de um códon prematuro de terminação TAG existente no clone Petaluma, que naturalmente não apresenta a expressão da proteína codificada por esse gene (Talbot e cols., 1989).

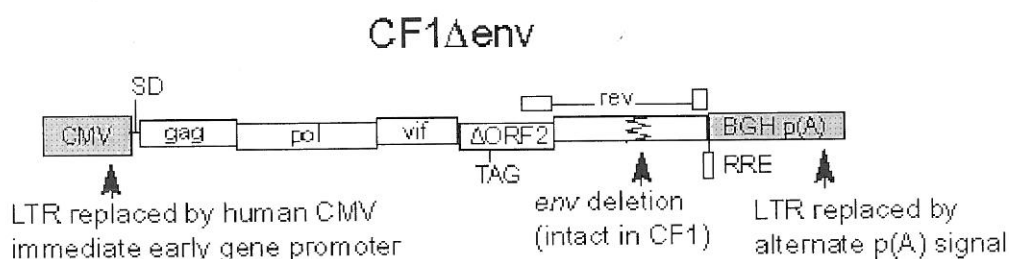


Figura 4: Esquema do plasmídeo de empacotamento CF1 $\Delta$ env (de Poeschla e cols., 1998a). SD=sítio doador de *splicing*; TAG=códon aberrante de terminação existente no gene *orf2* (também conhecido como *orfA*); CMV= promotor do citomegalovírus; BGH p(A)= sinal de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino.

O plasmídeo vetor utilizado nos experimentos de transferência gênica é chamado CTAGCB, e está ilustrado na figura 5. Nesse construto, a região U3 da LTR 5' (onde estão localizadas as seqüências promotoras e ativadoras da transcrição) foi substituída pelo promotor constitutivo CMV, de maneira a manter precisamente a distância entre o

*TATA Box* e os demais elementos da LTR. Assim, a transcrição nesse plasmídeo é regulada pelo promotor CMV fusionado com a LTR 5'. Essa modificação não altera as demais funções da LTR (como integração ou transcrição reversa), que são mantidas no promotor fusionado. As regiões não transcritas *downstream* a 5' LTR, bem como o gene *gag*, estão presentes nessa construção por estarem envolvidos no processo de encapsidação. Para evitar a produção das proteínas do capsídeo pelo plasmídeo vetor foi incluída uma mutação em *gag*, ocasionando alteração na fase de leitura da proteína e surgimento de um códon de terminação prematuro. Essa modificação evita a síntese de proteínas do capsídeo, mas não altera as funções de encapsidação do gene *gag*. O cassete de expressão gênico foi inserido em orientação inversa à dos demais elementos virais, e contém o gene *gfp* regulado por um promotor CMV e com um sinal de poliadenilação próprio para a expressão da proteína fluorescente. A região RRE, bem como a LTR 3', são mantidas intactas nessa construção, que não codifica nenhum gene viral, mas contém os elementos necessários nas etapas de encapsidação, transporte nuclear do RNA viral, transcrição reversa, integração e expressão do gene exógeno, com a utilização das proteínas produzidas em *trans* pelo plasmídeo de empacotamento em linhagens celulares adequadas.

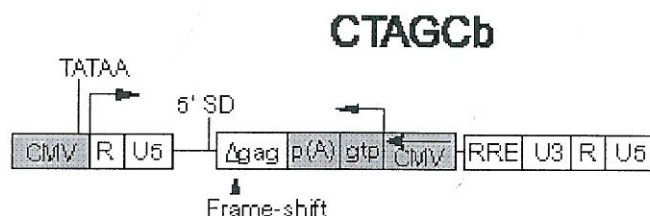


Figura 5: Esquema do plasmídeo vetor CTAGCB (de Poeschla e cols., 1998a). 5' SD=sítio doador de splicing; CMV= promotor do citomegalovírus; p(A)= sinal de poliadenilação; TATAA=*Tata Box*; gtp=gene da GFP.

O plasmídeo envelope utilizado é chamado de pHCMV-G, e comanda a expressão da glicoproteína G de envelope do Vírus da Estomatite Vesicular, cepa Indiana. A produção de VSV-G é regulada pela presença de um promotor CMV. Todos os plasmídeos utilizados nesse estudo foram amplificados em bactérias DH5- $\alpha$  por um procedimento padrão (Sambrook e cols., 1989) e purificados com a utilização de *Qiagen Plasmid Maxi-Prep Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

### *Produção do vetor viral*

A linhagem de empacotamento 293T foi cotransfectada com os três plasmídeos descritos acima pelo método da coprecipitação com fosfato de cálcio, de acordo com protocolo adaptado de Pear e colaboradores (1993). No dia anterior à transfecção, as células 293T sofreram repique e foram ressuspensas em uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL, em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. As células encontravam-se com uma confluência de 70-80% no momento da transfecção, e cuidados foram tomados para evitar o agrupamento excessivo dessas, condição que diminui a eficiência do experimento. Aproximadamente uma hora antes da transfecção, o meio de cultura das células foi substituído por 5 mL de meio DMEM fresco. Um coquetel de transfecção foi preparado, contendo 20 µg do plasmídeo vetor CTAGCB, 15 µg do plasmídeo empacotador CF1Δenv, e 15 µg do plasmídeo de envelope pHCMV-G, diluídos com água até um volume final de 219 µL. A seguir, adicionou-se lentamente 31 µL de solução de cloreto de cálcio 2 M. A solução assim preparada foi adicionada lentamente a 250 µL de tampão HBS 2x (pH 7,05), e a homogeneização se deu com o auxílio de uma pipeta Pasteur acoplada a um pipetador automático, de acordo com o método descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Após um repouso de 30 minutos a temperatura ambiente (tempo de formação do complexo), o coprecipitado de DNA-cálcio foi adicionado à garrafa de cultivo, sofrendo lenta agitação para garantir a distribuição regular do complexo por toda a cultura. As células assim transfectadas retornaram para a cultura nas condições já descritas, e 16-24 horas depois do procedimento de transfecção o meio de cultura foi substituído. O sobrenadante viral (contendo as partículas a serem utilizadas como vetor) foi recolhido diariamente, com a primeira coleta 48 horas após a transfecção, durante 3 ou 4 dias. Após a coleta, procedeu-se a centrifugação a 400 g ou filtração em membrana de 22 µm (Sigma), para eliminação de células de empacotamento contaminantes ou restos celulares. A seguir, o sobrenadante viral foi acondicionado em criotubos (Criogen, Várzea Paulista, SP, Brasil) e congelado rapidamente em nitrogênio líquido, onde foi mantido estocado. As células remanescentes após a última coleta do sobrenadante viral foram recuperadas e submetidas a análise da eficiência da transdução por citometria de fluxo, onde a presença da proteína GFP (produzida pelo cassete de expressão do plasmídeo vetor nas células empacotadoras) apresenta um indicativo da eficiência total de transfecção.

### *Transdução das células alvo*

O sobrenadante viral a ser utilizado foi rapidamente descongelado a 37° C, adicionando-se a ele uma solução de brometo de hexadimetrino (BH, Sigma), com obtenção de uma concentração final de 8 µg/mL dessa substância no meio viral. Esse composto policationico possui a função de minimizar a repulsão de cargas existente entre as proteínas de membrana das células-alvo e aquelas existentes no envelope viral, aumentando a capacidade de interação entre ambos os componentes e promovendo uma maior eficiência de transdução mediada pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática das células-alvo (Nolan e cols., 1993). A transdução foi realizada, para todos os alvos utilizados, em placa de cultura de 6 poços (TPP). Em experimentos de transdução de células aderentes (linhagem 293T e células do estroma hematopoético) foram adicionados à cultura 800 µL do sobrenadante viral, enquanto que as células não aderentes (linhagens hematopoéticas K562 e Jurkatt) foram, no procedimento de transdução, suspensas no mesmo volume de sobrenadante viral a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células por poço. A quantidade de sobrenadante utilizada foi suficiente apenas para cobrir o fundo da placa de cultura, já que volumes maiores minimizam o contato entre as partículas virais e as células, em função do movimento browniano e difusão das primeiras pelo líquido (Reading e cols., 2001). Os controles negativos utilizados na transdução foram o meio de cultura DMEM fresco e o sobrenadante de células 293T não transfectadas ou transfectadas na ausência do plasmídeo vetor (presença somente dos outros componentes do coquetel), todos contendo BH. Em ambos os casos, as células foram postas em contato com os vetores virais durante 4 ou 16 horas, sendo que após esse período foram adicionados 2 mL do meio de cultura adequado para cada tipo de cultivo. As células utilizadas nos ensaios controle das transduções foram obtidas da mesma garrafa de cultura ou extração (no caso do estroma) das amostras utilizadas no experimento, minimizando efeitos relacionados a diferenças nas condições de cultivo ou variação entre os animais submetidos à extração. A análise da eficiência da transdução e expressão da GFP (por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência) foi realizada após 48 horas, sendo repetida a cada 2 dias e, após 10 dias, semanalmente, durante todo o tempo de manutenção da cultura.

→ qual?

### *Estudo da viabilidade celular e toxicidade*

Para avaliação da toxicidade do tratamento e estudo da viabilidade celular das amostras da cultura transduzida e controle, foi realizado o ensaio de análise por marcação

do DNA com iodeto de propídeo (PI). Esse corante possui a propriedade de atravessar exclusivamente a membrana plasmática de células mortas (por necrose ou em estágios terminais de apoptose) e intercalar-se no DNA dessas, apresentando fluorescência quando da incidência de luz ultravioleta. Nesse ensaio, as células foram recuperadas por centrifugação a 400 g e uma quantidade total de  $10^5$  células foi ressuspensa em 5  $\mu$ L de uma solução 50  $\mu$ g/mL de PI (PharMingen, San Diego, CA, EUA). Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as amostras foram diluídas com PBS e submetidas a citometria de fluxo para quantificação da ocorrência de morte celular decorrente dos tratamentos ou das condições de cultura aplicadas.

#### *Análises por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência*

As análises para detecção da expressão de GFP e da presença do iodeto de propídeo foram realizadas de acordo com método adaptado de Teixeira e colaboradores (2001). Amostras das células transduzidas e controle foram centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato salino (PB), sendo a seguir analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com uma lâmpada de laser de argônio de 488 nm para excitação da proteína repórter e do PI, e com filtro de banda de 530/30 nm para monitoração das emissões fluorescentes. Para cada amostra, 10.000 eventos foram coletados, consistindo em análises de tamanho (FSC, *Forward Scatter*) e complexidade (SSC, *Side Scatter*) celulares. As emissões fluorescentes foram detectadas nos canais adequados, com utilização de FL-1 para amplificação do sinal emitido pela GFP e FL-2 para detecção da emissão do iodeto de propídeo. As avaliações quantitativas do número total de células modificadas, intensidade média de fluorescência e apresentação de dados estatísticos relevantes foram realizadas com o auxílio do software CellQuest 3.1f (Beckton Dickinson), utilizado na apresentação e análise dos dados obtidos por citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência são relativos, não sendo expressos em unidade definida, e a sensibilidade dos detectores é ajustada para os controles de cada alvo celular de maneira a possibilitar uma boa definição, permanecendo constante nas demais análises do mesmo tipo celular.

A análise por microscopia das células produtoras da proteína fluorescente foi realizada num microscópio Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) equipado com conjunto de filtros para detecção de sinal de FITC (FT: 510nm; BP: 450/490nm; LP: 520nm) ou com conjunto de filtros alternativo (FT: 460nm; BP: 395/440nm; LP: 470nm), em aumentos de 100, 200 e 400 vezes. Nas culturas de estroma, a lamínula que serve de

suporte para o crescimento celular foi retirada e aplicada sobre uma lâmina de microscopia, enquanto que nas demais linhagens as células foram depositadas sobre esta última e cobertas pela lamínula. As imagens foram obtidas utilizando o sistema de registro MC-3020 N/M (AVT-Horn, Aalen, Alemanha), com tempo de exposição automático e filme ASA 400.


#### *Titulação dos estoques virais*

Na quantificação do número de partículas infecciosas por mL de sobrenadante viral produzido por experimento de transfecção utilizou-se o método de diluição limitante sugerido por Rovozzo e Burke (1973). Nesse experimento, diversas culturas de células 293T foram preparadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de cultura de 6 poços (TPP) 24 horas antes da transdução. No dia do experimento, os estoques virais sofreram diluições seriais onde a proporção utilizada foi de 1:9 partes de estoque viral e meio DMEM fresco, respectivamente. Assim, as diluições foram realizadas até a concentração de  $10^{-7}$  partes do estoque original. Os sobrenadantes diluídos, bem como o estoque sem diluição, foram utilizados para transduzir as células 293T nas condições já descritas. A expressão de GFP nas culturas, analisada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, permitiu a determinação do título viral, expresso em unidades infecciosas (UI) por mL de sobrenadante, em células 293T.

#### *Ensaio de identificação de vírus auxiliares*

Como método de identificação do surgimento de vírus auxiliares por recombinação foi utilizado o ensaio de resgate do vetor. Nesse sistema, o sobrenadante da cultura de células geneticamente alteradas pelo vetor é rastreado, para verificar o surgimento de variantes virais capazes de replicação independente. No experimento, meio de cultivo retirado das culturas transduzidas 7 dias após a infecção viral é colocado em contato com uma cultura de células 293T não exposta previamente ao vetor, na presença de brometo de hexadimetrino em uma concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$  e com condições idênticas às utilizadas nos experimentos de transdução. A presença de vírus recombinantes nesse sobrenadante (oriundos de eventos de recombinação nas células empacotadoras) é identificada 7 dias depois pela expressão da GFP nas células utilizadas nos ensaios de resgate, com visualização da proteína repórter por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

### *Segurança*

A pesquisa em vetores de transferência gênica baseados em lentivírus exige grande atenção no tocante à segurança desses sistemas, visto que grande parte dos representantes desta família são potencialmente patogênicos ao homem. Para experimentos envolvendo vetores baseados no FIV, exigem-se equipamentos e instalações com nível II de biossegurança. O Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, local onde foram realizados os experimentos, possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança (0060/98, DOU de 27/09/1999). O laboratório foi ainda modificado para cumprir as exigências de segurança deste nível, com adequação de instalações e procedimentos para cumprimento das normas indicadas pela literatura internacional especializada (CDC, 1999). Além disso, todos os protocolos exigidos para manutenção deste nível de biossegurança foram plenamente observados no decorrer do trabalho. Cuidados especiais foram tomados no descarte, limpeza e desinfecção de equipamentos e descartáveis, com cuidados com potenciais fontes de contaminação. Uma sala de manipulação exclusiva pra manipulação viral foi utilizada, contendo equipamentos de segurança como sistema de descarte fechado VacuGene Pump  (Pharmacia LKB, Peapack, NJ, EUA) e cabina de fluxo laminar tipo 2 (Trox do Brasil LTDA, Curitiba, PR, Brasil).

## RESULTADOS

### *Produção do vetor lentiviral*

Os vetores virais foram preparados através de transfecção transiente de células empacotadoras 293T. Essa é uma linhagem endotelial de rim embrionário humano, imortalizada com a proteína E1 de adenovírus. Além disso, essas células expressam também o grande antígeno T do vírus SV40. A 293T foi escolhida como linhagem empacotadora por possuir certas características vantajosas na preparação de vetores virais. Em primeiro lugar, a alta eficiência de transfecção pelo método do fosfato de cálcio nessas células permite a sua utilização em experimentos de transfecção transiente (Pear e cols., 1993), possibilitando a obtenção de títulos virais mais elevados. Além disso, a presença do grande antígeno T expresso nessas células pode ser responsável pelo aumento na replicação dos vetores plasmidiais que contenham a origem de replicação do SV40, que é o caso de todos os plasmídeos utilizados neste experimento. O promotor CMV utilizado como elemento regulador da expressão em todas as construções possui uma atividade bastante aumentada na linhagem 293T, devido principalmente a interações com a proteína E1 adenoviral expressa nessas células, o que propicia ao CMV uma capacidade de ativação da transcrição superior nessa linhagem celular, possibilitando a obtenção de títulos elevados com esse sistema (Gorman e cols., 1989; Soneoka e cols., 1995).

O sistema de cotransfecção de 3 plasmídeos foi utilizado por possuir maiores características de segurança. A cotransfecção dos plasmídeos empacotador CF1 $\Delta$ env, plasmídeo envelope pHCMV-G e plasmídeo vetor CTAGCB foi efetuada pelo método de coprecipitação com fosfato de cálcio. Entre os diversos estoques virais produzidos, a eficiência de transfecção da linhagem empacotadora apresentou variações entre 0 e 72% do total de células eficientemente transfectado, e essas diferenças entre os ensaios podem estar relacionados a pequenas alterações nas condições de cultura no momento da transfecção (confluência, número de passagens, etc) ou de variações no preparo do coquetel de transfecção (tempo de formação do precipitado de DNA-cálcio, velocidade na mistura das soluções, etc). A quantidade de DNA utilizada na transfecção também foi um fator determinante; várias concentrações foram testadas, que variavam de 10  $\mu$ g até 50  $\mu$ g de cada plasmídeo. Concentrações elevadas de DNA levaram a uma diminuição na capacidade de proliferação das células transfectadas, ocasionando um aumento no tempo total requerido pelas células 293T para atingir a confluência. As condições ideais estabelecidas foram utilizadas na maioria dos experimentos e estão descritas na seção



anterior. A eficiência do método foi medida por citometria de fluxo, com a detecção da proteína GFP nas células empacotadoras transfectadas. A proteína fluorescente foi expressa a partir do cassete de expressão contido no plasmídeo vetor CTAGCB, e a quantidade de células produtoras de GFP permitiu a estimativa do número total de células onde o método de transfecção foi bem sucedido. A figura 6 mostra uma análise representativa, onde a eficiência de transfecção foi de aproximadamente 50%.

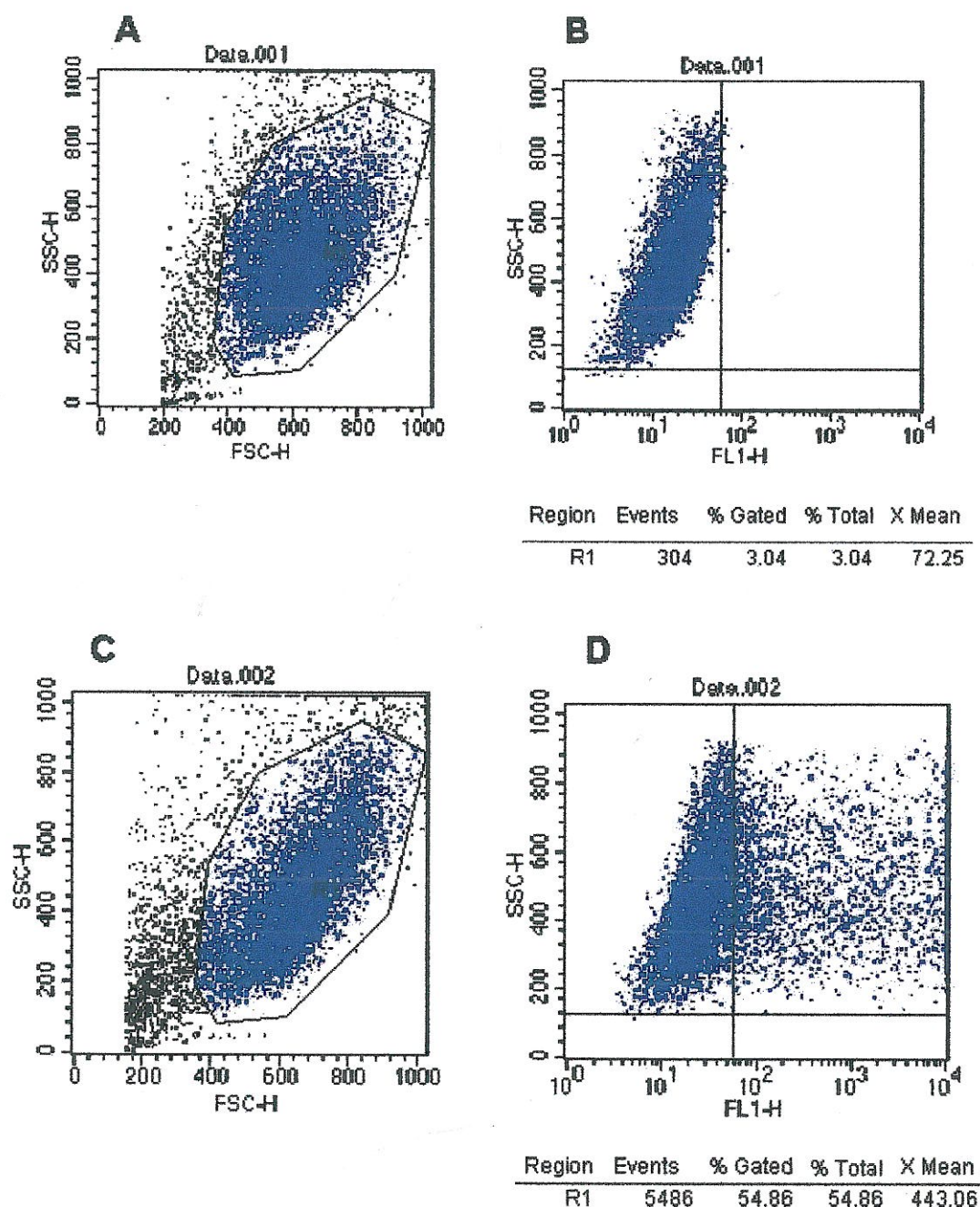


Figura 6: Análise por citometria de fluxo de linhagem 293T normal (A e B) e transfectada (C e D). Os gráficos A e C são construídos em função do tamanho (FSC-H) e da complexidade (SSC-H) celulares. B e D apresentam a intensidade de fluorescência (FL-1)

em função da complexidade celular (SSC-H). Os quadros em B e D mostram uma análise quantitativa dos eventos pertencentes à região R1 (células em azul), definidos como células cuja fluorescência é superior àquela apresentada pelo controle (gráfico B), possivelmente devido à expressão de GFP. Todas as análises de citometria de fluxo deste trabalho são representadas com imagens obtidas com auxílio do Software CellQuest 3.1f, de acordo com apresentação padrão do programa. Os valores de interesse na análise são a intensidade de fluorescência média (*X Mean*), e a estimativa do número de células da região R1 cuja fluorescência ultrapassou o limiar considerado normal para essa linhagem em números absolutos (*Events*) e percentuais (*%Gated*).

Na figura 6A temos uma representação das células 293T controle, em um gráfico onde está indicado o tamanho celular relativo (FSC) em função da complexidade celular relativa (SSC). Na figura 6B, temos a indicação da intensidade de fluorescência (FL1) no eixo das abcissas. Ambas representam a análise de uma amostra de células da linhagem 293T não transfectada, indicando as características celulares normais e a intensidade padrão de fluorescência. O gráfico 6A apresenta também a delimitação de uma região (denominada R1, identificada pela cor azul dos pontos no gráfico), onde a presença de um evento particular deve ser interpretada como a ocorrência de uma estrutura celular com características morfológicas correspondente àquelas normalmente encontrada nas células da linhagem 293T. Na tabela 6B, a intensidade média de fluorescência encontrada foi considerada padrão para essa linhagem. Quando examinadas as figuras 6C e 6D, que expressam os dados obtidos em uma amostra da mesma linhagem celular após cotransfecção pelos 3 plasmídeos citados, observa-se pouca alteração das características celulares de tamanho e complexidade celular em relação à 6A, embora o aumento da ocorrência de eventos pertencentes à região R1 com deslocamento para valores superiores de fluorescência exibida na figura 6D seja evidência da expressão da GFP em células que foram eficazmente transfectadas. A intensidade média de fluorescência (*X Mean*, representada nas tabelas das respectivas figuras) é superior na cultura submetida à introdução dos plasmídeos, quando comparada com a amostra controle (443 contra 72 unidades, respectivamente), possivelmente devido à presença da proteína repórter fluorescente em uma fração das células examinadas. Em uma análise quantitativa, vemos que nesse experimento o número de células na região R1 foi de 54,8% do total, o que caracteriza um total de células transfectadas pelo plasmídeo CTAGCB de aproximadamente 50%. Assim, a análise por citometria de fluxo permite a estimativa rápida e simples da eficiência total de transfecção, de maneira indireta através da avaliação da produção de proteína fluorescente GFP nas culturas transfectadas, e fornece

um indicativo do número de células produtoras dos vetores virais naquele ensaio específico.

Na preparação de estoques virais onde a eficiência de transfecção foi reduzida (menor que 20%), não foi possível observar a produção de partículas infecciosas nos ensaios de transdução. Esse dado vai ao encontro de citações na literatura que associam a quantidade de partículas infecciosas produzidas a fatores diversos, entre eles a eficiência de transfecção obtida na produção de vetores virais pelo método de cotransfecção transiente (Soneoka e cols., 1995).

A coleta do sobrenadante contendo as partículas virais foi realizada durante 3 ou 4 dias após o procedimento de transfecção. Após esse período observou-se uma diminuição no número de células da linhagem 293T em cultura, devida principalmente ao desprendimento do tapete celular e excessiva morte de células. Esse efeito provavelmente deve-se à toxicidade elevada da proteína VSV-G, que possui propriedades fusogênicas e é capaz de induzir a ocorrência de efeito citopático em culturas de células humanas. A expressão dessa proteína de envelope foi, provavelmente, o fator determinante na morte significativa das células empacotadoras após o experimento de transfecção, e a dificuldade do estabelecimento de linhagens celulares que expressem VSV-G de forma constitutiva é, pela toxicidade da proteína, um dos motivos que aumenta a importância de procedimentos de produção de vetores virais por transfecção transiente (Chen e cols., 1996; Ory e cols., 1996).

A quantificação do título viral foi feita através de diluição limitante do vírus, e transdução de células da linhagem 293T com os estoques diluídos. Entretanto, a dificuldade na avaliação dos dados obtidos por citometria de fluxo não permitiu a determinação exata dos títulos resultantes de cada experimento de transfecção. A quantificação foi impossibilitada, principalmente, pela dificuldade na identificação inequívoca das células que expressam a GFP quando essas se encontram em pequeno número, o que ocorre em experimentos de transdução com estoques diluídos. Para superar essa limitação, 3 estoques foram analisados por microscopia de fluorescência de células expostas ao vetor em diluições sucessivas não superiores a  $10^{-4}$ . Em duas dessas preparações foi possível a visualização de células que apresentavam a expressão de GFP mesmo nas maiores diluições testadas, mostrando que o título de pelo menos dois estoques virais foi superior a  $10^4$  partículas infecciosas/mL. No terceiro estoque não foi possível a detecção de aumento na fluorescência celular.

⊙ N. Viro, Hebe

### *Transferência gênica de células mediada por vetores virais baseados no FIV*

A habilidade de infecção de diversos tipos celulares *in vitro*, bem como a capacidade de introdução de genes exógenos e expressão dos produtos desses transgenes nas culturas geneticamente alteradas foi avaliada com a utilização de vetores lentivirais baseados no FIV. Exceto quando indicado, a técnica de microscopia de fluorescência foi realizada utilizando o conjunto de filtros padrão de FITC. As multiplicidades de infecção (MOI, referente à razão entre o número de partículas infecciosas e a quantidade de células alvo presente no ensaio) utilizadas em cada experimento não foram indicadas devido à impossibilidade de determinação do título viral. No entanto, com base nos dados obtidos com a titulação (que indicam a produção de vetores com títulos não inferiores a  $10^4$  UI/mL) e a partir de informações bibliográficas (que indicam que a maioria dos experimentos de produção de vetores lentivirais baseados no FIV por transfecção transiente produz vetores com um título superior a  $10^6$  UI/mL), temos indícios para acreditar que a multiplicidade de infecção usada nesses experimentos não foi inferior a 0,1 (Poeschla e cols., 1998a; Johnston, 1999). As amostras controle citadas nessa seção referem-se a células não expostas ao vírus, onde o sobrenadante viral foi substituído por meio de cultura DMEM fresco contendo 8  $\mu$ g/mL de brometo de hexadimetrino. Os dados referentes aos demais controles citados na seção Material e Métodos (sobrenadante de células 293T não transfectada ou transfectada sem a presença do plasmídeo vetor CTAGCB) não diferem significativamente dos apresentados a seguir. Não foram igualmente observadas diferenças no tempo de exposição das células alvo ao vetor, sendo a eficiência de transdução similar com 4 ou 16 horas de contato entre a cultura e o vírus. Os dados serão descritos a seguir, para as diferentes linhagens celulares analisadas.

### *Transdução de células 293T e expressão da proteína GFP*

As células 293T foram utilizadas nos procedimentos de titulação viral, e a transdução dessa linhagem foi realizada com o objetivo de analisar a presença de vetores virais infecciosos nas diferentes preparações virais produzidas, através da transferência produtiva do gene da GFP. Assim, cada estoque viral pode ser avaliado quanto à presença de vetores virais funcionais, e a eficiente transferência gênica para células dessa linhagem permitiu a confirmação da produção de partículas virais infecciosas pelas culturas empacotadoras. Na transdução de 293T, a visualização da expressão da GFP foi efetuada 48 horas após o procedimento de infecção pelo vetor. A figura 7 apresenta as imagens relativas à análise por microscopia de contraste de fase e por microscopia de fluorescência

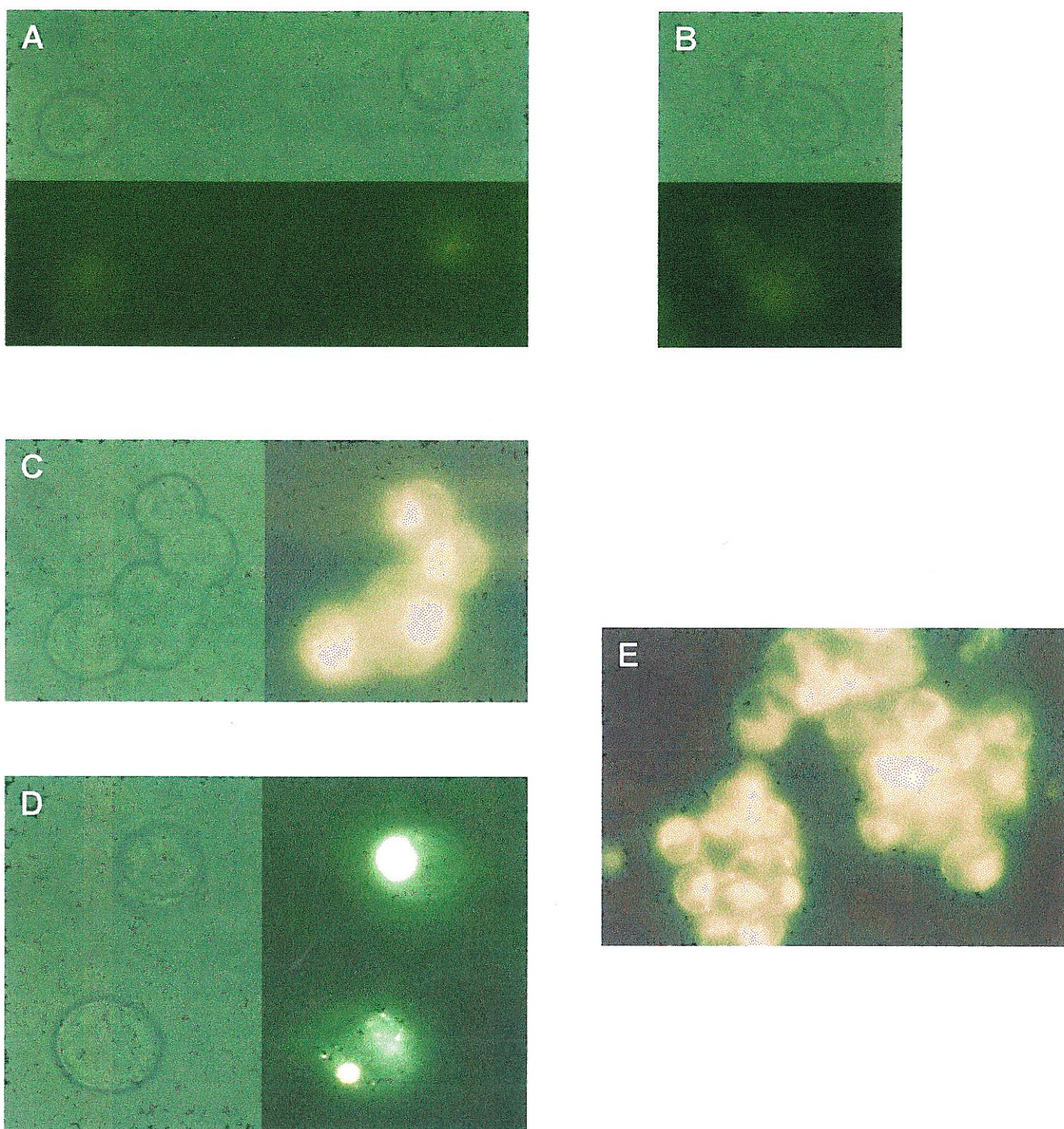


Figura 7: Imagens de microscopia de contraste de fase (metade superior ou esquerda) e microscopia de fluorescência (metade inferior ou direita) com utilização dos filtros padrão (A, B, C e E) e filtros alternativos (D) das células 293T. As imagens A e B representam amostras controle não transduzidas, enquanto as demais correspondem às culturas expostas ao vetor. Todas as gravuras apresentam os mesmos campos analisados pelas duas técnicas de microscopia utilizadas, exceto E, que mostra unicamente a microscopia de fluorescência. As fotos são apresentadas em um aumento de 400x, com exceção de E, cuja magnitude original é ampliada 200x.

de células da linhagem 293T, que evidenciam estruturas celulares com um nível de fluorescência basal reduzido ou nulo, nas amostras controle (7A e 7B). A ocorrência de corpos esféricos nucleares apresentando um nível de fluorescência levemente superior é visível, e consiste presumivelmente no nucléolo. Quando comparadas com as culturas transduzidas (apresentadas em 7C, 7D e 7E), as últimas apresentam um nível de fluorescência muito superior às amostras controle, evidenciando a expressão da proteína fluorescente nas células expostas ao vetor. Não foi possível observar alterações nas demais características celulares, como verificado pela microscopia de contraste de fase. A distribuição da proteína GFP foi visualizada no núcleo e no citoplasma, embora análises realizadas com o conjunto alternativo de filtros de detecção (7E) permitam a observação de uma concentração da proteína GFP em regiões no núcleo ou próximo a ele, bem como em estruturas celulares com formato granular. Nas células controle, mesmo a utilização dos filtros alternativos não foi suficiente para a visualização de áreas com elevada fluorescência (dados não mostrados), sugerindo que o aumento dessa é devido à produção da proteína repórter codificada nas células transformadas pela transdução viral.

#### *Transdução de linhagens hematopoéticas K562 e Daudi*

No estabelecimento de modelos para transferência gênica mediada pelo FIV para células hematopoéticas, as linhagens K562 e Daudi foram utilizadas para avaliar a possibilidade de emprego de vetores de primeira geração baseados no FIV na modificação genética de alvos celulares com origem no sangue. Dessa forma, a transdução dessas duas linhagens (uma de origem mielóide e a outra linfóide) permite coletar dados referentes às características desse sistema como eficiência de transformação, nível de produção da proteína exógena e manutenção da expressão do transgene.

A transdução estável de ambas linhagens hematopoéticas foi observada 4 dias após exposição das culturas aos vetores lentivirais, identificada pelo aumento na intensidade média de fluorescência das células que receberam o vírus. Ao contrário da linhagem 293T, onde a expressão da GFP pode ser detectada 48 horas após a transferência, as linhagens hematopoéticas apresentaram um retardo na produção de quantidades significativas da proteína repórter, podendo ser detectadas somente 4 dias após a exposição ao vetor. Os dados de citometria de fluxo apresentados nas figuras 8 e 9 referem-se a uma análise representativa de células K562 controle e transduzida, 4 dias após a transdução viral.

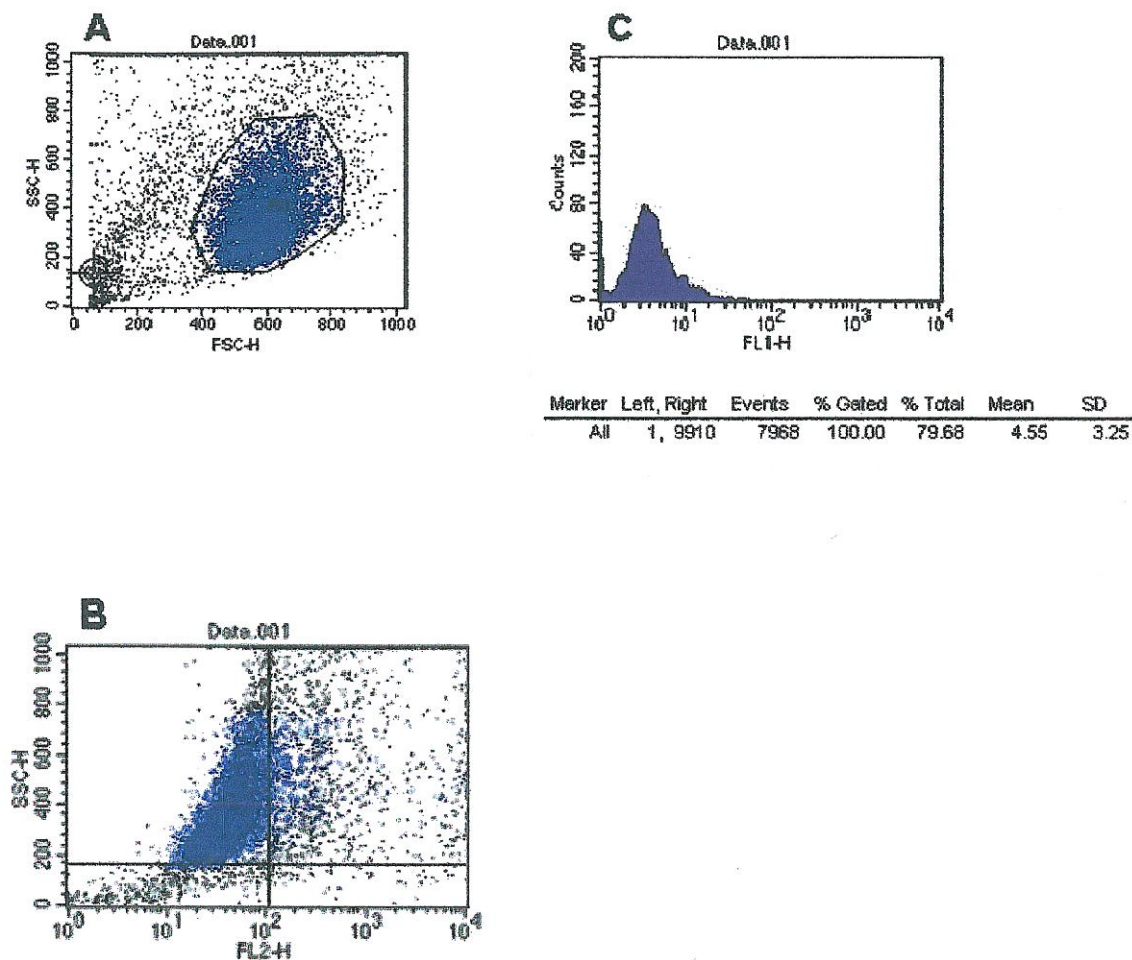


Figura 8: Análise por citometria de fluxo de linhagem hematopoética K562 normal, utilizada como controle da transdução. O gráfico A é construído em função do tamanho (FSC-H) e da complexidade (SSC-H) celulares, e mostra a delimitação da região R1 (células em azul) que representa as células viáveis conforme visualizado pela marcação com PI e leitura da fluorescência no canal FL-2 (gráfico B). C apresenta a distribuição dos eventos pertencentes a R1 quanto à intensidade basal de fluorescência (FL-1). A análise quantitativa está especificada no quadro em 8C. Os valores de interesse na análise são a intensidade de fluorescência média (*Mean*), o desvio padrão dessa medida (*SD*) e o número de eventos contidos em R1, em valores absolutos (*Events*) e percentuais (*%Total*).

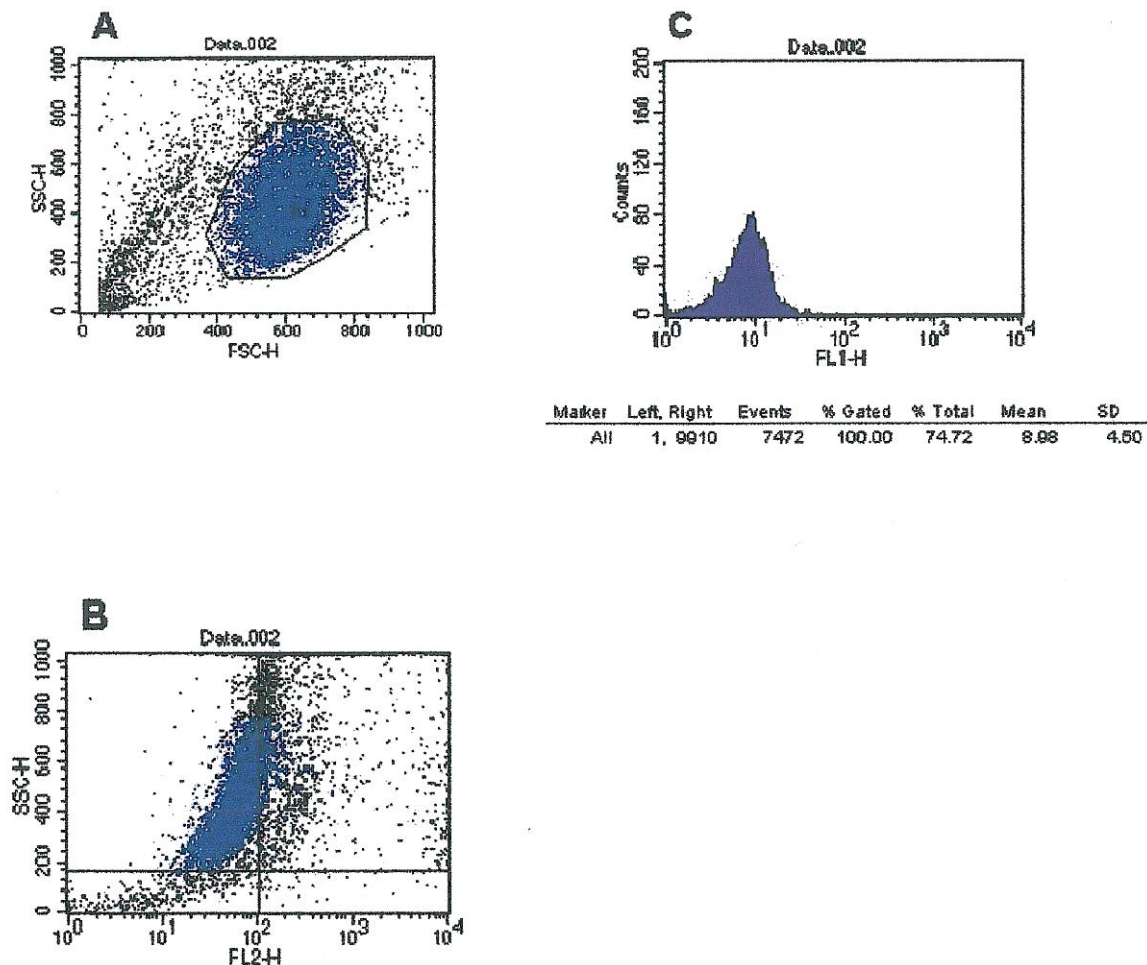


Figura 9: Análise por citometria de fluxo de linhagem hematopoética K562 transduzida pelos vetores lentivirais. O gráfico A é construído em função do tamanho (FSC-H) e da complexidade (SSC-H) celulares, e mostra a delimitação da região R1 (células em azul) que representa as células viáveis conforme visualizado pela marcação com PI e leitura da fluorescência no canal FL-2 (gráfico B). C apresenta a distribuição dos eventos pertencentes a R1 quanto à intensidade de fluorescência (FL-1), possivelmente relacionada à presença da GFP. A análise quantitativa está especificada no quadro em 9C. Os valores de interesse na análise são a intensidade de fluorescência média (*Mean*), o desvio padrão dessa medida (*SD*) e o número de eventos contidos em R1, em valores absolutos (*Events*) e percentuais (*%Total*).



Na figura 8A observa-se uma população bem delimitada de células, com distribuição regular e características semelhantes, geralmente encontradas em análises de citometria de fluxo de linhagens celulares contendo um único tipo celular. As células distribuídas na nuvem principal de eventos foram consideradas células normais da linhagem K562 e marcadas como integrantes da região R1 (em azul). A figura 8C mostra a intensidade de fluorescência como função do número de células registrado para cada valor particular dos eventos pertencentes unicamente a R1. De acordo com o quadro apresentado, observa-se que a intensidade média de fluorescência dessa população controle foi de 4,55 com desvio padrão de 3,25. A figura 8B apresenta informações referentes à fluorescência induzida pela presença do iodeto de propídeo em células mortas. Os valores encontrados em 8B foram considerados padrão para uma cultura não transduzida, servindo de parâmetro para comparação com as culturas expostas ao vírus. É possível descrever uma correlação razoavelmente elevada entre a viabilidade celular (figura 8B) e a caracterização morfológica (figura 8A), mostrando que frações elevadas dos eventos que compõe a região R1 podem ser caracterizadas como células vivas.

A figura 9 apresenta análise similar realizada com uma cultura da linhagem K562 transduzida com vetores lentivirais, 4 dias após o procedimento de transferência gênica. É possível observar um aumento claro na intensidade de fluorescência das células transduzidas, através de análise da figura 9C, onde o deslocamento da curva na direção de valores aumentados de FL-1 é um indício da presença da proteína GFP expressa nessas células. A média de fluorescência das células pertencentes a R1 apresenta valor de 8,98, equivalente ao dobro do registrado na amostra controle. A pequena variação da fluorescência média fornece indícios da quantidade de expressão da proteína repórter, que parece ter sido baixa nessas células. A quantidade de GFP expressa nessas células permaneceu constante (valores entre 1,8 e 2,4 vezes superiores aos encontrados nos controles) durante todo o tempo de manutenção das culturas, que atingiu períodos de até 48 dias. O deslocamento da curva como um todo sugere que a eficiência do procedimento atingiu valores próximos a 100%, com transdução de praticamente todas as células em cultura. Valores elevados de eficiência puderam ser verificados em quase todos os experimentos testados, embora alguns estoques produzidos possuísem uma redução nessa capacidade, provavelmente devido ao título viral inferior. Análises por citometria de fluxo das culturas tratadas com o vírus apresentaram valores de intensidade de fluorescência e eficiência de transdução com poucas variações no decorrer da expansão e manutenção das culturas, nos períodos analisados (chegando a atingir 48 dias). Na figura 9B observa-se

que a toxicidade referente ao processo é negligenciável, no período de 4 dias após a transdução. Entretanto, culturas com tempo de manutenção elevado (mais de 3 semanas) apresentaram ocorrência superior de morte celular, que atingiu valores de até 50% dos eventos pertencentes a R1 (dados não mostrados). Também é digno de nota o fato de não haver alterações significativas nas características morfológicas de tamanho e complexidade celular entre culturas transduzidas em relação aos controles, conforme observado na comparação entre as gravuras 8A e 9A.

Resultados bastante semelhantes foram registrados na transdução da linhagem celular Daudi, que apresentou valores de eficiência de transdução, nível de expressão do transgene e manutenção da produção da proteína semelhantes aos da linhagem K562. A figura 10 apresenta os dados de citometria de fluxo referentes à linhagem Daudi não expostas aos vetores virais. Em uma variação da análise realizada para a linhagem K562, na linhagem Daudi o parâmetro utilizado na classificação das células foi a viabilidade celular, conforme observado na figura 10B. As células com baixos níveis de fluorescência induzida pelo iodeto de propídeo foram consideradas vivas e classificadas como a fração de células pertencente à R1. As análises de intensidade de fluorescência, tanto para as culturas controle quanto para as tratadas com vírus, incluem somente as células pertencentes a essa fração. Observa-se que, mesmo com essa variação na análise, a correlação entre células vivas (R1, em azul) e aquelas que compõem a nuvem principal de eventos da figura 10A é elevada, mostrando que as células com características morfológicas (tamanho e complexidade celular) bem definidas são, em sua maioria, células viáveis.

O exame da figura 11, que consiste de uma análise por citometria de fluxo de uma amostra da linhagem Daudi transduzida com os vetores descritos nesse trabalho, permite verificar um aumento da intensidade média de fluorescência (visualizada na comparação entre as figuras 10C e 11C). De acordo com os valores descritos nos quadros dessas figuras, podemos identificar um aumento de 2x no nível da fluorescência ( $15,86 \pm 12,65$ , contra  $31,88 \pm 19,29$ , respectivamente) do experimento em relação ao controle, similar ao descrito para a linhagem K562.

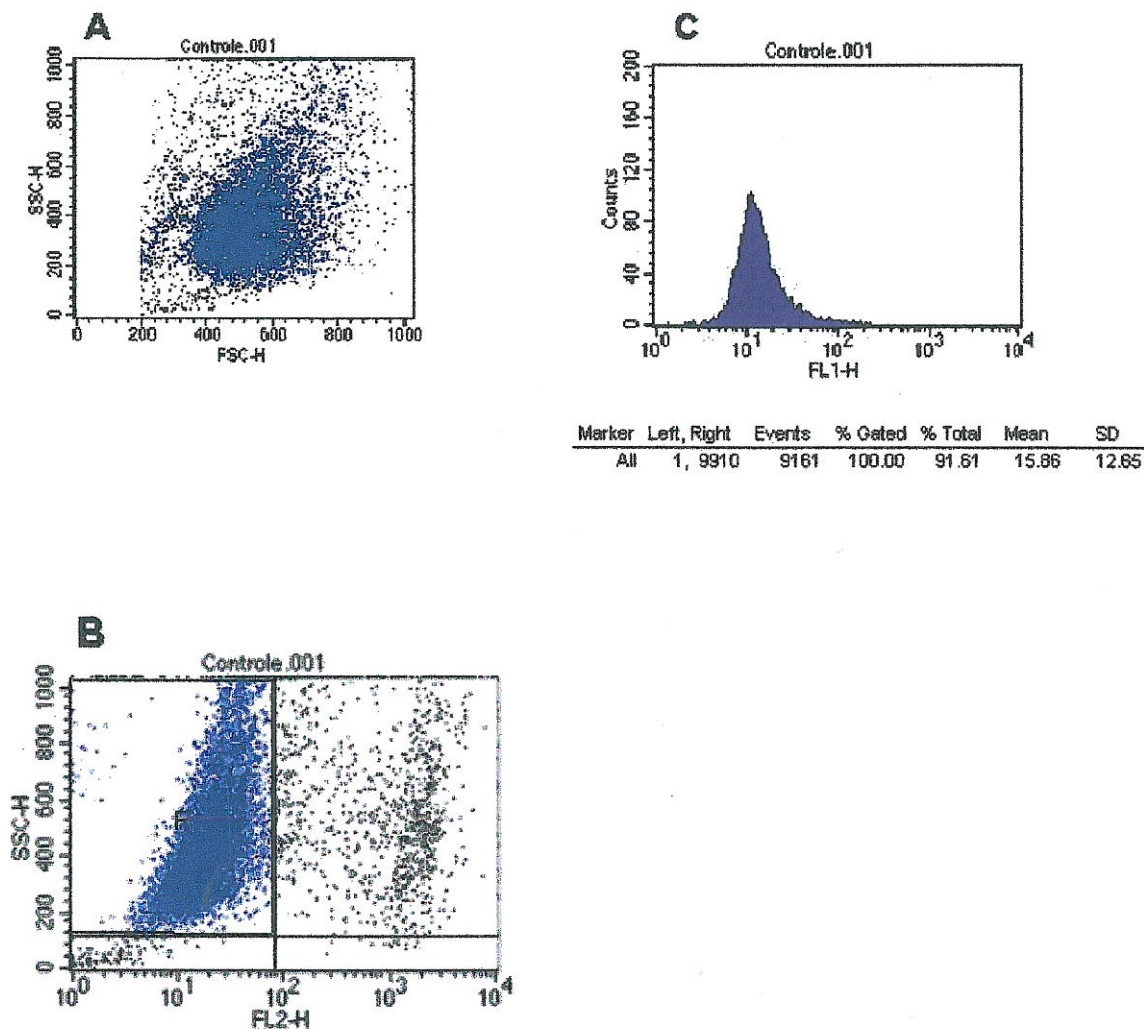


Figura 10: Análise por citometria de fluxo de linhagem hematopoética Daudi normal, utilizada como controle da transdução. O gráfico A é construído em função do tamanho (FSC-H) e da complexidade (SSC-H) celulares. C apresenta a distribuição dos eventos pertencentes a R1 quanto à intensidade basal de fluorescência (FL-1), representando as células viáveis. A análise quantitativa está especificada no quadro em 10C. Os valores de interesse na análise são a intensidade de fluorescência média (*Mean*), o desvio padrão dessa medida (*SD*) e o número de eventos contidos em R1, em valores absolutos (*Events*) e percentuais (*%Total*). B mostra a viabilidade celular e a delimitação da região R1, conforme visualizado pela marcação com PI e leitura da fluorescência no canal FL-2.

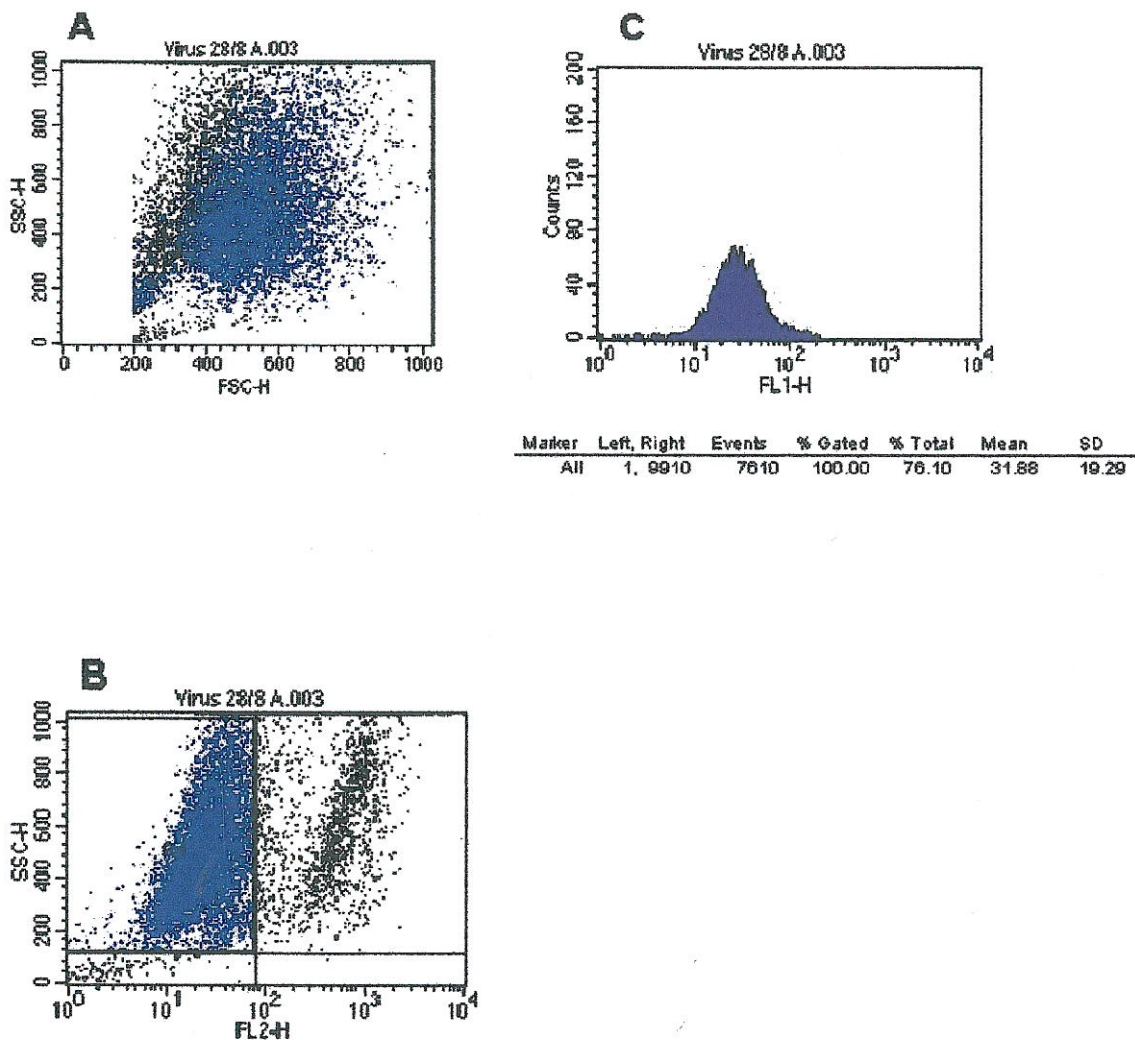


Figura 11: Análise por citometria de fluxo de linhagem hematopoética Daudi transduzida pelos vetores lentivirais. O gráfico A é construído em função do tamanho (FSC-H) e da complexidade (SSC-H) celulares. B mostra a viabilidade celular e a delimitação da região R1, conforme visualizado pela marcação com PI e leitura da fluorescência no canal FL-2. C apresenta a distribuição dos eventos pertencentes a R1 quanto à intensidade de fluorescência (FL-1), cujo aumento pode ser reflexo da presença de GFP. A análise quantitativa está especificada no quadro em 10C. Os valores de interesse na análise são a intensidade de fluorescência média (*Mean*), o desvio padrão dessa medida (*SD*) e o número de eventos contidos em R1, em valores absolutos (*Events*) e percentuais (*%Total*).

Comparando as figuras 10 e 11 é possível, igualmente, sugerir que a eficiência de transdução foi elevada, indicando habilidade dos vetores baseados no FIV de infecção de linhagens hematopoéticas de origem tanto linfóide quanto mielóide. Alteração genética de células mielóides com esse mesmo sistema já foi previamente comprovada, pois Poeschla e colaboradores (1998a) já haviam eficientemente transduzido culturas primárias de macrófagos, corroborando os dados descritos nesse trabalho. O tratamento da linhagem Daudi com o vírus mostrou uma toxicidade elevada, quando comparada com células não tratadas, mesmo após 4 dias, conforme visualizado na figura 11B. Entretanto, em culturas de longo prazo (até 30 dias), o nível de morte celular manteve-se estável, não ultrapassando 30% do total de células.

Esses resultados sugerem que vetores lentivirais baseados no FIV podem infectar células hematopoéticas das linhagens K562 e Daudi *in vitro* de maneira estável e com elevada eficiência, embora a expressão do transgene seja reduzida e alguma toxicidade celular possa ser registrada em culturas de longo prazo. De acordo com o observado, os níveis de expressão da proteína GFP foram reduzidos, ocasionando um aumento reduzido (de apenas duas vezes) na fluorescência total da célula. Devido à pequena alteração encontrada, as células transduzidas e controle não puderam ser claramente diferenciadas por microscopia de fluorescência, mesmo com o baixo nível basal de fluorescência apresentado pelas linhagens. Da mesma forma, a transdução viral não acarretou alterações morfológicas identificáveis, conforme visualizado em microscopia de contraste de fase.

#### *Transdução de cultura primária de estroma de medula óssea de camundongo*

Experimentos visando a modificação genética das células do estroma de medula óssea foram realizados de maneira similar às demais linhagens celulares já testadas. Os gráficos obtidos por citometria de fluxo são mostrados na figura 12 (estroma controle não transduzido e cultura oriunda de uma mesma extração exposta ao vírus). Nessa figuras, os eventos considerados na análise (região R1, em azul) correspondem a células vivas, conforme dados obtidos utilizando marcação com iodeto de propídeo (detectadas no canal FL-2 de fluorescência, dados não mostrados). A viabilidade celular foi escolhida como parâmetro de delimitação da população celular analisada pois as características morfológicas são bastante diversas entre os diferentes tipos celulares existentes nas culturas de estroma (células de linhagem hematopoética, endotelial e mesenquimal). A análise apresentada na figura 12 é representativa para os diferentes experimentos realizados, e foi executada 4 dias após a transdução viral.

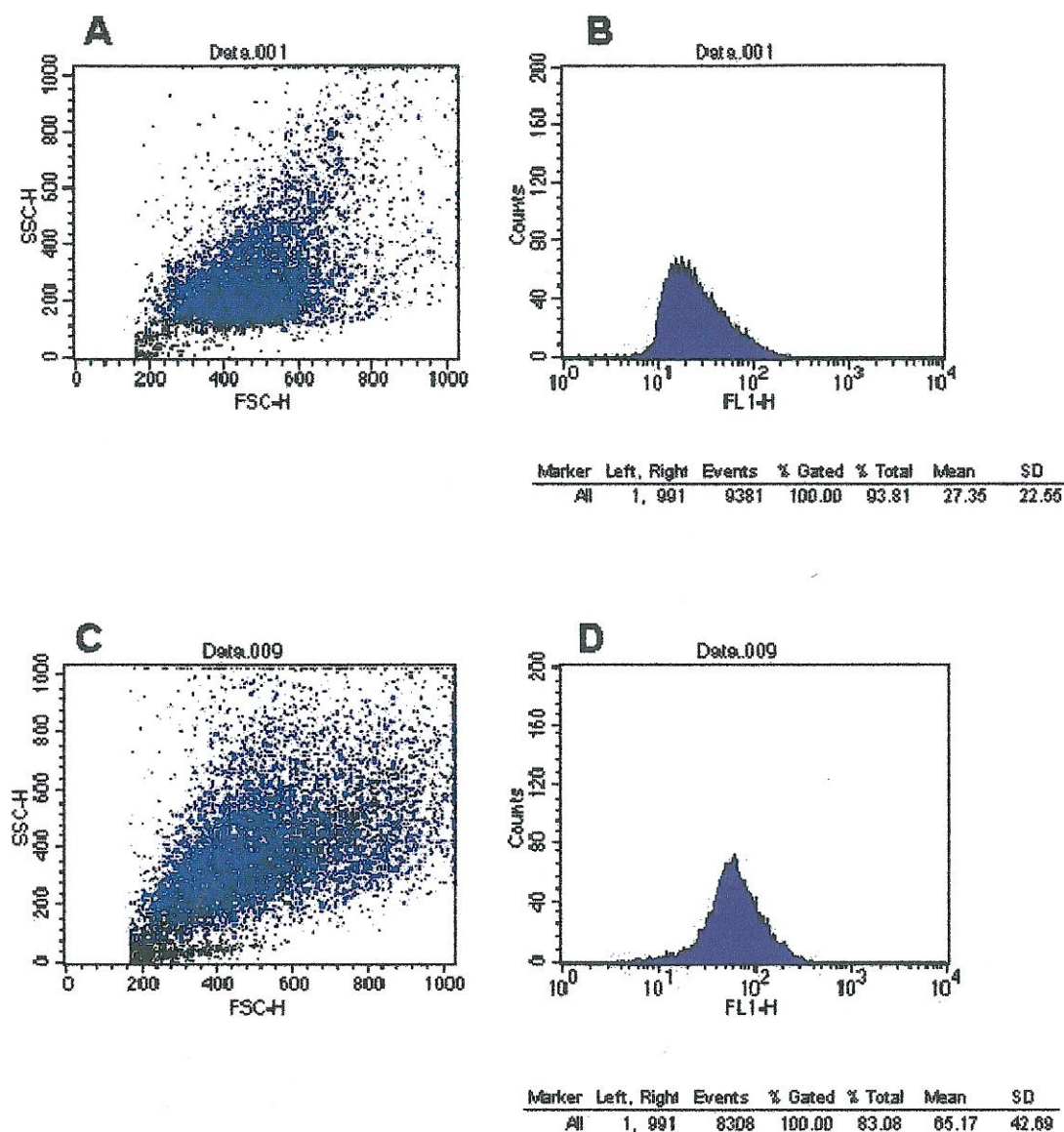


Figura 12 Análise por citometria de fluxo de culturas de estroma normal (A e B) e transduzida por vetores lentivirais (C e D). Os gráficos A e C são construídos em função do tamanho (FSC-H) e da complexidade (SSC-H) celulares. B e D apresentam a distribuição dos eventos pertencentes a R1 (células azuis) quanto à intensidade basal de fluorescência (FL-1). As análises quantitativas estão especificadas nos quadros em 12B e 12D. Os valores de interesse na análise são a intensidade de fluorescência média (*Mean*), o desvio padrão dessa medida (*SD*) e o número de eventos contidos em R1, em valores absolutos (*Events*) e percentuais (*%Total*). R1 foi delimitado em função da viabilidade celular detectada pelo ensaio de marcação com iodeto de propídeo (gráficos não mostrados), incluindo a população de células vivas na amostra.

Foi verificado em culturas de estroma um comportamento similar ao encontrado para as demais linhagens, na maior parte dos parâmetros considerados. A intensidade média de fluorescência das culturas transduzidas apresentou valores cerca de duas vezes superiores (variando entre 1,9 até 2,6 vezes maiores) aos encontrados nos controles. Entretanto, é digno de nota que nas culturas de estroma a fluorescência dos controles expostos ao sobrenadante de células 293T não transfectadas (portanto sem vetor viral) é cerca de 0,5 vezes superior àquela encontrada nos controles onde foram colocados apenas meio DMEM contendo brometo de hexadimetrino. Os gráficos representando a intensidade de fluorescência detectada no canal FL-2 onde são lidos os valores de viabilidade celular com a utilização do PI não foram apresentados por não mostrarem diferenças significativas entre si, não existindo indícios para afirmar que as culturas de estroma transduzidas apresentassem incidência de morte celular superior àquela encontrada nos controles, mesmo nas culturas de longo prazo. A expressão da proteína GFP pôde ser detectada mesmo 48 horas após a transferência gênica, embora os níveis de expressão tenham se elevado até o 4º dia, quando foi atingido um platô mantido durante o tempo total de duração das culturas (de até 40 dias). Observou-se também que uma grande parte das células apresentou um deslocamento no gráfico de detecção de FL-1, indicando que a eficiência de transferência gênica para células do estroma de medula foi igualmente elevada.

Quando analisadas por microscopia de contraste de fase, não foram encontradas diferenças entre as culturas expostas aos vetores e as controle (figura 13). Essa diferença não foi encontrada mesmo com a visualização das culturas realizada no suporte físico onde ocorreu a expansão celular, já que as análises foram realizadas com células ainda aderidas às lamínulas sobre as quais a cultura desenvolveu-se. Assim, o registro das imagens pode ser efetivado preservando muitas das propriedades morfológicas dos diferentes tipos celulares, minimizando os efeitos da manipulação excessiva das células na sua caracterização. Ao contrário do encontrado nas culturas de linhagens, onde os tipos celulares eram bem característicos, foi visualizada uma diversidade muito grande na morfologia das células, referentes a tamanho, formato e outros elementos de diferenciação. Uma análise simples não permite a classificação das diferentes linhagens que compõe esse tecido, embora as células hematopoéticas sejam mais claramente identificáveis pelo formato preferencialmente arredondado e pela presença de numerosos grânulos intracelulares. As culturas de estroma analisadas por microscopia de fluorescência apresentaram um nível basal de fluorescência bastante elevado, o que

dificultou enormemente a visualização da presença da proteína repórter e identificação das células responsáveis pela produção dessa. A utilização do conjunto de filtros padrão para detecção da GFP não foi suficiente para permitir a diferenciação entre a fluorescência normalmente emitida pelo estroma e a causada pela presença da proteína. No entanto, a utilização de um conjunto alternativo de filtros permitiu a diferenciação entre as emissões celulares e as derivadas da GFP, conforme visualizado na figura 13. Nas células controle, verificamos um nível basal de fluorescência, que é inferior ao observado nas amostras expostas ao vírus. As variações individuais observadas nos níveis de fluorescência tanto nas células controle quanto nas transduzidas foi muito grande. De maneira similar ao visualizado na linhagem 293T com a utilização dos filtros alternativos, a fluorescência parece estar concentrada (mas não restrita) em regiões específicas das células, na forma de manchas onde a intensidade da luminosidade é superior às demais estruturas celulares. Não foi possível encontrar diferenças no nível de expressão da GFP entre as três linhagens componentes do estroma, sendo que a variação dentro do grupo parece ter sido superior à encontrada entre os tipos celulares. Assim, o aumento da fluorescência de células de estroma expostas aos vetores lentivirais parece estar relacionado a uma transferência gênica efetiva e estável mediada pelo FIV e à expressão da proteína repórter.

#### *Ensaio resgate para verificação do surgimento de vírus auxiliares*

Não foi possível detectar o surgimento de variantes virais capazes de replicação independente pelo ensaio de resgate utilizado neste trabalho. Culturas eficientemente transduzidas de 293T, K562 e estroma tiveram seus sobrenadantes coletados e colocados em contato com células não transduzidas da linhagem 293T. Após observação por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência não foi possível a identificação da expressão da GFP nessas células até 7 dias após a realização do experimento, mesmo com a utilização nos ensaios de resgate da linhagem onde foi detectado o maior nível de expressão da proteína fluorescente após transdução com os vetores lentivirais.



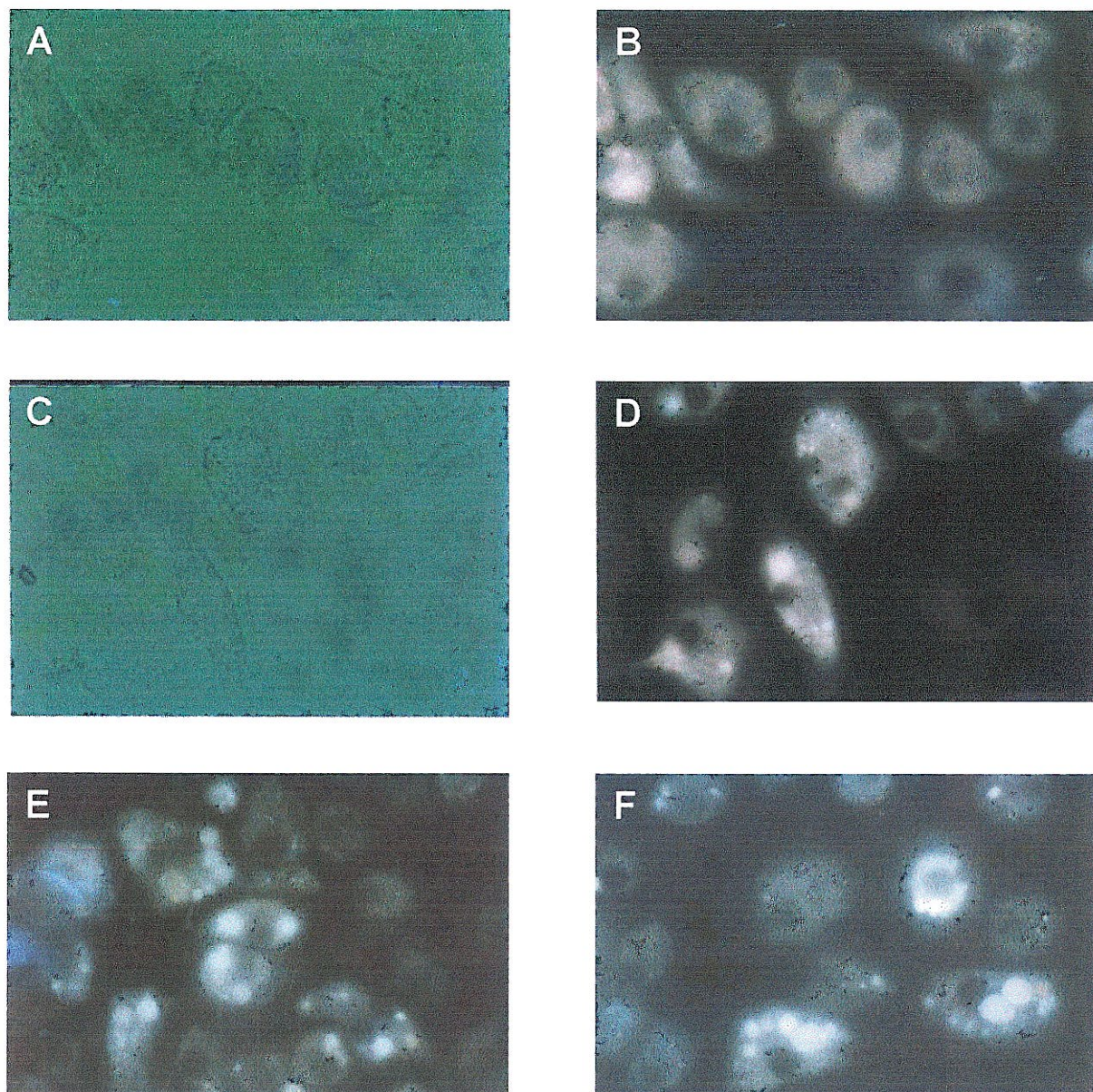


Figura 13: Imagens de microscopia de contraste de fase (A e C) e microscopia de fluorescência com utilização dos filtros alternativos (B, D, E e F) de células de estroma de medula óssea murina. As imagens A e B no topo da página representam amostras controle não transduzidas, enquanto as demais correspondem às culturas expostas ao vetor. Os pares A-B e C-D correspondem aos mesmos campos de visualização, analisados pelas duas técnicas de microscopia utilizadas. As fotos são apresentadas em um aumento de 400x.

## DISCUSSÃO

Muitas questões existem em torno da possibilidade de utilização efetiva de protocolos de terapia gênica num futuro próximo. Não se conhece ainda ao certo o possível benefício clínico que abordagens terapêuticas utilizando técnicas de transferência gênica podem ser capazes de proporcionar. No entanto, as alternativas oferecidas pela terapia gênica, de cura ou prevenção de patologias cujo tratamento ainda não é plenamente eficiente, são enormes. A discussão teórica da terapia gênica está hoje bastante avançada, mas esse avanço não vem se refletindo no âmbito das aplicações práticas da técnica. Esforços no aprimoramento de tecnologias em transferência gênica, com desenvolvimento de vetores mais seguros e eficientes, são necessários, bem como um aprofundamento no conhecimento básico relacionado à biologia dos alvos celulares envolvidos e dos processos patológicos. Assim, uma grande quantidade de ciências das áreas médica e biológica deve interagir no processo de compreensão dos eventos relacionados à terapia gênica (Trono, 2000; Verma, 2000).

Uma das mais recentes propostas visando a busca de vetores com características apropriadas para uso em humanos consiste na utilização de vetores lentivirais com origem em lentivírus de não primatas (Naldini, 1998; Romano e cols., 2000). Sistemas baseados em vírus como o FIV, MVV, CAEV ou o EIAV possuem potenciais propriedades de eficiência e segurança superiores a alguns dos métodos de uso mais comum atualmente. De fato, vetores baseados no Vírus da Artrite Encefalite Caprina foram capazes de superar barreiras de espécie e transduzir com eficiência células humanas quiescentes e mitóticas, inclusive neurônios e glia *in vitro* (Mitrophanous e cols., 1999), bem como linfoblastos *ex vivo*, inclusive sendo capazes de reversão fenotípica e correção funcional da anemia de Fanconi do grupo C em células de pacientes portadores dessa patologia (Yamada e cols., 2001). Entretanto, vetores baseados no MVV apresentaram deficiências na transferência gênica para células humanas, devido principalmente à baixa taxa de integração e transcrição reversa obtida nesses alvos celulares (Berkowitz e cols., 2001). Assim, temos indícios de que os lentivírus de não primatas podem ser usados para transferência gênica em humanos, mas limitações referentes à infecção produtiva em alvos celulares diversos dos naturais devem ser consideradas. Baseado nessa perspectiva, vetores de primeira geração baseados no FIV, capazes de eficientemente transduzir células humanas, foram desenvolvidos (Poeschla e cols., 1998a). Esse sistema possui importância particular pela

capacidade de transferência gênica para alvos celulares mitóticos e pós-mitóticos, característica dos lentivírus.

Neste trabalho, os vetores virais acima citados foram utilizados na transferência de um gene repórter que codifica a proteína GFP para células de linhagens hematopoéticas e para estroma de medula óssea, bem como para uma linhagem de origem endotelial. Foi observada uma produção efetiva dos vetores virais após cotransfecção da linhagem de empacotamento com os três plasmídeos. Os títulos obtidos não puderam ser determinados com exatidão, mas dados bibliográficos sugerem que a produção utilizando a cotransfecção tripla fornece vetores com quantidades geralmente superiores a  $10^5$  UI/mL (Myoshi e cols., 1998; Poeschla e cols., 1998a). Conforme já citado, a linhagem 293T reúne características interessantes para utilização como linhagem empacotadora. Entretanto, no aspecto da segurança, a presença do grande antígeno T do SV40 nessas células pode ser responsável pelo aumento da frequência de geração de vírus auxiliares, devido à indução da ocorrência de recombinação homóloga entre seqüências similares existentes nos plasmídeos utilizados na produção dos vetores (Laurent e cols., 1995).

Alguns autores indicam que tratamentos químicos podem ser realizados na linhagem produtora ou nas células alvo, visando o aumento dos títulos virais produzidos. Soneoka e colaboradores (1995) e Gasmi e colaboradores (1999) sugerem que a utilização do butirato de sódio nas linhagens produtoras promove ativação da transcrição, por interação com diversos promotores (entre eles o CMV e a LTR de diversos lentivírus, incluindo HIV), e aumento na produção de proteínas virais. Chen e colaboradores (1997) propõem que esse mesmo composto tem a capacidade de reativação da expressão de genes silenciados após integração no genoma hospedeiro de células alvo, possivelmente devido à capacidade de inibição de enzimas que atuam na acetilação de histonas, estando também envolvidas na estruturação da cromatina e silenciamento. O tratamento químico com cloroquina é sugerido por Pear e colaboradores (1993) para aumento da eficiência de transfecção de linhagens empacotadoras, já que essa substância é capaz de causar redução no pH de lisossomos, alterando as condições ideais de ação das proteínas responsáveis pela degradação do DNA exógeno (geralmente na forma de plasmídeos) utilizado na transfecção.

O desenvolvimento de linhagens celulares com expressão constitutiva de proteínas estruturais do FIV é outra alternativa viável. Embora não tenha sido até o momento descrita na literatura, sua utilização representaria um avanço no estudo da utilização desse lentivírus como vetor. Na tentativa de aprimoramento das condições de produção de

vetores lentivirais, o desenho das construções plasmidiais pode constituir um elemento importante na tentativa de obtenção de títulos mais elevados. A baixa atividade da proteína Rev do FIV em células humanas é um fator limitante associado à técnica, devido ao transporte ineficiente do RNA nuclear não processado para o citoplasma, indispensável para a síntese de partículas virais infecciosas. Várias tentativas de substituição do Rev por diferentes elementos de transporte nuclear têm mostrado um relativo sucesso. A combinação da proteína Rev e do RRE do HIV em vetores baseados no FIV foi suficiente para aumento dos títulos de produção viral (Johnston e cols., 1999; Curran e cols., 2000), mostrando que o sistema de transporte viral é geralmente adaptado para funcionamento ideal nos respectivos hospedeiros naturais. Schambach e colaboradores (2000) descrevem a utilização de diversas alternativas no aumento do transporte dos RNAs virais que não sofreram *splicing*, entre eles a utilização de proteínas ou seqüências de outros vírus. A utilização de elementos de transporte constitutivo (CTE) do Vírus de Macacos de Mason-Pfizer (MPMV) e os ativadores pós-transcricionais do Vírus da Hepatite de Marmotas (WPRE) levaram a um aumento no número de partículas virais infecciosas produzidas em vetores MMLV, aparentemente devido a mecanismos distintos entre si, permitindo que ambas alternativas sejam utilizadas em conjunto. Curiosamente, Curran e colaboradores (2000) mostraram que, para vetores baseados no FIV, a presença do CTE pode reduzir os títulos do vetor. Entretanto, essa condição está possivelmente relacionada à localização inadequada desta seqüência no construto. A posição dos elementos de transporte pode ter efeito moderado na determinação do aumento ou diminuição dos títulos virais obtidos, de acordo com sua localização relativa ao cassete de expressão interno. A tendência geral parece ser a geração de títulos maiores com introdução dos elementos próximos à região 3' do construto (Johnston e cols., 1999; Curran e cols., 2000).

Esse trabalho também relatou a eficiência da pseudotipagem dos vetores do FIV com a proteína VSV-G. A utilização da glicoproteína G do Vírus da Estomatite Vesicular representou um avanço significativo na tecnologia de produção de vetores, pois permitiu a ampliação do tropismo natural do vírus (Burns e cols., 1993; Desmaris e cols., 2001). Alternativas já descritas incluem o envelope anfotrófico do MMLV (Liu e cols., 1996; Reiser e cols., 1996), mas a utilização da proteína VSV-G apresenta a vantagem de ser passível de concentração a altos títulos por ultracentrifugação (Burns e cols., 1993; Yee e cols., 1994), característica indispensável na produção de vetores virais com títulos suficientes para aplicação em protocolos clínicos. Recentemente, Higashikawa e Chang (2001) mostraram que partículas virais de retro e lentivírus pseudotipadas com a VSV-G

podem ser concentradas por processos extremamente simples, como centrifugação comum em microcentrífuga. Um estudo cinético da estabilidade dos vírions pseudotipados demonstrou que essa etapa de centrifugação também é suficiente para aumentar a razão entre unidades infecciosas e partículas defectivas produzidas pelas células empacotadoras. Além disso, as partículas geradas nesse sistema possuem meia-vida elevada em temperaturas inferiores a 4° C, e suportam seguidas etapas de congelamento e descongelamento sem redução significativa do título. Por tudo isso, a utilização da glicoproteína de envelope do VSV é a melhor alternativa disponível atualmente na substituição das proteínas de envelope naturais de lentivírus. A produção de linhagens empacotadoras com expressão quimicamente regulada da VSV-G é um meio eficaz de superar o problema apresentado pela toxicidade elevada dessa proteína, já que a expansão em laboratório de tais linhagens poderia ser realizada em condições tais que a expressão de VSV-G seria inibida, permitindo a sobrevivência da cultura e minimizando a produção de vírion nas etapas de manipulação dos cultivos celulares. Sistemas similares já foram descritos em linhagens de empacotamento para HIV, utilizando promotores indutíveis pela presença de tetraciclina, conhecidos como *tet* (Chen e cols., 1996; Ory e cols., 1996; Klages e cols., 2000; Xu e cols., 2001) ou regulados por ecdisona (Pacchia e cols., 2001; Sparacio e cols., 2001).

Após transdução com os vetores baseados no FIV foi possível visualizar, por diferentes métodos de análise, a expressão do gene repórter utilizado e a produção da proteína GFP. Entretanto, na maioria das linhagens utilizadas, o vetor descrito foi capaz de induzir níveis bastante reduzidos da produção dessa proteína. A utilização de controles onde o sobrenadante da cultura de 293T não transfectada ou de estoques obtido a partir de células onde a transfecção não incluiu o plasmídeo vetor exclui a possibilidade do aumento da fluorescência observado ser devido à presença, no estoque viral, de citocinas, fatores ou produtos do metabolismo da linhagem empacotadora, já que em tais controles não foi possível observar alterações na fluorescência normal dos alvos celulares. Os resultados aqui descritos quanto à produção da proteína GFP vão ao encontro de alguns dados da literatura, que mostram que a utilização do promotor CMV em vetores retro e lentivirais geram baixos níveis de expressão do transgene em células hematopoéticas. Kume e colaboradores (1999) apresentam dados bastante similares aos encontrados para as linhagens K562 e Daudi em células hematopoéticas M1 (leucemia T murina), onde a expressão de GFP comandada pelo promotor CMV foi reduzida em relação a outros

promotores utilizados, ocasionando em geral aumento de duas vezes na fluorescência basal.

Em uma tentativa de desenvolver vetores otimizados para transferência gênica para células hematopoéticas humanas, Ramezani e colaboradores (2000) descrevem também a pequena atividade do CMV como regulador da produção do transgene em cassetes de expressão, após transdução de células hematopoéticas. Esses autores sugerem a utilização de promotores como as LTRs do Vírus de Célula Tronco Murina (MSCV) e do Vírus da Leucemia de Gibões (GALV), bem como os promotores humanos da PGK (fosfoglicerato quinase 1), EF1- $\alpha$  (fator de alongamento humano 1 $\alpha$ ), sendo os dois últimos de atividade ubíqua em células humanas. Tais alterações propiciaram uma ativação da transcrição em linhagens e células tronco hematopoéticas, com valores de fluorescência até 350 vezes superiores aos encontrados com o CMV. Sirven e colaboradores (2001) e Salmon e colaboradores (2000) também sugerem a utilização do promotor EF1- $\alpha$ , sendo que ambos os trabalhos mostraram a capacidade de manutenção da expressão da proteína exógena após transdução de progenitores hematopoéticos por um vetor baseado no HIV, mesmo após diferenciação das células primitivas em diferentes tipos celulares, como eritrócitos, monócitos, granulócitos, megacariócitos, linfócitos T, B, células dendríticas e NK. Assim, fica patente a necessidade de aprimoramento dos elementos promotores utilizados nos experimentos que visem a transdução efetiva de células hematopoéticas.

Vários outros indícios da literatura sugerem que o desenho molecular dos vetores baseados no FIV utilizados nesse estudo está longe de ser considerado ideal. Os plasmídeos utilizados nesse trabalho foram descritos como a primeira geração de vetores baseados no FIV, e desde então várias inovações na tecnologia de produção de vetores lentivirais já foram propostas. Uma análise dos plasmídeos utilizados nesse trabalho permite identificar inúmeros fatores que podem ter contribuído para a obtenção de níveis reduzidos de expressão da proteína GFP na maior parte das culturas modificadas geneticamente. A orientação do cassete de expressão interno possui uma certa importância, sendo que a oposição entre os promotores do plasmídeo vetor 5' e o promotor interno do cassete de expressão (neste trabalho, ambos CMV) pode gerar interações negativas que levem a uma diminuição na capacidade transcricional do promotor interno (Curran e cols., 2000). Foi relatado em estudos utilizando vetores lentivirais baseados no HIV que a presença de regiões como o trato central polipurínico (cPPT) e a seqüência central de terminação (CTS) nos vetores são capazes de aumentar a

eficiência de transdução. Esses elementos estão envolvidos na formação de uma alça no RNA viral, que é importante no mecanismo de importação nuclear do complexo de pré-integração do vetor. Além disso, a presença destes elementos garante uma eficiência maior na transcrição reversa (Sirven e cols., 2000). Park e Kay (2001) relatam um resultado similar, com aumento da eficiência de transdução de hepatócitos, além de mostrar que a localização do cPPT no sistema vetor é importante, sendo relacionada à alteração do número total de células modificadas geneticamente de acordo com sua posição relativa ao transgene. Nesse trabalho, os autores também destacam o papel do gene exógeno contido no cassete de expressão de vetores HIV.

A presença ou não de íntrons no transgene a ser expresso, bem como características relativas à conformação espacial dos vetores contendo genes exógenos, podem ser suficientes para alteração na eficiência de transdução de vetores baseados no HIV. A utilização de seqüências como a região de ligação da matriz (MAR) do gene da imunoglobulina- $\kappa$  possui efeito distinto em diferentes transgenes testados, mostrando novamente a importância da otimização particular do vetor de transferência gênica a ser utilizado de acordo com o alvo celular e gene exógeno de interesse, além de fatores diversos (Park e Kay, 2001). Além desses, outros autores também citam o transgene expresso como elemento determinante da eficiência de transfecção obtida. A presença dos elementos de transporte WPRE aumenta a eficiência de transcrição e de tradução em vetores contendo derivados da proteína GFP (cuja produção foi reduzida nos construtos onde esses fatores auxiliares haviam sido retirados), embora possua atividade discreta ou mesmo inferior a outros mecanismos de transporte (como o CTE) em sistemas que codificam outros genes (Schambach e cols., 2000). Apesar da influência desses elementos de atuação em *cis* ter sido comentada apenas em vetores lentivirais baseados no HIV ou MMLV, possivelmente a maior parte desses fatores também possui influência em sistemas que utilizam o FIV, devido à semelhança dos mecanismos comuns envolvidos nos processos infecciosos dos vírus dessa família e do comportamento desses em modelos de transferência gênica (Miller e cols., 2000).

Após exposição da linhagem 293T aos vetores produzidos nesse estudo, foi possível verificar produção de grandes quantidade da proteína repórter, indicada pelo aumento da fluorescência visualizado. A expressão do gene repórter em níveis superiores aos observados nas demais linhagens pode estar relacionada ao efeito de *trans* ativação do promotor CMV, responsável pela regulação da transcrição do gene *gfp*, pela proteína E1a adenoviral, produzida pelas 293T (Gorman e cols., 1989). Assim, os elevados níveis de

fluorescência detectados seriam devidos a peculiaridades da célula alvo, e não a características específicas do vetor na indução da produção de grandes quantidades do produto gênico exógeno. Tanto para as células 293T quanto para as linhagens hematopoéticas a eficiência de transdução parece ter sido bastante alta, de acordo com o observado pelo deslocamento como um todo da curva de intensidade de fluorescência. Vetores lentivirais pseudotipados com a VSV-G ou mesmo outros envelopes virais possuem geralmente eficiência de transdução de diversos tipos celulares *in vitro* bastante elevada, próxima a 100% na maior parte dos relatos (Movassagh e cols., 2000; Romano e cols., 2000). Mesmo com a impossibilidade de determinação do título viral, a quantidade de vírus utilizada nas transduções foi suficiente para a alteração genética de todas as células da cultura.

A quantificação dos vetores virais pelos métodos atualmente empregados (infecção de uma linhagem teste para contagem do número de eventos de transdução) é bastante controversa. Alguns autores relatam que fatores como o volume de estoque viral utilizado, ausência de reprodutibilidade, falta de sensibilidade nos métodos de detecção do transgene e características específicas da linhagem de titulação são bastante variáveis, podendo ser responsável por determinações errôneas da quantidade total de vetor produzida. Além disso, a extrapolação dos valores encontrados nas linhagens de titulação para outros alvos celulares é temerária, já que elas podem diferir em termos de suscetibilidade à infecção pelos vetores ou na expressão do gene exógeno. Assim, sugere-se que a multiplicidade de infecção (MOI) não seja um parâmetro de descrição experimental útil (pois deveria conter informações mais específicas), mas que, ao invés disso, resultados quanto à eficiência do método de transferência gênica especificamente nos alvos celulares de interesse sejam medidas de maior interesse (Shabram e Aguilar-Cordova, 2000).

Na transdução do estroma, foi verificado, de maneira similar ao encontrado nas linhagens hematopoéticas, um aumento de 2 vezes na intensidade basal de fluorescência devido à expressão da proteína GFP. Baixos níveis de expressão do gene repórter podem ser devidos às características dos vetores utilizados, ainda não otimizados para a transdução de alvos como o estroma, nos quais células hematopoéticas expressam pequena quantidade do transgene após integração do próviro no genoma. De fato, apesar da eficiência ter sido elevada (a exemplo do descrito nos outros alvos testados), mesmo nas linhagens endotelial e mesenquimal constituintes do estroma os níveis de fluorescência não sofreram um aumento expressivo. Nesse experimento, foi possível



verificar uma alteração no nível de fluorescência basal após exposição das culturas primárias aos controles representados pelo sobrenadante de células 293T. Esse aumento foi inferior ao encontrado no procedimento de transdução com estoques virais funcionais, indicando que a possível presença de certos fatores celulares produzidos pela linhagem 293T pode alterar características como a fluorescência basal do estroma. Este mesmo efeito não foi observado nas K562 ou em Daudi, sugerindo que cultivos primários podem estar sujeitos a alterações mais significativas do que linhagens imortalizadas. Ainda não foram realizados estudos na caracterização de citocinas e demais produtos secretados por essa linhagem de empacotamento, portanto esse é um ponto a ser considerado e investigado com maior profundidade, já que elementos solúveis produzidos pelas 293T parecem ser capazes de alterar características normais de alguns tipos de células alvos.

Métodos de microscopia foram utilizados para visualização da proteína GFP produzida pelas células transduzidas. A identificação de altos níveis da proteína foi facilmente realizada na linhagem 293T, e impossível de ser caracterizada nas linhagens hematopoéticas. Esses resultados condizem com a análise por citometria de fluxo, evidenciando que os níveis de produção do transgene em K562 e Daudi foram reduzidos e, por isso, não passíveis de caracterização por microscopia de fluorescência. A análise do estroma por essa técnica foi bastante dificultada pela elevada emissão basal apresentada por esse tecido. A utilização dos filtros padrão de detecção do GFP não permitiram a diferenciação entre os níveis normais e induzidos pela infecção viral. Billinton e Knight (2001) sugerem que a utilização de filtros com características de absorção de comprimentos de onda distintos dos normalmente empregados, ou variantes da proteína GFP com propriedades diferenciadas de excitação e emissão, podem ser ferramentas na identificação de fluorescência causada especificamente pela proteína repórter. Com a utilização do conjunto de filtros alternativos para detecção da GFP, foi possível observar a expressão dessa proteína nas células transduzidas. Foi registrado um acúmulo da proteína em regiões específicas da célula, na forma de “manchas” de formato granular. Apesar de relatos da literatura descreverem a distribuição da GFP após transferência gênica como homogênea pelo núcleo e pelo citoplasma, as imagens apresentadas nas respectivas publicações são similares às encontradas neste estudo, sugerindo que a expressão da proteína fluorescente pode estar concentrada em regiões contendo membranas intracelulares, como núcleo ou organelas (Ogawa e cols., 1995). Além disso, foi possível verificar que as células do estroma morfológicamente classificadas como de origem hematopoética apresentaram ocorrência reduzida de pontos com intensidade elevada de

fluorescência, sugerindo que mesmo nas culturas desse tecido a técnica de microscopia de fluorescência não foi efetiva na verificação da produção de GFP pelos componentes hematopoéticos.

Uma análise da viabilidade celular das culturas transduzidas mostrou que uma certa toxicidade celular está associada ao tratamento dos alvos utilizados com os vetores lentivirais. Essa foi pouco evidente ou inexistente no estroma, mas esse fato pode estar relacionado à baixa taxa de expansão *in vitro* apresentada pelas células desse tecido (mais lentas na realização do ciclo celular) ou mesmo à própria origem das culturas primárias estromais, obtidas por extração de medula óssea murina. Alguns elementos podem estar associados à toxicidade observada em experimentos de transdução de linhagens. Determinadas proteínas lentivirais, principalmente do HIV, são reconhecidamente tóxicas em células humanas, especialmente a protease e determinados produtos de genes acessórios. A citopaticidade do FIV em células humanas também já foi detectada, e essa pode estar relacionada à liberação de moléculas citotóxicas nas culturas infectadas. Embora as proteínas responsáveis por esse efeito não sejam plenamente reconhecidas, a citotoxicidade encontrada é considerada normal, comum à infecção de vários membros da família dos lentivírus (Johnston e Power, 1999). Além das proteínas virais, o transgene expresso pode ser responsável pela toxicidade encontrada. Liu e colaboradores (1999) observaram que a dificuldade no estabelecimento de linhagens celulares com expressão constitutiva da GFP é motivada pela toxicidade dessa proteína em células humanas. Investigações posteriores mostraram que diversas variantes da proteína verde fluorescente são capazes de indução de apoptose em algumas linhagens humanas, embora o mecanismo que desencadeia o processo não tenha sido bem esclarecido. Nossos resultados indicam que, mesmo com as evidências de ocorrência de citotoxicidade, essa não foi suficiente para impedir a transdução estável das linhagens testadas, já que todos os alvos celulares experimentais apresentaram expressão do transgene na ausência de seleção durante todo o tempo de manutenção da cultura. Essa evidência descarta também a possibilidade de ocorrência de pseudotransdução, pois nesse caso os produtos protéicos cotransferidos das células de empacotamento para os alvos transduzidos rapidamente seriam diluídos com a expansão da cultura (Liu e cols., 1996).

Os tipos celulares testados nesse experimento representam alvos importantes para a terapia gênica. As linhagem K562 e Daudi foram utilizadas como modelo para estabelecimento de condições experimentais para posteriores trabalhos com células tronco hematopoéticas, cuja transdução possui enorme potencial terapêutico no tratamento de

uma diversidade de enfermidades. Infelizmente, a caracterização dessas células multipotenciais é ainda deficiente, ofuscando sua importância prática. O aprofundamento de estudos nos processos de diferenciação e condições de cultivo dessas células é urgente. Pela baixa ocorrência em indivíduos adultos, a otimização dos procedimentos de transferência gênica inclui dois elementos: a manutenção da pluripotencialidade (através de diminuição dos processos de diferenciação celular) e a capacidade de expansão e sobrevivência *in vitro*. Vários trabalhos descrevem condições de cultivo que visam, além dos objetivos descritos acima, modificação genética efetiva das células tronco hematopoéticas pelos vetores retrovirais. Algumas condições que possuem ocorrência mais geral incluem a presença de trombopoetina no meio de cultura (em combinação com diferentes citocinas e interleucinas) e a transdução dessas células na presença do fragmento 296 C-terminal da fibronectina (Kim e cols., 1997; An e cols., 2000; Dorrel e cols., 2000), fatores que têm resultado em índices razoáveis de expansão, manutenção da pluripotencialidade e eficiência de transdução nas células tronco. Foi demonstrado que mesmo um dia de cultura *ex vivo* é suficiente para a obtenção de transferência gênica efetiva em células tronco humanas, que mesmo após exposição aos vetores foi capaz de reconstituição total do sistema hematopoético em murinos (Rebel e cols., 1999).

A transferência gênica de estroma é importante devido à presença de elevado número de células tronco mesenquimais nesse tecido, sendo que essas podem ser transduzidas juntamente com o restante do tecido e, após isolamento e expansão *in vitro*, serem reinfundidas em pacientes, mantendo sua capacidade de diferenciação em diversas linhagens e também a expressão do gene exógeno (Lee e cols., 2001). Diversos estudos têm demonstrado a presença de células pluripotenciais em adultos, obtidas a partir de fontes diversas como sangue, músculo, fígado, cérebro ou medula óssea, com capacidade de diferenciação em muitos tecidos e tipos celulares existentes no organismo (revisado por Clarke e Frisén, 2001). O aprimoramento das técnicas de transferência gênica pode ser um auxiliar na marcação genética com utilização de proteínas repórter e identificação das células progenitoras existentes nestes tecidos, identificadas por ensaios posteriores de formação de progênie diferenciada, visando uma compreensão mais sofisticada nos ensaios de caracterização dessas células e estudo dos processos biológicos envolvidos na diferenciação das mesmas (Kume e cols., 1999). O estroma apresenta importância também como um elemento singular na regulação da hematopoese, através de interações moleculares com as células tronco hematopoéticas. A modificação genética desse tecido pode ser utilizada na reversão de patologias referentes a disfunções da capacidade

hematopoética de caráter monogênico, com produção de fatores ou produtos protéicos ausentes em pacientes portadores de determinadas síndromes (Nardi e Alfonso, 1999). Tanto o FIV quanto o HIV são capazes de infectar produtivamente o estroma de seus hospedeiros naturais, possuindo papel essencial nas alterações da capacidade hematopoética em pacientes ou animais infectados e no desenvolvimento da patologia associada a esses lentivírus. Igualmente, ambos os vírus podem utilizar o estroma de medula óssea como um reservatório natural em organismos infectados. (Bahner e cols., 1997; Tanabe e Yamamoto, 2001). Dessa forma, a infecção do estroma com vetores baseados no FIV ou no HIV que carreguem genes suicidas cuja expressão é ativada pela proteína Tat do HIV (obtidos com a utilização da LTR do HIV como elemento de regulação da produção dos elementos deletérios), é capaz de proteger células desse tecido frente a infecções naturais pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, minimizando a importância do estroma como reservatório (Poeschla e cols., 1996). Por fim, a utilização de células estromais como linhagens de empacotamento de vetores virais pode, após infusão intravenosa e estabelecimento nos sítios normais de hematopoese, auxiliar na transdução *in situ* de células tronco e progenitores hematopoéticos, aumentando a eficiência do processo (Newbound e cols., 2001).

Os métodos utilizados neste trabalho não permitiram a identificação do surgimento de variantes virais recombinantes capazes de replicação independente. O monitoramento desses elementos é muito importante no desenvolvimento de protocolos visando aproveitamento clínico, já que a inserção de RCRs na população representa um risco extremamente grande. Alternativas vêm sendo discutidas com o objetivo de aumentar a segurança dos vetores lentivirais desenvolvidos. A principal delas refere-se à eliminação de todos os genes dispensáveis ao funcionamento do vetor. Tais construções, que são geralmente conhecidas como vetores mínimos, já foram descritas para o HIV (Kim e cols., 1998; Gasmi e cols., 1999) e para o FIV (Johnston e cols., 1999), sendo que no último foram determinados os elementos indispensáveis no funcionamento desse vírus como vetor. Plasmídeos vetores foram desenvolvidos onde a ausência de todos os genes acessórios virais (com exceção do sistema *rev-RRE*) e provimento dos genes *gag* e *pol* em *trans* não causaram alteração significativa no título ou eficiência de transdução. Esses vetores foram denominados como de segunda geração para o FIV (Johnston e cols., 1999). Curran e colaboradores (2001) descrevem que mesmo essas proteínas de transporte do FIV podem ser substituídas por elementos alternativos de outros vírus (como o CTE do MPMV), mas essas modificações envolvem uma pequena redução nos títulos virais

obtidos. A retirada dessas seqüências permite que a ausência de várias proteínas virais no vetor diminua a toxicidade associada à transferência gênica. Além disso, a possibilidade de eventos de recombinação homóloga entre os plasmídeos, em procedimentos de transfecção transiente, é minimizada pela retirada de genes comuns a mais de uma construção plasmidial. Exceção talvez seja feita ao gene *gag*, que é indispensável no plasmídeo empacotador para síntese de proteínas estruturais do capsídeo e cuja presença de parte do gene no construto vetor é necessária como componente do fator de encapsidação. Como alternativa no monitoramento de RCRs, um método de detecção de formas recombinantes pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) chegou a ser desenvolvido neste trabalho, mas dados da literatura mostram que essa técnica apresenta limitações para identificação de vírus recombinantes integrados ao genoma, principalmente pela ocorrência de falsos positivos relacionados à contaminação dos sobrenadantes virais com os plasmídeos utilizados na transfecção e com o DNA genômico das células empacotadoras e hospedeiras (Chen e cols., 2001). Dessa forma, no único tipo de ensaio realizado em nosso trabalho, não foi possível a identificação da presença de RCRs. (o RT-PCR?)

Há ainda outras questões referentes à segurança da utilização de vetores baseados no FIV que merecem ser endereçadas. Até há pouco tempo, a idéia geral era de que a ausência de infecção de humanos por esse vírus, apesar de exposição elevada aos métodos de contágio naturais, servia de subsídio para a afirmação de que o Vírus da Imunodeficiência Felina possui características de segurança superiores às dos vetores baseados no HIV (Poeschla e cols., 1998a; Romano e cols., 2000). Entretanto, resultados recentes mostraram que o FIV é capaz de infecção produtiva e replicação em células humanas *in vitro*, mesmo que em baixos níveis (Johnston e Power, 1999). Essa propriedade é variável entre diferentes isolados do vírus (o clone Petaluma que serviu de base para a construção dos plasmídeos utilizados por nós parece ser menos infectivo que V<sub>1</sub>CSF), mostrando que a escolha de cepas menos virulentas deve ser um parâmetro considerado na construção de futuros vetores baseados no FIV. Além disso, recentemente foi demonstrado que primatas não humanos infectados com esse vírus desenvolveram sintomatologia clínica correspondente à infecção natural em felinos, com perda de peso e depleção de células CD4<sup>+</sup>. Assim, a possibilidade de xenoinfecção existe, e deve ser considerada como uma possível fonte de introdução de novos patógenos na população humana (Johnston e cols., 2001). Um cuidado extra na utilização do FIV como vetor refere-se à propagação heteróloga de RNA desse vírus por partículas do HIV. Apesar de

ensaios anteriores afirmarem o contrário (Curran e cols., 2001), os capsídeos dos Vírus de Imunodeficiência Humana e de Símios foram capazes de incorporar eficientemente o genoma do Vírus da Imunodeficiência Felina, sugerindo que a infecção natural de pacientes que receberam vetores baseados no FIV pelo HIV selvagem pode levar a encapsidação cruzada ou coencapsidação, tendo como resultado a mobilização de elementos do vetor em humanos (Browning e cols., 2001).

A alternativa de utilização do FIV como vetor de transferência gênica para humanos ainda é bastante promissora, já que todos os sistemas virais apresentam vantagens e desvantagens na sua utilização. Alguns ensaios foram realizados utilizando esse lentivírus em humanos ou em modelos animais, em diversos tipos celulares. Wang e colaboradores (1999) demonstraram que o FIV infecta eficazmente células do epitélio do sistema respiratório. Estes autores mostram também que a expressão do transgene é mantida ao longo do tempo sem diminuição dos níveis protéicos. Neste experimento, foi utilizado o gene regulador transmembrana do transporte de Cl<sup>-</sup>. A expressão da proteína codificada por este gene foi demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo que o FIV pode ser utilizado em ensaios clínicos de terapia gênica contra a fibrose cística. Alisky e colaboradores (2000) relatam a transdução de neurônios e células de Purkinje após injeção no cerebelo de camundongos, mostrando inclusive a capacidade de transporte retrógrado para outras regiões do cérebro. A injeção intravenosa de vetores baseados no FIV em camundongos nocaute modelo para as doenças mucopolissacaridose tipo VII e hemofilia A carregando genes terapêuticos humanos ( $\beta$ -glucoronidase e fator VIII, respectivamente) foi suficiente para reversão da patologia apresentada por esses animais. A transferência gênica foi eficiente em uma quantidade grande de órgãos e tecidos (mostrando que vários alvos podem ser submetidos à transdução com o FIV *in vivo*), e a produção das proteínas terapêuticas foi verificada durante todo o tempo de duração do estudo (períodos de até 5 meses), sugerindo que esses sistemas apresentam características de eficiência e estabilidade com elevado potencial clínico no tratamento dessas referidas enfermidades (Stein e cols., 2001).

O aprimoramento das condições de transfecção e transdução é indispensável para o estabelecimento de futuros protocolos clínicos de terapia gênica em humanos. Somente vetores com características adequadas de segurança e eficiência devem ser oferecidos como alternativa terapêutica aos pacientes, sempre com uma avaliação prévia do possível benefício clínico oferecido por esse tipo de tratamento. Problemas referentes à resposta imune contra o vetor e contra o transgene devem ser considerados, em tratamentos *in vivo*.

A utilização de vetores lentivirais produzidos em linhagens humanas parece minimizar a inativação pelo sistema complemento humano (DePolo e cols., 1999), possivelmente devido à ausência de epitopos de membrana galactosil ( $\alpha$ 1-3)Gal glicosilados, comuns em outras espécies (Takeuchi e cols., 1994), permitindo a injeção intravenosa desses vetores em humanos. Entretanto, estudos recentes mostram que vetores baseados no FIV e no HIV contendo a proteína G do envelope do VSV (VSV-G) são suscetíveis à inativação por elementos presentes no soro humano, possivelmente em um mecanismo diferente do já proposto (DePolo e cols., 2000; Higashikawa e Chang, 2001), sugerindo que a utilização de proteínas de envelope alternativas deve ser buscada. Além do vetor, o transgene expresso pode também ser alvo de respostas do sistema imune. Rosenzweig e colaboradores (2001) relatam a indução de resposta citotóxica mediada por linfócitos T e desenvolvimento de anticorpos contra GFP em um experimento de transplante de células tronco hematopoéticas transduzidas *ex vivo*, associada com a depleção dos progenitores celulares após reintrodução no organismo. Lutzko e colaboradores (1999) observaram que em modelos animais caninos de mucopolissacaridose tipo I o efeito é semelhante, e que o tratamento efetivo da patologia é impossibilitado pela forte resposta humoral e celular contra o transgene. Esses autores, da mesma forma que McCormack e colaboradores (2001), propõem a utilização de moduladores químicos do sistema imune, visando minimizar a resposta contra o vetor e o transgene. O direcionamento dos vetores baseados no FIV para tecidos ou alvos específicos após procedimentos de transferência gênica *in vivo* também é uma questão de interesse. Sugestões como a utilização de proteínas de envelope fusionada com anticorpos capazes de reconhecer epitopos na superfície de alvos determinados ou utilização de promotores tecido específicos (Grande e cols., 1999; Jiang e Dornburg, 1999; Daly e Chernajovsky, 2000) devem ser consideradas, visando o aprimoramento da especificidade necessária para utilização *in vivo*. A utilização de sistemas com expressão simultânea de mais de um elemento protéico também é desejável, principalmente como alternativa na detecção da eficiência de transdução obtida, através da combinação de genes repórteres e terapêuticos em um mesmo sistema viral (Daly e Chernajovsky, 2000; Zhu e cols., 2001). Dessa forma, as condições mínimas necessárias para utilização efetiva de vetores lentivirais em humanos, através de protocolos clínicos seguros e eficientes, podem ser obtidas, permitindo o acréscimo dessa alternativa clínica ao arsenal terapêutico disponível atualmente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alisky, JM; Hughes, SM; Sauter, SL; Jolly, D; Dubensky, TW Jr; Staber, PD; Chiorini, JA; Davidson, BL. 2000. **Transduction of Murine Cerebellar Neurons with Recombinant FIV and AAV5 Vectors.** *Neuroreport*, 11: 2669-2673.
- An, DS; Wersto, RP; Agricola, BA; Metzger, ME; Lu, S; Amado, RG; Chen, ISY; Donahue, RE. 2000. **Marking and Gene Expression by a Lentivirus Vector in Transplanted Human and Nonhuman Primate CD34<sup>+</sup> Cells.** *Journal of Virology*, 74:1286-1295.
- Asahara, T; Kalka, C; Isner, JM. 2000. **Stem Cell Therapy and Gene Transfer for Regeneration.** *Gene Therapy*, 7: 451-457.
- Audet, J; Zandstra, PW; Eaves, CJ; Piret, JM. 1998. **Advances in Hematopoietic Stem Cells Culture.** *Current Opinion in Biotechnology*, 9:146-151.
- Bahner, I; Kearns, K; Coutinho, S; Leonard, EH; Kohn, DB. 1997. **Infection of Human Stroma by Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Is both Required and Sufficient for HIV-1-Induced Hematopoietic Suppression *In Vitro*: Demonstration by Gene Modification of Primary Human Stroma.** *Blood*, 90: 1787-1798.
- Baum, C; Stocking, C; Wagener, T; Eckert, H-G; Ostertag, W. 1997. **Gene Transfer and Transgene Expression in Hematopoietic Cells.** Em: Strauss, M; Barranger, J. *Concepts in Gene Therapy*. 233-265. Walter de Gruyter, New York, NY.
- Berkowitz, RD; Ilves, H; Plavec, I; Veres, G. 2001. **Gene Transfer Systems Derived from Visna Virus: Analysis of Virus Production and Infectivity.** *Virology*, 279:116-129.
- Bhatia, M; Bonnei, D; Murdoch, B; Gan, OI; Dick, JE. 1998. **A Newly Discovered Class of Human Hematopoietic Cells with SCID-Repopulating Activity.** *Nature Medicine*, 4: 1038-1045.
- Billinton, N; Knight, AW. 2001. **Seeing the Woods through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence.** *Analytical Biochemistry*, 291: 175-197.
- Blaese, RM; Anderson, WF; Culver, KW; Rosenberg, SA. 1990. **The ADA Human Gene Therapy Clinical Protocol.** *Human Gene Therapy*, 1: 327-362.
- Blaese, RM; Culver, KW; Miller, AD; Carter, CS; Fleisher, T; Clerici, M; Shearer, G; Chang, L; Chiang, Y; Tolstoshev, P; Greenblatt, JJ; Rosenberg, SA; Klein, H;



- Berger, M; Mullen, CA; Ramsey, WJ; Muul, L; Morgan, RA; Anderson, WF. 1995. **T Lymphocyte-directed Gene Therapy for ADA<sup>-</sup> SCID: Initial Trial Results After 4 Years.** *Science*, 270: 475-480.
- Blömer, U; Naldini, L; Kafri, T; Trono, D; Verma, IM; Gage, FH. 1997. **Highly Efficient and Sustained Gene Transfer in Adult Neurons with a Lentivirus Vector.** *Journal of Virology*, 71.
- Bordignon, C; Notarangelo, LD; Nobili, N; Ferrari, G; Casorati, G; Panina, P; Mazzorali, E; Maggioni, D; Rossi, C; Servida, P; Ugazio, AG; Mavilio, F. 1995. **Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA<sup>-</sup> Immunodeficient Patients.** *Science*, 270: 470-453.
- Brown, MD; Schätzlein, AG; Uchegbu, IF. 2001. **Gene Delivery with Synthetic (Non Viral) Carriers.** *International Journal of Pharmaceutics*, 229: 1-21.
- Browning, MT; Schmidt, RD; Lew, KA; Rizvi, TA. 2001. **Primate and Feline Lentivirus Vector RNA Packaging and Propagation by Heterologous Lentivirus Virions.** *Journal of Virology*, 75: 5129-5140.
- Buchschacher, GL; Wong-Staal, F. 2000. **Development of Lentiviral Vectors for Gene Therapy for Human Diseases.** *Blood*, 95: 2499-2504.
- Burns, JC; Friedmann, T; Driever, W; Burrascano, M; Yee, J-K. 1993. **Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein Pseudotyped Retroviral Vectors: Concentration to a Very High Titer and Efficient Gene Transfer into Mammalian and Nonmammalian Cells.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 90:8033-8037.
- Cancelas, JA; Koevoet, WLM; de Koning, AE; Mayen, AEM; Rombouts, EJC; Ploemacher, RE. 2000. **Connexin-43 Gap Junctions Are Involved in Multiconnexin-Expressing Stromal Support of Hemopoietic Progenitors and Stem Cells.** *Blood*, 96: 498-505.
- Case, SS; Price, MA; Jordan, CT; Yu, XJ; Wang, L; Bauer, G; Haas, DL; Xu, Dakun; Stripecke, R; Naldini, L; Kohn, DB; Crooks, GM. 1999. **Stable Transduction of Quiescent CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Human Hematopoietic Cells by HIV-1-Based Lentiviral Vectors.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 96:2988-2993.
- Cavazzana-Calvo, M; Hacein-Bey, S; Basile, GS; Gross, F; Yvon, E; Nausbaum, P; Selz, F; Hue, C; Certain, S; Casanova, JL; Bousso, P; Deist, F; Fischer, A. 2000. **Gene**

- Therapy of Human Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease.** *Science*, 288:669-672.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention; National Institutes of Health. 1999. **Biosafety in Microbial and Biomedical Laboratories.** U.S. Government Printing Office, EUA, 4a. Edição.
- Chalfie, M; Tu, Y; Euskirchen, G; Ward, W; Prasher, D. 1994. **Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression.** *Science*, 263:802-805.
- Chen, J; Reeves, L; Sanburn, N; Croop, J; Williams, DA; Cornetta, K. 2001. **Packaging Cell Line DNA Contamination of Vector Supernatants: Implication for Laboratory and Clinical Research.** *Virology*, 282: 186-197.
- Chen, ST; Iida, A; Guo, L; Friedmann, T; Yee, JK. 1996. **Generation of Packaging Cell Lines for Pseudotyped Retroviral Vectors of the G Protein of Vesicular Stomatitis Virus by Using a Modified Tetracycline Inducible System.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93: 10057-10062.
- Chen, WY; Bailey, EC; McCune, SL; Dong, JJ; Townes, TM. 1997. **Reactivation of Silenced, Virally Transduced Genes by Inhibitors of Histone Deacetylase.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94: 5798-5803.
- Chen, WY; Townes, TM. 2000. **Molecular Mechanism for Silencing Virally Transduced Genes Involves Histone Deacetylation and Chromatin Condensation.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97: 377-382.
- Cherington, V; Chiang, GG; McGrath, CA; Gaffney, A; Galanopoulos, T; Merrill, W; Bizinkauskas, CB; Hansen, M; Sobolewski, J; Levine, PH; Greenberger, JS; Hurwitz, DR. 1998. **Retroviral Vector-Modified Bone Marrow Stromal Cells Secrete Biologically Active Factor IX *In Vitro* and Transiently Deliver Therapeutic Levels of Human Factor IX to the Plasma of Dogs after Reinfusion.** *Human Gene Therapy*, 9: 1397-1407.
- Chong, H; Starkey, W; Vile, RG. 1998. **A Replication-Competent Retrovirus Arising from a Split-Function Packaging Cell Line Was Generated by Recombination Events between the Vector, One of the Packaging Constructs and Endogenous Retroviral Sequences.** *Journal of Virology*, 72:2663-2670.
- Cilloni, D; Carlo-Stella, C; Faizetti, F; Sammarelli, G; Regazzi, E; Colla, S; Rizzoli, V; Aversa, F; Martelli, MF; Tabilio, A. 2000. **Limited Engraftment Capacity of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Following T-Cell-Depleted Hematopoietic Stem Cell Transplantation.** *Blood*, 96: 3637-3643.

- Clarke, D; Frisén, J. 2001. **Differentiation Potential of Adult Stem Cells.** *Current Opinion in Genetics & Development*, 11: 575-580.
- Conget, PA; Minguell, JJ. 2000. **Adenoviral-Mediated Gene Transfer Into *Ex Vivo* Expanded Human Bone Marrow Mesenchymal Progenitor Cells.** *Experimental Hematology*, 28: 382-390.
- Colter, DC; Class, R; DiGirolamo, C; Prockop, DJ. 2000. **Rapid Expansion of Recycling Stem Cells in Cultures of Plastic-Adherent Cells from Human Bone Marrow.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97: 3213-3218.
- Cornetta, K; Morgan, RA; Anderson, WF. 1991. **Safety Issues Related to Retroviral-Mediated Gene Transfer in Humans.** *Human Gene Therapy*, 2:5-14.
- Crystal, RG. 1999. **Bad for Cats, Good for Humans? Modified Feline Immunodeficiency Virus for Gene Therapy.** *The Journal of Clinical Investigation*, 104(11): 1491-1493.
- Curran, MA; Kaiser, SM; Achacoso, PL; Nolan, GP. 2000. **Efficient Transduction of Nondividing Cells by Optimized Feline Immunodeficiency Virus Vectors.** *Molecular Therapy*, 1:31-38.
- Daly, G; Chernajovsky, Y. 2000. **Recent Developments in Retroviral-Mediated Gene Transduction.** *Molecular Therapy*, 2: 425-434.
- Dani, SU. 1999. **The Challenge of Vector Development In Gene Therapy.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32:133-145.
- Danthinne, X; Imperiale, MJ. 2000. **Production of First Generation Adenovirus Vectors: a Review.** *Gene Therapy*, 7: 1707-1714.
- de Parseval, A; Elder, JH. 1999. **Demonstration that ORF2 Encodes the Feline Immunodeficiency Virus Transactivating (Tat) Protein and Characterization of a Unique Gene Product with Partial Rev Activitie.** *Journal of Virology*, 73: 608-617.
- DePolo, NJ; Harkleroad, CE; Bodner, M; Watt, AT; Anderson, CG; Greengard, JS; Murthy, KK; Dubensky, TW Jr; Jolly, DJ. 1999. **The Resistance of Retroviral Vectors Produced from Human Cells to Serum Inactivation *In Vivo* and *In Vitro* Is Primate Species Dependent.** *Journal of Virology*, 73: 6708-6714.
- DePolo, NJ; Reed, JD; Sheridan, PL; Townsend, K; Sauter, SL; Jolly, DJ; Dubensky, TW Jr. 2000. **VSV-G Pseudotyped Lentiviral Vectors Particles Produced in Human Cells Are Inactivated by Human Serum.** *Molecular Therapy*, 2: 218-222.

- Desmaris, N; Bosch, A; Salaün, C; Petit, C; Prévost, MC; Tordo, N; Perrin, P; Schwartz, O; de Rocquigny, H; Heard, JM. 2001. **Production and Neurotropism of Lentivirus Vectors Pseudotyped with Lyssavirus Envelope Glycoproteins.** *Molecular Therapy*, 4: 149-156.
- Donahue, RE; Kessler, SW; Bodine, D; Mcdonagh, K; Dunbar, C; Goodman, S; Agricola, B; Byrne, E; Raffeld, M; Moen, R. 1992. **Helper Virus Induced T Cell Lymphoma in Nonhuman Primates After Retroviral Mediated Gene Transfer.** *Journal of Experimental Medicine*, 176: 1125-1135.
- Dorrel, C; Gan, OI; Pereira, DS; Hawley, RG; Dick, JE. 2000. **Expansion of Human Cord Blood CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> Cells in Ex Vivo Culture During Retroviral Transduction without a Corresponding Increase in SCID Repopulating Cell (SRC) Frequency: Dissociation of SRC Phenotype and Function.** *Blood*, 95: 102-110.
- Ehrengruber, MU; Hennou, S; Büeler, H; Naim, HY; Dégion, N; Lundstrom, K. 2001. **Gene Transfer into Neurons from Hippocampal Slices: Comparison of Recombinant Semliki Forest Virus, Adenovirus, Adeno-Associated Virus, Lentivirus, and Measles Virus.** *Molecular and Cellular Neuroscience*, 17: 855-871.
- Elder, JH; Phillips, TR. 1995. **Feline immunodeficiency virus as a model for development of molecular approaches to intervention strategies against lentivirus infections.** *Advances in Virus Research*, 45:225-247
- Emery, DW; Yannaki, E; Tubb; J; Stamatoyannopoulos, G. 2000. **A Chromatin Insulator Protects Retrovirus Vectors from Chromosomal Position Effects.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97: 9150-9155.
- Fan, TX; Hisha, H; Jin, TN; Yu, CZ; Lian, ZX; Guo, SB; Cui, YZ; Feng, B; Yang, GX; Li, Q; Ikehara, S. 2001. **Successful Allogeneic Bone Marrow Transplantation (BMT) by Injection of Bone Marrow Cells via Portal Vein: Stromal Cells as BMT-Facilitating Cells.** *Stem Cells*, 19: 144-150.
- Frézard, F. 2001. **Liposomes: from Biophysics to the Design of Peptide Vaccines.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 181-189.
- Friedmann, T. 1997. **Overcoming the Obstacles to Gene Therapy.** *Scientific American*, 276: 80-85

- Gasmi, M; Glynn, J; Jin, MJ; Jolly, DJ; Yee, JK; Chen, ST. 1999. **Requirements for Efficient Production and Transduction of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vectors.** *Journal of Virology*, 73:1828-1834.
- Gorman, CM; Gies, D; McCray, G; Huang, M. 1989. **The Human Cytomegalovirus Major Immediate Early Promoter Can Be Trans-Activated by Adenovirus Early Proteins.** *Virology*, 171: 377-385.
- Grande, A; Piovani, B; Aiuti, A; Ottolenghi, S; Mavilio, F; Ferrari, G. 1999. **Transcriptional Targeting of Retroviral Vectors to the Erythroblastic Progeny of Transduced Hematopoietic Stem Cells.** *Blood*, 93: 3276-3285.
- Hartmann, K. 1998. **Feline Immunodeficiency Virus Infection: an Overview.** *Veterinary Journal*, 155:123-137
- Hashida, M; Nishikawa, M; Yamashita, F; Takakura, Y. 2001. **Cell-Specific Delivery of Genes with Glycosylated Carriers.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52: 187-196.
- Hecker, JG; Hall, LL; Irion, VR. 2001. **Nonviral Gene Delivery to the Lateral Ventricle in Rat Brain: Initial Evidence for Widespread Distribution and Expression in the Central Nervous System.** *Molecular Therapy*, 3: 375- 384.
- Hewson, R. 2000. **RNA Viruses: Emerging Vectors for Vaccination and Gene Therapy.** *Molecular Medicine Today*, 6:28-33.
- Higashikawa, F; Chang, L. 2001. **Kinetic Analyses of Stability of Simple and Complex Retroviral Vectors.** *Virology*, 280: 124-131.
- Hildinger, M; Abel, KL; Ostertag, W; Baum, C. 1999. **Design of 5' Untranslated Sequences in Retroviral Vectors Developed for Medical Use.** *Journal of Virology*, 73:4083-4089.
- Hoffman, R. 1999. **Progress in the Development of Systems for *In Vitro* Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells.** *Current Opinion Hematology*, 6:184-191.
- Horwitz, EM; Prockop, DJ; Gordon, PL; Koo, WW; Fitzpatrick, LA; Neel, MD; McCarville, ME; Orchard, PJ; Pyeritz, RE; Brenner, MK. 2001. **Clinical Responses to Bone Marrow Transplantation in Children with Severe Osteogenesis Imperfecta.** *Blood*, 97: 1227-1231.
- Huss, R. 2000. **Isolation of Primary and Immortalized CD34- Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells from Various Sources.** *Stem Cells*, 18: 1-9.

- Huss, R; Lange, C; Weissinger, EM; Kolb, HJ; Thalmeier, K. 2000. **Evidence of Peripheral Blood-Derived, Plastic Adherent CD34<sup>low</sup> Hematopoietic Stem Cell Clones with Mesenchymal Stem Cell Characteristics.** *Stem Cells*, 18: 252-260.
- Ikeda, Y; Inoshima, Y; Kawaguchi, Y; Maeda, K; Kohmoto, M; Kai, C; Miyazawa, T; Mikami, T. 1998. **Protein-Binding Properties of the Putative AP-1 and ATF Sequences in the Feline Immunodeficiency Virus Long Terminal Repeat.** *Journal of General Virology*, 79: 95-99.
- Inoshima, Y; Kohmoto, M; Ikeda, Y; Yamada, H; Kawaguchi, Y; Tomonaga, K; Miyazawa, T; Kai, C; Umemura, T; Mikami, T. 1996. **Roles of the Auxiliary Genes and AP-1 Binding site in the Long terminal Repeat of Feline Immunodeficiency Virus in the Early Stage of Infection in Cats.** *Journal of Virology*, 70: 8518-8526.
- Ismail, SI; Kingsman, SM; Kingsman, AJ; Uden, M. 2000. **Split-Intron Retroviral Vectors: Enhanced Expression with Improved Safety.** *Journal of Virology*, 74:2365-2371.
- Jiang, A; Dornburg, R. 1999. **In Vivo Cell Type-Specific Gene Delivery with Retroviral Vectors That Display Single Chain Antibodies.** *Gene Therapy*, 6: 1892-1987.
- Johnston, JB; Power, C. 1999. **Productive Infection of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells by Feline Immunodeficiency Virus: Implications for Vector Development.** *Journal of Virology*, 73:2491-2498.
- Johnston, JB; Olson, ME; Rud, EW; Power, C. 2001. **Xenoinfection of Nonhuman Primates by Feline Immunodeficiency Virus.** *Current Biology*, 11: 1109-1113.
- Johnston, JC; Gasmi, M; Lim, LE; Elder, JH; Yee, JK; Jolly, DJ; Campbell, KP; Davidson, BL; Sauter, SL. 1999. **Minimum Requirements for Efficient Transduction of Dividing and Nondividing Cells by Feline Immunodeficiency Virus Vectors.** *Journal of Virology*, 73(6): 4991-5000.
- Journal of Gene Medicine. Dezembro de 2001. Gene Therapy Clinical Trials. <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- Kafri, T; Blomer, U; Peterson, DA; Gage, FH; Verma, IM.1997. **Sustained Expression of Genes Delivered Directly into Liver and Muscle by Lentiviral Vectors.** *Nature Genetics*, 17: 314-317.
- Kafri, T; van Praag, H; Gage, FH; Verma, IM. 2000. **Lentiviral Vectors: Regulated Gene Expression.** *Molecular Therapy*, 1: 516-521.

- Kaplitt, MG; Pfaff, DW. 1996. **Viral Vectors for Gene Delivery and Expression in the CNS.** *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, 10: 343-350.
- Kawaguchi, Y; Tomonaga, K; Maeda, K; Ono, M; Miyazawa, T; Kohmoto, M; Tohya, Y; Mikami, T. 1995. **The C/EBP Site in the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Long Terminal Repeat (LTR) Is Necessary for Its Efficient Replication and Is Also Involved in the Inhibition of FIV LTR-Directed Gene Expression by Pseudorabies Virus ICP4.** *Virology*, 208: 492-499.
- Khaw, BA; daSilva, J; Vural, I; Narula, J; Torchilin, VP. 2001. **Intracytoplasmic Gene Delivery for *In Vitro* Transfection with Cytoskeleton-Specific Immunoliposomes.** *Journal of Controlled Release*, 75: 199-210.
- Kim, HJ; Okamoto, Y; Ito, M; Takaue, Y; Kawano, Y; Watanabe, T; Yamaue, T; Tohda, Y; Ogose, T; Shimada, T; Shimosaka, A; Kuroda, Y. 1997. **Evaluation of a Cytokine Combination Including Thrombopoietin for Improved Transduction of a Retroviral Gene into G-CSF-Mobilized CD34+ Human Blood Cells.** *Stem Cells*, 15: 374-352.
- Kim, VN; Mitraphanous, K; Kingsman, SM; Kingsman, AJ. 1998. **Minimal Requirements for a Lentivirus Based on Human Immunodeficiency Virus Type 1.** *Journal of Virology*, 72:811-816
- Kitano, Y; Radu, A; Shaaban, A; Flake, AW. 2000. **Selection, Enrichment, and Culture Expansion of Murine Mesenchymal Progenitor Cells by Retroviral Transduction of Cycling Adherent Bone Marrow Cells.** *Experimental Hematology*, 28: 1460-1469.
- Klages, N; Zufferey, R; Trono, D. 2000. **A Stable System for the High-Titer Production of Multiply Attenuated Lentiviral Vectors.** *Molecular Therapy*, 2: 170-176.
- Knipe, DM; Howley, PM; Griffin, DE; Lamb, RA; Martin, MA; Roizman, B; Straus, SE. 2001. **Field's Virology.** Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, EUA. 4a. Edição.
- Kohn, DB. 1997. **Gene Therapy for Hematopoietic and Lymphoid Disorders.** *Clinical and Experimental Immunology*, 107:54-57.
- Kopen, GC; Prockop, DJ; Phinney, DG. 1999. **Marrow Stromal Cells Migrate Throughout Forebrain and Cerebellum, and They Differentiate into Astrocytes after Injection into Neonatal Mouse Brains.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 96: 10711-10716.

- Kume, A; Hashiyama, M; Suda, T; Ozawa, K. 1999. **Green Fluorescent Protein as a Selectable Marker of Retrovirally Transduced Hematopoietic Progenitors.** *Stem Cells*, 17: 226-232.
- Lange, C; Kaltz, C; Thalmeier, K; Kolb, HJ; Huss, R. 1999. **Hematopoietic Reconstitution of Syngeneic Mice with a Peripheral Blood-Derived Monoclonal CD34<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Thy-1<sup>low</sup>, c-kit<sup>+</sup> Stem Cell Line.** *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 8: 335-342.
- Laurent, S; Frances, V; Bastin, M. 1995. **Intrachromosomal Recombination Mediated by the Polyomavirus Large T Antigen.** *Virology*, 206: 227-233.
- Ledley, FD; Ledley, TS. 1998. **Pharmacokinetic Consideration in Somatic Gene Therapy.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30: 133-150.
- Lee, K; Majumdar, MK; Buyaner, D; Hendricks, JK; Pittenger, MF; Mosca, JD. 2001. **Human Mesenchymal Stem Cells Maintain Transgene Expression During Expansion and Differentiation.** *Molecular Therapy*, 3: 857-866.
- Lin, MT; Pulkkinen, L; Uitto, J; Yoon, K. 2000. **The Gene Gun: Current Applications in Cutaneous Gene Therapy.** *International Journal of Dermatology*, 39: 161-170.
- Liu, HS; Jan, MS; Chou, CK; Chen, PH; Ke, NJ. 1999. **Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells?** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260: 712-717.
- Liu, ML; Winther, BL; Kay, MA. 1996. **Pseudotransduction of Hepatocytes by Using Concentrated Pseudotyped Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein (VSV-G)-Moloney Murine Leukemia Virus-Derived Retrovirus Vectors: Comparison of VSV-G and Amphotropic Vectors for Hepatic Gene Transfer.** *Journal of Virology*, 70: 2497-2502.
- Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P. 1999. **Molecular Cell Biology.** Book News, Inc. Portland, OR, EUA. 3a edição.
- Lutzko, C; Kruth, S; Abrams-Ogg, AC; Lau, K; Li, L; Clark, BR; Ruedy, C; Nanji, S; Foster, R; Kohn, D; Shull, R; Dube, ID. 1999. **Genetically Corrected Autologous Stem Cells Engraft, but Host Immune Responses Limit Their Utility in Canine Alpha-L-Iduronidase Deficiency.** *Blood*, 93: 1895-1905.
- McCormack, JE; Edwards, W; Sensintaffer, J; Lillegren, L; Kozloski, M; Brumm, D; Karavodin, L; Jolly, DJ; Greengard, J. 2001. **Factors Affecting Long-Term Expression of a Secreted Transgene Product after Intravenous Administration of a Retroviral Vector.** *Molecular Therapy*, 3: 516-525.



- Mezey, E; Chandross, KJ; Harta, G; Maki, RA; McKercher, SR. 2000. **Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated *In Vivo* from Bone Marrow.** *Science*, 290: 1779-1782.
- Miller, RJ; Cairns, JS; Bridges, S; Sarver, N. 2000. **Human Immunodeficiency Virus and AIDS: Insights from Animal Lentiviruses.** *Journal of Virology*, 74: 7187-7195.
- Mitrophanous, K; Yoon, S; Rohll, J; Patil, D; Wilkes, F; Kim, V; Kingsman, S; Kingsman, A; Mazarakis, N. 1999. **Stable Gene Transfer to the Nervous System Using a Non-Primate Lentiviral Vector.** *Gene Therapy*, 6: 1808-1818.
- Miyazawa, T; Kawaguchi, Y; Kohmoto, M; Sakuragi, J; Adachi, A; Fukusawa, M; Mikami, T. 1992. **Production of Feline Immunodeficiency Virus in Feline and Non-Feline Non-Lymphoid Cell Lines by Transfection of an Infectious Molecular Clone.** *Journal of General Virology*, 73: 1543-1546.
- Miyazawa, T; Tomonaga, K; Kawaguchi, Y; Mikami, T. 1994. **The Genome of Feline Immunodeficiency Virus.** *Archives of Virology*, 134:221-234
- Miyoshi, H; Takahashi, M; Gage, FH; Verma, IM. 1997. **Stable and Efficient Gene Transfer Into the Retina Using an HIV-Based Lentiviral Vector.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94:10319-10323.
- Miyoshi, H; Blomer, U; Takahashi, M; Gage, FH; Verma, IM. 1998. **Development of a Self-Inactivating Lentivirus Vector.** *Journal of Virology*, 72:8150-8157.
- Miyoshi, H; Smith, KA; Mosier, DE; Verma, IM; Torbett, BE. 1999. **Transduction of Human CD34<sup>+</sup> Cells That Mediate Long-Term Engraftment of NOD/SCID Mice by HIV Vectors.** *Science*, 283:682-686.
- Movassagh, M; Boyer, O; Burland, MC; Leclercq, V; Klatzmann, D; Lemoine, FM. 2000. **Retrovirus-Mediated Gene Transfer into T Cells: 95% Transduction Efficiency without Further *in Vitro* Selection.** *Human Gene Therapy*, 11: 1189-1200.
- Muraglia, A; Cancedda, R; Quarto, R. 2000. **Clonal Mesenchymal Progenitors from Human Bone Marrow Differentiate *In Vitro* According to a Hierarchical Model.** *Journal of Cell Science*, 113: 1161-1166.
- Naldini, L; Blömer, U; Gage, FH; Trono, D; Verma, IM. 1996a. **Efficient Transfer, Integration, and Sustained Long-Term Expression of the Transgene in Adult Rat Brains Injected with a Lentiviral Vector.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93: 11382-11388.

- Naldini, L; Blömer, U; Gally, P; Ory, D; Mulligan, R; Gage, FH; Verma, IM; Trono, D. 1996b. **In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector.** *Science*, 272: 263-267.
- Naldini, L. 1998a. **Lentiviruses as Gene Transfer Agents for Delivery to Non-Dividing Cells.** *Current Opinion in Biotechnology*, 9:457-463.
- Naldini, L. 1998b. **Viral Vectors for Gene Therapy.** *Trends in Biotechnology*, 16: 457-463.
- Nardi, NB; Alfonso, ZZ. 1999. **The Hematopoietic Stroma.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 601-609.
- Naylor, LH. 1999. **Reporter Gene Technology: The Future Looks Bright.** *Biochemical Pharmacology*, 58: 749-757.
- Newbound, GC; Cooper, JR; O'Rourke, JP; Baskin, CR; Bunnell, BA. 2001. **Analysis of Gene Transfer Efficiency of Retrovirus Producer Cell Transplantation for In Situ Gene Transfer to Hematopoietic Cells.** *Experimental Hematology*, 29:163-173.
- OBA. Office of Biotechnology Activities. Dezembro de 2001. Recombinant Advisory Committee (RAC), National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA. <http://www.nih.gov/od/oba/>
- Ogawa, H; Inouye, S; Tsuji, FI; Yasuda, K; Umesono, K. 1995. **Localization, Trafficking, and Temperature-Dependence of the *Aequorea* Green Fluorescent Protein in Cultured Vertebrate Cells.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 11899-11903.
- Ogawa, M; Porter, PN; Nakahata, T. 1983. **Renewal and Commitment to Differentiation of Hemopoietic Stem Cells (an Interpretative Review).** *Blood*, 61: 823-829.
- Oh, YK; Kim, JP; Hwang, TS; Ko, JJ; Kim, JM; Yang, JS; Kim, CK. 2001. **Nasal Absorption and Biodistribution of Plasmid DNA: na Alternative Route of DNA Vaccine Delivery.** *Vaccine*, 19: 4519-4525.
- Oku, N; Yamazaki, Y; Matsuura, M; Sugiyama, M; Hasegawa, M; Nango, M. 2001. **A Novel Non-Viral Gene Transfer System, Polycation Liposomes.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52: 109-118.
- Olmsted, RA; Barnes, AK; Yamamoto, JK; Hirsch, VM; Purcell, RH; Johnson, PR. 1989a. **Molecular Cloning of Feline Immunodeficiency Virus.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86: 2448-2452.

- Olmsted, RA; Hirsch, VM; Purcell, RH; Johnson, PR. 1989b. **Nucleotide Sequence Analysis of Feline Immunodeficiency Virus: Genome Organization and Relationship to other Lentivirus.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86:8088-8092.
- Ory, DS; Neugeboren, BA; Mulligan, RC. 1996. **A Stable Human-Derived Packaging Cell Line for Production of High Titer Retrovirus/Vesicular Stomatitis Virus G Pseudotypes.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93:11400-11406.
- Pacchia, AL; Adelson, ME; Kaul, M; Ron, Y; Dougherty, JP. 2001. **An Inducible Packaging Cell System for Safe, Efficient Lentiviral Vector Production in the Absence of HIV-1 Accessory Proteins.** *Virology*, 282: 77-86.
- Park, F; Kay, MA. 2001. **Modified HIV-1 Based Lentiviral Vectors Have an Effect on Viral Transduction Efficiency and Gene Expression *in Vitro* and *in Vivo*.** *Molecular Therapy*, 4: 164-173.
- Pastorino, F; Stuart, D; Ponzoni, M; Allen, TM. 2001. **Targeted Delivery of Antisense Oligonucleotides in Cancer.** *Journal of Controlled Release*, 74: 69-75.
- Patience, C; Takeuchi, Y; Cosset, FL; Weiss, RA. 1998. **Packaging of Endogenous Retroviral Sequences in Retroviral Vectors Produced by Murine and Human Packaging Cells.** *Journal of Virology*, 72: 2671-2676.
- Pear, WS; Nolan, GP; Scott, ML; Baltimore, D. 1993. **Production of High Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection**
- Peng, KW. 1999. **Strategies for Targeting Therapeutic Gene Delivery.** *Molecular Medicine Today*, 5: 448-453.
- Phillips, K; Gentry, T; McCowage, G; Gilboa, E; Smith, C. 1996. **Cell-Surface Markers for Assessing Gene Transfer into Human Hematopoietic Cells.** *Nature Medicine*, 2: 1154-1156.
- Phillips, TR; Lamont, AC; Konings, AM; Schacklett, CA; Hamson, CA; Luciw, PA; Elder, JH. 1992. **Identification of the Rev Transactivation and Rev-Responsive Elements of Feline Immunodeficiency Virus.** *Journal of Virology*, 66:5464-5471.
- Pittenger, MF; Mackay, AM; Beck, SC; Jaiswal, RK; Douglas, R; Mosca, JD; Moorman, MA; Simonetti, DW; Craig, S; Marshak, DR. 1999. **Multilineage Potential of Adult Mesenchymal Stem Cells.** *Science*, 284: 143-147.

- Poeschla, E; Corbeau, P; Wong-Stall, F. 1996. **Development of HIV Vectors for Anti-HIV Gene Therapy.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93: 11395-11399.
- Poeschla, EM; Wong-Staal, F; Looney, DJ. 1998a. **Efficient Transduction of Nondividing Human Cells by Feline Immunodeficiency Virus Lentiviral vectors.** *Nature Medicine* 4: 354-357.
- Poeschla, EM; Gilbert, J; Li, X; Huang, S; Ho, A; Wong-Staal, F. 1998b. **Identification of a Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Encapsidation Determinant and Transduction of Nondividing Human Cells by HIV-2 Based Lentiviral Vectors.** *Journal of Virology*, 72: 6527-6536.
- Poeschla, EM; Looney, DJ. 1998. **CXCR4 Is required by a Nonprimate Lentivirus: Heterologous Expression of Feline Immunodeficiency Virus in Human, Rodent and Feline Cells.** *Journal of Virology*, 72:6858-6866.
- Pouton, CW; Seymour, LW. 1998. **Key Issues in Non-viral Gene Delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34: 3-19.
- Pranke, P; Failace, RR, Allebrandt, WF; Steibel, G; Schmidt, F; Nardi, NB. 2001. **Hematologic and Immunophenotypic Characterization of Human Umbilical Cord Blood.** *Acta Haematologica*, 105: 71-76.
- Ramezani, A; Hawley, TS; Hawley, RG. 2000. **Lentiviral Vectors for Enhanced Gene Expression in Human Hematopoietic Cells.** *Molecular Therapy*, 2: 458-469.
- Reading, SA; Edwards, MJ; Dimmock, NJ. 2001. **Increasing the Efficiency of Virus Infectivity Assays: Small Inoculum Volumes Are as Effective as Centrifugal Enhancement.** *Journal of Virological Methods*, 98: 167-169.
- Rebel, VI; Tanaka, M; Lee, JS; Hartnett, S; Pulsipher, M; Nathan, DG; Mulligan, RC; Sieff, CA. 1999. **One-Day Ex Vivo Culture Allows Effective Gene Transfer into Human NOD/SCID Repopulating Cells Using High-Titer Vesicular Stomatitis Virus G Protein Pseudotyped Retrovirus.** *Blood*, 93: 2217-2224.
- Reiser, J; Harmison, G; Stahl, SK; Brady, RO; Karlson, S. Schubert, M. 1996. **Transduction of Nondividing Cells by Using Pseudotyped Defective High-Titer HIV Type 1 Particles.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93:15266-15271.
- Reynolds, PN; Feng, M; Curiel, DT. 1999. **Chimeric Viral Vectors – the Best of Both Worlds?** *Molecular Medicine Today*, 5:25-31.

- Rivière, I; Brose, K; Mulligan, RC. 1995. **Effects of Retroviral Vector Design on Expression of Human Adenosine Deaminase in Murine Bone Marrow Transplant Recipients Engrafted with Genetically Modified Cells.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 92: 6733-6737.
- Robbins, PD; Tahara, H; Ghivizzani, SC. 1998. **Viral vectors for Gene Therapy.** *Trends in Biotechnology*, 16:35-40.
- Romano, G; Pacilio, C; Giordano, A. 1999. **Gene Transfer Technology in Therapy: Current Applications and Future Goals.** *Stem Cells*, 17:191-202.
- Romano, G; Michell, P; Pacilio, C; Giordano, A. 2000. **Latest Developments in Gene Transfer Technology: Achievements, Perspectives, and Controversies over Therapeutic Applications.** *Stem Cells*, 18:19-39.
- Ropert, C. 1999. **Liposomes as a Gene Delivery System.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 163-169.
- Rosenzweig, M; Connole, M; Glickman, R; Yue, S-PS; Noren, B; DeMaria, M; Johnson, RP. 2001. **Induction of Cytotoxic T Lymphocyte and Antibody Responses to Enhanced Green Fluorescent Protein Following Transplantation of Transduced CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Cells.** *Blood*, 97: 1951-1959.
- Rovozzo, GC; Burke, CN. 1973. **A Manual of Basic Virological Techniques.** Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, EUA.
- Safinya, CR. 2001. **Structures of Lipid-DNA complexes: Supramolecular Assembly and Gene Delivery.** *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 440-448.
- Salmon, P; Kindler, V; Ducrey, O; Chapuis, B; Zubler, RH; Trono, D. 2000. **High-Level Transgene Expression in Human Hematopoietic Progenitors and Differentiated Blood Lineages after Transduction with Improved Lentiviral Vectors.** *Blood*, 96: 3392-3398.
- Sambrook, J; Fritsch, E; Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, EUA. 2a edição.
- Sato, T; Ishii, T; Okahata, Y. 2001. **In Vitro Gene Delivery Mediated by Chitosan. Effect of pH, Serum, and Molecular Mass of Chitosan on the Transfection Efficiency.** *Biomaterials*, 22: 2075-2080.
- Schacklett, BL; Luciw, PA. 1994. **Analysis of the VIF Gene of Feline Immunodeficiency Virus.** *Virology*, 204: 860-867.
- Schambach, A; Wodrich, H; Hildinger, M; Bohne, J; Kräusslich, HG; Baum, C. 2000. **Context Dependence of Different Modules for Posttranscriptional**

- Enhancement of Gene Expression from Retroviral Vectors.** *Molecular Therapy*, 2: 435-445.
- Schnolzer, M; Rackwitz, HR; Gustchina, A; Laco, GS; Wlodawer, A; Elder, JH; Kent, SBH. 1996. **Comparative Properties of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Proteinases Prepared by Total Chemical Synthesis.** *Virology*, 224: 268-275.
- Shabram, P; Aguilar-Cordova, E. 2000. **Multiplicity of Infection/Multiplicity of Confusion.** *Molecular Therapy*, 2: 420-421.
- Sheridan, PL; Bodner, M; Lynn, A; Phuong, TK; DePolo, NJ; de la Vega, DJ; O'Dea, J; Nguyen, K; McCormack, JE; Driver, DA; Townsend, K; Ibañez, CE; Sajjadi, NC; Greengard, JS; Moore, MD; Respass, J; Chang, SMW; Dubensky, TW; Jolly, DJ; Sauter, SL. 2000. **Generation of Retroviral Packaging and Producer Cell Lines for Large-Scale Vector Production and Clinical Application: Improved Safety and High Titer.** *Molecular Therapy*, 2: 262-275.
- Sirven, A; Pflumio, F; Zennou, V; Titeux, M; Vainchenker, W; Coulombel, L; Dubart-Kupperschmitt, A; Charneau, P. 2000. **The Human Immunodeficiency Virus Type-1 Central DNA Flap Is a Crucial Determinant for Lentiviral Vector Nuclear Import and Gene Transduction of Human Hematopoietic Stem Cells.** *Blood*, 96: 4103-4110.
- Sirven, A; Ravet, E; Charneau, P; Zennou, V; Coulombel, L; Guetard, D; Pflumio, F; Dubart-Kupperschmitt, A. 2001. **Enhanced Transgene Expression in Cord Blood CD34<sup>+</sup>-Derived Hematopoietic Cells, Including Developing T Cells and NOD/SCID Mouse Repopulating Cells, Following Transduction with Modified TRIP Lentiviral Vectors.** *Molecular Therapy*, 3: 438-448.
- Somiari, S; Glasspool-Malone, J; Drabick, JJ; Gilbert, RA; Jaroszeski, MJ; Malone, RW. 2000. **Theory and *In Vivo* Application of Electroporative Gene Delivery.** *Molecular Therapy*, 2: 178-187.
- Soneoka, Y; Cannon, PM; Ramsdale, EE; Griffiths, JC; Romano, G; Kingsman, SM; Kingsman, AJ. 1995. **A Transient Three-Plasmid Expression System for the Production of High Titer Retroviral Vectors.** *Nucleic Acids Research*, 23:628-633.
- Spack, EG; Sorgi, FL. 2001. **Developing Non-viral DNA Delivery Systems for Cancer and Infectious Disease.** *Drug Discovery Today*, 6: 186-197.

- Sparacio, S; Pfeiffer, T; Schaal, H; Bosch, V. 2001. **Generation of a Flexible Cell Line with Regulatable, High-Level Expression of HIV Gag/Pol Particles Capable of Packaging HIV-Derived Vectors.** *Molecular Therapy*, 3: 602-612.
- Sparger, EE; Shacklett, BL; Renshaw-Gegg, L; Barry, PA; Pedersen, NC; Elder, JH; Luciw, PA. 1992. **Regulation of Gene Expression Directed by the Long Terminal Repeat of the Feline Immunodeficiency Virus.** *Virology*, 187: 165-177.
- Srinivasakumar, N; Chazal, N; Prasad, CH-MS. 1997. **The Effect of Viral Regulatory Protein Expression on Gene Delivery by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors Produced in Stable Packaging Cell Lines.** *Journal of Virology*, 71: 5841-5848.
- Stein, CS; Kang, Y; Sauter, SL; Townsend, K; Staber, P; Derksen, TA; Martins, I; Qian, J; Davidson, BL; McCray, PB Jr. 2001. **In Vivo Treatment of Hemophilia A and Mucopolysaccharidosis Type VII Using Nonprimate Lentiviral Vectors.** *Molecular Therapy*, 3: 850-856.
- Strair, R; Towle, M; Smith, B. 1990. **Retroviral Mediated Gene Transfer into Bone Marrow Progenitor Cells: Use of Beta-Galactosidase as a Selectable Marker.** *Nucleic Acid Research*, 18: 4759-4762.
- Strauss, M. 1997. **As Estratégias de Terapia pelos Genes.** *Anais Nestlé*, 54: 1-16.
- Strayer, DS; Pomerantz, RJ; Yu, M; Rosenzweig, M; BouHamdan, M; Yurasov, S; Johnson, RP; Goldstein, H. 2000. **Efficient Gene Transfer to Hematopoietic Progenitor Cells Using SV-40 Derived Vectors.** *Gene Therapy*, 7: 886-895.
- Tachibana, R; Harashima, H; Shinohara, Y; Kiwada, H. 2001. **Quantitative Studies on the Nuclear Transport of Plasmid DNA and Gene Expression Employing Nonviral Vectors.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52: 219-226.
- Takeuchi, Y; Cosset, FL; Lachmann, PJ; Okada, H; Weiss, RA; Collins, MKL. 1994. **Type C retrovirus Inactivation by Human Complement Is Determined by Both the Viral Genome and Producer Cell.** *Journal of Virology*, 68: 8001-8007.
- Talbott, RL; Sparger, EE; Lovelace, KM; Fitch, WM; Pedersen, NC; Luciw, PA; Elder, JH. 1989. **Nucleotide Sequence and Genomic Organization of Feline Immunodeficiency Virus.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 86:5743-5747.
- Tanabe, T; Yamamoto, JK. 2001. **Phenotypic and Functional Characteristics of FIV Infection in the Bone Marrow Stroma.** *Virology*, 282: 113-122.

- Teixeira, LA; Fricke, CH; Bonorino, CB; Bogo, MR; Nardi, NB. 2001. **An Efficient Gene Transfer System for Hematopoietic Cell Line Using Transient and Stable Vectors.** *Journal of Biotechnology*, 88: 159-165.
- Tisdale, JF; Hanazono, Y; Sellers, SE; Agricola, BA; Metzger, ME; Donahue, RE; Dunbar, CE. 1998. **Ex Vivo Expansion of Genetically Marked Rhesus Peripheral Blood Progenitor Cells Results in Diminished Long-Term Repopulating Ability.** *Blood*, 92: 1131-1141.
- Tomonaga, K; Miyazawa, T; Kawaguchi, Y; Kohmoto, M; Inoshima, Y; Mikami, T. 1994. **Comparison of the Rev Transactivation of Feline Immunodeficiency Virus in Feline and Non-Feline Cell Lines.** *Journal of Veterinary Medical Science*, 56: 199-201.
- Tomonaga, K; Mikami, T. 1996. **Molecular Biology of the Feline Immunodeficiency Virus Auxillary Genes.** *Journal of General Virology* 77:1611-1621.
- Trono, D. 2000. **Lentiviral Vectors: Turning a Deadly Foe into a Therapeutic Agent.** *Gene Therapy*, 7: 20-23.
- Vahlenkamp, TW; Verschoor, EJ; Schuurman, NNMP; van Vliet, ALW; Horzinek, MC; Egberink, HF; de Ronde, A. 1997. **A Single Amino Acid Substitution in the Transmembrane Envelope Glycoprotein of Feline Immunodeficiency Virus Alters Cellular Tropism.** *Journal of Virology*, 71: 7132-7135.
- Varga, CM; Hong, K; Lauffenburger, DA. 2001. **Quantitative Analysis of Synthetic Gene Delivery Vector Design Properties.** *Molecular Therapy*, 4: 438-446.
- Verma, IM. 1990. **Gene Therapy.** *Scientific American*, 263 (5):34-41.
- Verma, IM; Somia, N. 1997. **Gene Therapy – Promises, Problems and Prospects.** *Nature*, 389: 239-242.
- Verma, IM. 2000. **Gene Therapy: the Need for Basic Science.** *Molecular Therapy*, 2: 531.
- Verschoor, EJ; Boven, LA; Blaak, H; van Vliet, ALW; Horzinek, MC; de Ronde, A. 1995. **A Single Mutation within the V3 Envelope Neutralization Domain of Feline Immunodeficiency Virus Determines Its Tropism for CRFK Cells.** *Journal of Virology*, 69: 4752-4757.
- Wagaman, PC; Hasselkus-Light, CS; Henson, M; Lerner, DL; Phillips, TR; Elder, JH. 1993. **Molecular Cloning and Characterization of Deoxyuridine Triphosphatase from Feline Immunodeficiency Virus (FIV).** *Virology*, 196: 451-457.



- Wang, G; Slepushkin, V; Zabner, J; Keshavjee, S; Johnston, J; Sauter, SL; Jolly, DJ; Dubensky Jr, TW; Davidson, BL; McCray Jr, PB. 1999. **Feline Immunodeficiency Virus Vectors Persistently Transduce Nondividing Airway Epithelia and Correct the Cystic Fibrosis Defect.** *Journal of Clinical Investigation*, 104: 55-62.
- Wang, X; Appukattan, B; Ott, S; Patel, R; Irvine, J; Song, J; Park, J-HC; Smith, R; Stout, JT. 2000. **Efficient and Sustained Transgene Expression in Human Corneal Cells Mediated by a Lentiviral Vector.** *Gene Therapy*, 7: 196-200.
- Whetton, AD; Graham, GJ. 1999. **Homing and Mobilization in the Stem Cell Niche.** *Trends in Cell Biology*, 9: 233-238.
- Willet, BJ; Picard, L; Hosie, MJ; Turner, JD; Adema, K; Claphan, PR. 1997. **Shared Usage of the Chemokine Receptor CXCR4 by the Feline and Human Immunodeficiency Viruses.** *Journal of Virology*, 71(9): 6407-6415
- Wu, X; Wakefield, JK; Liu, H; Xiao, H; Kralovics, R; Prchal, JT; Kappes, JC. 2000. **Development of a Novel Trans-Lentiviral Vector That Affords Predictable Safety.** *Molecular Therapy*, 2: 47-55.
- Xu, K; Ma, H; McCrown, TJ; Verma, IM; Kafri, T. 2001. **Generation of a Stable Cell Line Producing High-Titer Self-Inactivating Lentiviral Vectors.** *Molecular Therapy*, 3: 97-104.
- Yamada, K; Olsen, JC; Patel, M; Rao, KW; Walsh, CE. 2001. **Functional Correction of Fanconi Anemia Group C Hematopoietic Cells by the Use of a Novel Lentiviral Vector.** *Molecular Therapy*, 3: 485-490.
- Yee, JK; Miyanochara, A; LaPorte, P; Bouic, K; Burns, JC; Friedmann, T. 1994. **A General Method for the Generation of High-Titer, Pantropic Retroviral Vectors: Highly Efficient Infection of Primary Hepatocytes.** *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 91: 9564-9568.
- Zhu, Y; Feuer, G; Day, SL; Wrzesinski, S; Planelles, V. 2001. **Multigene Lentiviral Vectors Based on Differential Splicing and Translational Control.** *Molecular Therapy*, 4: 375-382.
- Ziegler, BL; Valtieri, M; Porada, GA; De Maria, R; Muller, R; Masella, B; Gabbianelli, M; Casella, I; Pelosi, E; Bock, T; Zanjani, ED; Peschle, C. 1999. **KDR Receptor: A Key Marker Defining Hematopoietic Stem Cells.** *Science*, 285: 1553-1558.
- Zufferey, R; Dull, T; Mandel, RJ; Bukovsky, A; Quiroz, D; Naldini, L; Trono, D. 1998. **Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient *In Vivo* Gene Delivery.** *Journal of Virology*, 72:9873-9880.