

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LARA CRISTINA DIAS

Terapia gênica com adenovírus carreando o gene da eritropoietina humana nas glândulas lacrimal e salivar para tratar o olho seco por cloreto de benzalcônio

**RIBEIRÃO PRETO
2019**

LARA CRISTINA DIAS

Terapia gênica com adenovírus carreando o gene da eritropoietina humana nas glândulas lacrimal e salivar para tratar o olho seco por cloreto de benzalcônio

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

RIBEIRÃO PRETO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Lara Cristina

Terapia gênica com adenovírus carreando o gene da eritropoietina humana nas glândulas lacrimal e salivar para tratar o olho seco por cloreto de benzalcônio. Ribeirão Preto, 2019.

83 p. : 11il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular..

Orientador: Rocha, Eduardo Melani.

1. Adenovírus. 2. Córnea. 3. Eritropoietina. 4. Glândula Lacrimal. 5. Glândula Salivar. 6. Vetor Viral.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Lara Cristina Dias

Título: Terapia gênica com adenovírus carreando o gene da eritropoietina humana nas glândulas lacrimal e salivar para tratar o olho seco induzido por cloreto de benzalcônio.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Mecanismos Fisiopatológicos nos Sistemas Visual e Audio-Vestibular.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Deus, Pai da Eternidade e Príncipe da Paz.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha** por toda sabedoria, paciência e dedicação em todos esses anos de ensinamentos.

Aos meus pais, **Cezar** e **Ana Esméria**, pelo interminável amor por mim e por me apoiarem em mais esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos **Ana Carolina** e **Guilherme** por sempre estarem ao meu lado e serem grandes amigos.

Ao meu marido **Lucas** e a minha filha **Alice** por me mostrar o verdadeiro significado da palavra amor.

Agradecimentos

A minha irmã **Ana Carolina** por acreditar em mim e sempre me ajudar em todas as coisas e que foi essencial para o desenvolvimento deste projeto. Obrigada por toda colaboração, paciência e ensinamentos.

Ao **Luis Fernando** pela sincera amizade, pelo apoio e eficiência em todas as atividades.

À toda equipe técnica da casa 19, **Marina Fantucci** e **Adriana Murashima** pela amizade e companheirismo e ensinamentos a mim passados.

À **Lilian Esleine**, técnica do laboratório multiusuários pela paciência e boa vontade em me ensinar técnicas deste trabalho.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)**, pela grande oportunidade de realização do meu doutorado.

Aos funcionários do **Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMRP** em especial a **Maria Cecília** por toda sua paciência, orientação e carinho.

Aos funcionários da **Cirurgia Experimental da FMRP**, em especial aos técnicos **Danniely N. S. Barros** e **José Carlos (Carlinhos)** e aos bioteristas **Paulo R. Castilho** e **Ariane M. S. Santana** por serem dedicados a pesquisa e por sempre me receberem com carinho.

Apoio Financeiro

Aos apoios financeiros por toda colaboração e serviços prestados a esta pesquisa:

- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº 2015/20580-7 e 2014/22451-7);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (nº: 474450/2012-0);
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (Código financeiro 001);
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) (669/2018);
- Research Core of Ocular Physiopathology and Therapeutics from University of São Paulo (NAP-FTO) (nº 12.1.25431.01.7).

DIAS, L.C. **Terapia gênica com adenovírus carreando o gene da eritropoietina humana nas glândulas lacrimal e salivar para tratar o olho seco por cloreto de benzalcônio**. 2019. 83f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A Inflamação, trauma e toxicidade da córnea podem levar ao retardo na cicatrização, perda de nervos, neovascularização, opacidade e deficiência visual. Embora muitas terapias tenham sido propostas, elas apresentam resultados modestos ou transitórios. A transferência de genes para glândulas exócrinas é uma estratégia a ser considerada devido ao potencial para tratar não apenas o tecido alvo, mas também os órgãos servidos por sua secreção, favorecidos por sua acessibilidade, sem necessitar de medicação periódica.

Objetivo: Os objetivos deste trabalho foram: a) analisar as alterações da glândula lacrimal (GL) e da córnea induzidas por um adenovírus (Ad) que codifica o gene da eritropoietina humana (*EPO*) liberado para GL e b) avaliar essa estratégia em toxicidade da córnea de cloreto de benzalcônio (BAC).

Métodos: Ratos *Wistar* machos foram divididos em cinco grupos: 1) controle naíve, 2) BAC, 3) AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita, 4) AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita + BAC e 5) AdLTR2EF1 α -hEPO na glândula salivar direita (GS) + BAC. Os grupos AdLTR2EF1 α -hEPO receberam a injeção do vírus (25 μ l, 10¹⁰ partículas / ml) diretamente na GL ou GS direita. Os grupos BAC receberam colírio BAC 0,2% na córnea, duas vezes ao dia. Os tecidos foram colhidos no sétimo dia após a injeção. Os testes incluíram secreção lacrimal, detecção de RNAm de hEPO por qPCR, e H&E da GL e GS, imunofluorescência de GL para hEPO e ELISA da GL para citocinas pró inflamatórias.

Resultados: o RNAm de hEPO estava presente na GL. A proteína *EPO* foi observada em células epiteliais ductais. BAC reduziu a secreção de lágrimas, mas esta redução foi evitada por AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita + BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita + BAC ($p = 0,017$). O TNF- α e a IL-1 β aumentaram na GL quando exposto ao AdLTR2EF1 α -hEPO ($p = 0,0115$ e $p = 0,0397$, respectivamente). Os epitélios da córnea eram mais finos no grupo tratado com BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO GL ($p = 0,0159$). O hematócrito aumentou apenas no grupo AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita ($p = 0,01$).

Resumo

Conclusões: A transfecção AdLTR2EF1 α -hEPO de GL e GS induziu alterações locais e sistêmicas em ratos. É importante ressaltar que o AdLTR2EF1 α -hEPO atenuou a redução tóxica mediada por BAC no fluxo lacrimal, sugerindo que a terapia gênica viral na GL pode servir como tratamento para doenças da córnea. No entanto, estudos futuros devem considerar o tropismo do vetor viral, a biodistribuição e produtos gênicos terapêuticos eficazes para doenças da superfície ocular.

Palavras-chave: adenovírus, córnea, eritropoietina, glândula lacrimal, glândula salivar, vetor viral.

DIAS, L.C. **Adenovirus gene therapy by carrying the human erythropoietin gene in the lacrimal and salivary glands to treat benzalkonium chloride dry eye.** 2019. 83f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

Corneal inflammation, trauma, and toxicity can lead to delayed wound healing, nerve loss, neovascularization, opacity, and visual impairment. Although many therapies have been proposed for these challenges, they have limited or transient results. Gene transfer to exocrine glands is an interesting strategy due to the potential to treat not only the target tissue but also the organs served by its secretion, favored by its accessibility and eliminating the need of frequent medication.

Purpose: The aims of this work were a) to analyze the changes in the lacrimal gland (LG) and cornea induced by an adenovirus (Ad) encoding the human erythropoietin (EPO) gene delivered to the LG and b) to evaluate this strategy on benzalkonium chloride (BAK) corneal toxicity.

Methods: Male *Wistar* rats were divided into five groups: 1) naïve control, 2) BAK, 3) AdLTR2EF1 α -hEPO in the right LG (RLG), 4) AdLTR2EF1 α -hEPO RLG + BAK and 5) AdLTR2EF1 α -hEPO in the right salivary gland (RSG) + BAK. AdLTR2EF1 α -hEPO groups received the virus injection (25 μ l, 10¹⁰ particles / ml) directly into the right GL or GS. The BAK groups received 0.2% BAK in the cornea twice a day. Tissues were harvested at day 7 after injection. The tests included tear secretion, hEPO mRNA detection by qRT-PCR, LG and cornea histology, LG immunofluorescence for hEPO and LG ELISA for cytokines.

Results: hEPO mRNA was present in the AdLTR2EF1 α -hEPO RLG and RSG. EPO protein was observed in ductal epithelial cells. BAK reduced tear secretion, but this reduction was prevented by AdLTR2EF1 α -hEPO RLG + BAK and AdLTR2EF1 α -hEPO RSG + BAK ($p=0.017$). TNF- α and IL-1 β increased in the LG exposed to AdLTR2EF1 α -hEPO ($p=0.0115$ and $p=0.0397$, respectively). The corneal epithelia were thinner in the BAK AdLTR2EF1 α -hEPO GL treated group ($p=0.0159$). Hematocrit increased only in the AdLTR2EF1 α -hEPO RSG group ($p=0.01$).

Conclusions: AdLTR2EF1 α -hEPO transfection of rat LG and SG induces local and systemic changes in rats. Importantly, AdLTR2EF1 α -hEPO attenuated the BAK-mediated toxic reduction in tear flow, suggesting that viral gene therapy in the LG can serve as a treatment for corneal diseases. However, future studies must consider

Abstract

viral vector tropism, biodistribution and effective therapeutic gene products for ocular surface diseases.

Keywords: adenovirus, cornea, erythropoietin, lacrimal gland, salivary gland, viral vector.

Lista de Figuras

- Figura 1 –** Unidade Funcional Lacrimal Integrada
- Figura 2 –** Terapia gênica usando um vetor adenovírus
- Figura 3 –** Esquemática do adenovírus utilizado no estudo e cedido pelo Dr. Changyu Zheng do Instituto Nacional da Saúde, Departamento de Saúde e Serviços Humanos, Bethesda, Maryland, EUA.
- Figura 4 –** Desenho do estudo.
- Figura 5 –** Análise da morfologia da GL e GS coradas por H&E.
- Figura 6 –** Espessura do epitélio da córnea nos grupos controle e AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita.
- Figura 7 –** Expressão das proteínas IL-1 β e TNF- α na GL pelo método de ELISA.
- Figura 8 –** Expressão do RNAm hEPO nos tecidos GL, rim e fígado nos grupos controle e AdLTR2EF1 α -hEPO.
- Figura 9 –** Imunofluorescência marcando a expressão de hEPO em células ductais de GL.
- Figura 10 –** Secreção lacrimal (mm) avaliada nos grupos controle, BAC, AdLTR2EF1 α -hEPO GL + BAC, AdLTR2EF1 α -hEPO GS + BAC.
- Figura 11 –** Espessura epitelial da córnea nos grupos controle, BAC, AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita + BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO na GS direita + BAC.
- Figura 12 –** Hematócrito dos grupo controle, AdLTR2EF1 α -hEPO na GL + BAC, AdLTR2EF1 α -hEPO na GS + BAC.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Grupos em estudo

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ad	Adenovírus
AdLTR2EF1 α -hEPO	Adenovírus recombinante com o gene da eritropoietina humana
ARVO	<i>Association of Research in Vision and Ophthalmology</i>
BAC	Cloreto de benzalcônio
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de ética e pesquisa em animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbente Assay
EPO	Eritropoietina
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GL	Glândula lacrimal
GS	Glândula salivar
hEPO	Eritropoietina humana
rhEPO	Receptor da eritropoietina humana
H&E	Hematoxilina e eosina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mm	Milímetro
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitativo PCR
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SO	Superfície ocular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
USP	Universidade de São Paulo
α	Alfa
β	Beta
μ l	Microlitro

Sumário

1. Introdução	14
1.1. Revisão da literatura	15
1.2. Glândula lacrimal e superfície ocular	16
1.3. Glândula salivar	18
1.4. Inflamação	19
1.5. Terapia gênica	20
1.6. Hormônio hEPO	23
1.7. Adenovírus recombinante com o gene da eritropoietina humana (AdLTR2EF1 α -hEPO)	25
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. Material e Métodos	30
3.1. Desenho do estudo	31
3.2. Vetor	31
3.3. Transferência gênica in vivo	33
3.4. Avaliação da superfície ocular	33
3.5. Avaliação da secreção lacrimal	33
3.7. Coleta e análise das amostras	34
3.8. Coloração com hematoxilina de Harris e eosina (H&E)	34
3.9. Imunofluorescência	35
3.10. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	35
3.11. Quantitativa PCR em tempo real (qPCR) para eritropoietina	36
3.12. Análise estatística	36
4. Resultados	38
4.1. Segurança do AdLTR2EF1 α -hEPO na GL dos ratos	39
4.2. Expressão de IL-1 β e TNF- α na GL	40
4.3. Análise da expressão do RNAm hEPO em GL, fígado e rim por qPCR	41
4.4. Imunofluorescência	42
4.5. Comparação clínica da toxicidade do tratamento BAC a 0,2% nos grupos controle e AdLTR2EF1 α -hEPO	43
5. Discussão	46
6. Conclusões	50
6.1. Conclusão Geral:	51

6.2. Conclusões específicas:	51
7. Referências Bibliográficas	52

1. Introdução

1.1. Revisão da literatura

A partir de partir da década de 1940, a genética tomou grande impulso, e descobertas sobre a natureza, composição química e as propriedades do material genético, bem como as primeiras manipulações do DNA de bactérias, começaram a gerar expectativas de novos avanços terapêuticos. Em meados da década de 1960, começou a especulação sobre a possibilidade de utilizar vírus para transferir genes a seres humanos doentes e curar doenças genéticas (Friedmann 1997). Já naquela época, considerava-se tanto que os próprios genes de certos vírus pudessem fazer efeito quanto que fosse possível inserir genes humanos sadios em vírus para que esses os transferissem ao paciente. Entretanto, foi só no início da década seguinte que Paul Berg conseguiu de fato manipular uma molécula de DNA (Jackson, Symons et al. 1972), criando a tecnologia do DNA recombinante.

A terapia gênica consiste em um gene normal inserido no genoma para substituir um gene responsável por causar determinada doença. Um dos desafios significativos é a dificuldade em liberar o gene na célula-tronco. Sendo assim, um transportador molecular chamado vetor é usado para liberar o gene, que precisa ter especificidade, exibir eficiência na liberação de um ou mais genes necessários para aplicações clínicas, não ser reconhecido pelo sistema imunológico e ser purificado em grandes quantidades de altas concentrações para que possa ser produzido e disponibilizado em larga escala. Uma vez que o vetor é inserido ao paciente, este não pode induzir reações alérgicas ou processo inflamatório; deve aumentar funções normais, corrigir deficiências ou inibir atividades deletérias. Além disso, deve ser seguro e capaz de expressar o gene por toda a vida do paciente (Gardlik, Palfy et al. 2005, Misra 2013).

A base da terapia gênica consiste na introdução de genes em células. Porém, a entrada de DNA puro através da membrana plasmática de células eucarióticas é extremamente rara (Vellai and Vida 1999). Essa dificuldade é, naturalmente, benéfica para o organismo, pois dificulta alterações espúrias do metabolismo celular e até mesmo transformações semelhantes às que se observam na evolução das espécies.

De forma geral, há necessidade de um carreador que facilite a entrada do DNA nas células vivas. Esse veículo é denominado "vetor". Há três classes

principais de vetores atualmente em desenvolvimento: plasmídeos, vetores virais e vetores nanoestruturados. Os vírus são os mais estudados devido a excelência em adentrar as células e inserir seu material genético (Misra 2013).

A terapia gênica age na correção de um defeito no gene que causa doenças oculares e tem se mostrado eficaz no tratamento de defeitos gênicos em modelos animais. Estudos pré-clínicos oftalmológicos começaram após décadas de estudos e os resultados são promissores, os avanços irão impulsionar o desenvolvimento de novas propostas para pesquisas clínicas com terapia gênica para doenças hereditárias e adquiridas. (Côco, Baba et al. 2007).

A elevação das concentrações de *EPO* endógena no olho por hipóxia ou aplicação exógena de *EPO* humana recombinante foi encontrada para proteger a retina de camundongos contra a degeneração induzida por luz pela inibição da resposta do fotorreceptor celular (Grimm, Wenzel et al. 2002).

EPO recombinante foi relatada por exibir atividade na prevenção e tratamento de neuropatia diabética experimental (Bianchi, Buyukakilli et al. 2004) injúria do nervo periférico (Sekiguchi, Kikuchi et al. 2003) polineuropatia sensorial distal (Melli, Jack et al. 2006) e neurotoxicidade (Bianchi, Brines et al. 2006).

O mecanismo de estimulação da *EPO* mediador de neovascularização tecidual e mobilização da medula óssea, derivada de células progenitoras endoteliais dentro da circulação (Heeschen, Aicher et al. 2003, Bahlmann, De Groot et al. 2004, George, Goldstein et al. 2005).

A biologia celular está envolvida na terapia gênica atuando em células epiteliais e linfóides. Estas células são continuamente substituídas tendo que haver terapia continuada na tentativa de atingir as células tronco. É necessário desenvolver as tecnologias para identificar e isolar estas células, a fim de entender a regulação (Verma and Somia 1997).

1.2. Glândula lacrimal e superfície ocular

A glândula lacrimal (GL) fornece elementos para nutrir, proteger e renovar a superfície ocular (SO). Pela capacidade secretora da GL, esta tem a função de transportar e fornecer proteínas, eletrólitos e outros elementos para a SO através de seus ductos (Lemp and Wolfley 1992, Stern, Gao et al. 2004, Voutetakis, Kok et al. 2004, Baum, Alevizos et al. 2012). A GL é formada por células acinares que atuam

como células contráteis participando do processo de secreção de produto mucoso, sendo assim uma glândula exócrina mista. O espaço entre os ácinos é preenchido por tecido conjuntivo que contém vasos sanguíneos, leucócitos e nervos não mielinizados.

Doenças degenerativas podem acometer as GLs o que pode levar a uma perda progressiva funcional, com consequente manifestação de olho seco e alterações da SO. Tais doenças degenerativas podem ser decorrentes de uma adenite autoimune como o presente na Síndrome de Sjögren (Sullivan and Edwards 1997, Toda, Sullivan et al. 1999), e processos fisiológicos relacionados ao envelhecimento (Bromberg and Welch 1985, Schein, Munoz et al. 1997, Schein, Tielsch et al. 1997, Zoukhri 2006), parecem como principais mecanismos de acometimento das GLs.

A SO é composta por epitélio estratificado não queratinizado da conjuntiva e da córnea. Estas células encontram-se aderidas umas às outras, apresentam distribuição uniforme e características próprias e do tecido de sustentação subjacente que variam conforme cada região (Tseng and Tsubota 1997, Faria e Souza, Romano et al. 2006).

A lágrima contém diversos agentes atuando na vigilância imunológica da superfície ocular tais como, imunoglobulinas, lactoferrinas, lisozimas e fatores de crescimento responsáveis por estímulos de diferenciação e crescimento celular imprescindível à renovação epitelial e ao reparo de lesões oculares. As principais funções da GL são a síntese e a secreção de proteínas para o filme lacrimal que protege e lubrifica a SO. O fluido lacrimal avalia os tecidos da superfície ocular, inflamação e funções da GL além de doenças como olho seco (Sullivan, Rocha et al. 1998, Zhou, Zhao et al. 2012).

O entendimento dos conceitos de superfície ocular e filme lacrimal e sua integração como unidade funcional lacrimal permitem categorizar de maneira mais apropriada a maioria das doenças oculares externas, tornando a compreensão de sua fisiopatogênese mais específica (Nelson 1982, Tseng and Tsubota 1997, Pflugfelder, Solomon et al. 2000, Kinoshita, Adachi et al. 2001).

Para que a transferência gênica das GS seja clinicamente útil desta maneira, é importante entender e potencialmente modificar as vias de triagem intracelular usadas pelas proteínas transgênicas codificadas produzidas após a transferência do gene da glândula salivar. Várias vias diferentes de secreção de proteínas foram identificadas em células glandulares salivares, incluindo vias principais e secundárias reguladas, vias constitutivas apicais e baso-laterais, e uma via constitutiva (Castle and Castle 1998, Gorr, Venkatesh et al. 2005). Idealmente, o controle sobre a entrada de proteínas em qualquer uma dessas vias poderia fornecer um meio para direcionar seletivamente produtos transgênicos para um local terapêutico desejado, ou seja, na corrente sanguínea ou no trato gastrointestinal superior via saliva, conforme apropriado. Esta questão parece ser uma preocupação prática significativa (Baum, Berkman et al. 1999, Hoque, Baccaglini et al. 2001).

Estudos anteriores sugeriram que GS são tecidos úteis para expressão sustentada de proteínas recombinantes, pois as glândulas são facilmente acessíveis via abertura ductal na boca (evitando procedimento invasivo) e agem como biorreatores e órgãos endócrinos que podem liberar proteínas para a corrente sanguínea e / ou saliva, permitindo estratégias para tratamentos locais e sistêmicos (Voutetakis et al., 2007, 2010; Zheng et al., 2009).

A secreção de proteínas transgênicas das GS na corrente sanguínea pode ser valiosa para o manejo de vários distúrbios sistêmicos de deficiência de proteína única, como anemia responsiva à eritropoietina e deficiência de hormônio de crescimento (Baum, Voutetakis et al. 2004, Voutetakis, Bossis et al. 2005). A GS pode ser uma candidata para a terapêutica gênica em distúrbios de deficiência endócrina monogenética (atuando como uma glândula endócrina substituta) (Voutetakis, Kok et al. 2004).

1.4. Inflamação

A inflamação, trauma e toxicidade da córnea podem levar ao retardo na cicatrização de feridas, perda de nervos, neovascularização, opacidade e deficiência visual (Chang, Gabison et al. 2001, Maddula, Davis et al. 2011).

O cloreto de benzalcônio (BAC) é um cátion de amônio quaternário utilizado para preservar preparações oftálmicas. Ele age de 2 maneiras sendo a primeira

como surfactante para solubilizar componentes imiscíveis o que facilita a emulsificação e estabilização do medicamento e a segunda a ação de conservantes na inibição da atividade microbiana (Charnock 2006).

Estudos anteriores mostraram que o BAC surgiu como um agente para investigar a patogênese da doença do olho seco (DOS) em modelos animais. Em coelhos, BAC 0,1% aplicados topicamente, duas vezes ao dia, durante 4 a 14 dias, resultou no desenvolvimento da DOS (Xiong, Chen et al. 2008, Chen, Li et al. 2011). Nos ratos, o BAC a 0,2% aplicado duas vezes ao dia desencadeou sinais clínicos da DOS, incluindo aumento da coloração com fluoresceína, irregularidade corneana e perda de células calciformes conjuntivais (Lin, Liu et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2014, Diego, Bidikov et al. 2016, Portal, Gouyer et al. 2017, Yang, Zhang et al. 2017).

O BAC induz dano citoplasmático e apoptose e inibe a migração celular (Grant, Yao et al. 1992, Buron, Micheau et al. 2006, Moon, Ko et al. 2018). Curiosamente, baixas concentrações induz a quebra de fita de DNA e disfunção mitocondrial (Ye, Wu et al. 2011, Datta, Baudouin et al. 2017).

Entre essas lesões, o modelo animal exposto a colírios BAC 0,2% duas vezes ao dia por 7 dias tem sido usado em vários estudos, por induzir dano à córnea e olho seco (Lin, Liu et al. 2011, Marques, Alves et al. 2015). Além disso, esses modelos são conhecidos por mimetizar a condição humana de inflamação da superfície ocular induzida pelo uso crônico de medicações tópicas preservadas com BAC, frequentemente observadas em pacientes glaucomatosos (Baffa Ldo, Ricardo et al. 2008, Alves, Reinach et al. 2014).

1.5. Terapia gênica

A terapia gênica (TG) consiste na inserção de genes nas células e tecidos de um indivíduo para o tratamento de uma doença, em especial, doenças hereditárias. A TG visa suplementar com alelos funcionais aqueles que são defeituosos ou mortos ou inserir genes novos com potencial terapêutico em doenças não genéticas. Um gene normal é inserido no genoma para substituir um gene anômalo causador de doença. Uma molécula transportadora, chamada vetor, precisa ser usada para se enviar o gene terapêutico para as células-alvo do paciente (Goncalves 2005).

A terapêutica com TG é uma área de investigação bastante recente em biomedicina que vem apresentando muitos avanços nos últimos anos. Acredita-se que a TG represente uma possibilidade de tratamento efetivo para diversas doenças cujos tratamentos são pouco eficazes e/ou restritos aos sintomas (Wilson 2002, Kendirci, Gur et al. 2005, Cope and Lariviere 2006, Enquist, Nilsson et al. 2006, Kim, Kim et al. 2006, Schmidt, Hoffend et al. 2006, Tan 2006). Ainda em estágio de caráter eminentemente experimental, há problemas na aplicação da TG, sendo o controle dos riscos um dos mais importantes (Ritter, Lehmann et al. 2002, Bessis, GarciaCozar et al. 2004, Bangari and Mittal 2006, Reifenberg, Hildt et al. 2006, Tan 2006). Apesar disso, estudos em modelos animais (Murphy, Zhou et al. 1997, Zhou, Murphy et al. 1998, Lin, Yang et al. 2002, Lee, Barton et al. 2004, Enquist, Nilsson et al. 2006) e também alguns estudos em humanos (Losordo, Vale et al. 2002, Wilson 2002, Huard, Li et al. 2003, Rajagopalan, Mohler et al. 2003, Carretero, Escamez et al. 2006, Schmidt, Hoffend et al. 2006, Tan 2006) têm apresentado resultados promissores.

O passo a passo da TG pode ser resumido em um conjunto de técnicas que permitem a inserção e expressão de um gene terapêutico em células-alvo que apresentam algum tipo de desordem de origem genética (não necessariamente hereditária), possibilitando a correção dos produtos gênicos inadequados que causam doenças. O material genético inserido nas células do paciente pode gerar a forma funcional de uma proteína, que pode agir dentro da célula ou ser secretada e agir em outras células. É possível também regular a expressão de outros genes, ativá-los ou inativá-los com essa estratégia. Porém, devido a diferentes afinidades entre vírus e células, alterações estruturais no gene-alvo, a resposta transcricional pode ser nula, ou produzida em pequenas quantidades ou sem atividade biológica (Huard, Li et al. 2003, Karthikeyan and Pradeep 2006, Li and Huang 2006).

A inserção do gene terapêutico pressupõe sua introdução por meio de vetores de transferência que sejam capazes de reconhecer as células-alvo. Há vários sistemas de inserção de material genético *in vivo*. Os vetores virais são os mais comuns (sendo os retrovírus e adenovírus os mais utilizados), mas outros tipos de vetores não-virais também têm sido utilizados, como lipossomas e macromoléculas conjugadas ao DNA. A injeção do material genético diretamente no tecido-alvo também é uma maneira de realizar a TG sem o uso de vírus (Rubanyi 2001, Wilson 2002, Karthikeyan and Pradeep 2006).

Há também o sistema de terapia gênica *ex vivo*, no qual células do próprio paciente são retiradas por meio de biópsia, modificadas e reimplantadas no paciente, de modo que o gene terapêutico é inserido fora do organismo do paciente (Karthikeyan and Pradeep 2006).

Antes de serem introduzidos no paciente, os vírus usados como vetores sofrem várias alterações genéticas, de modo que o gene terapêutico é inserido, enquanto diversos outros genes que lhe conferem virulência são retirados ou inativados (Rubanyi 2001, Wilson 2002, Karthikeyan and Pradeep 2006). Assim, ao se ligar e invadir a célula-alvo, os vetores virais injetam seu material genético contendo o gene terapêutico no DNA do paciente, possibilitando a transcrição e tradução do gene para sua proteína funcional correspondente, ou então utilizam a maquinaria molecular da célula hospedeira para expressar seus genes.

Haisma e Hon (Haisma and de Hon 2006) afirmam que cerca de 3.000 pacientes já receberam algum tipo de TG. Diversas doenças foram tratadas, incluindo disfunções endoteliais, hemofilia, imunodeficiência e diversos tipos de cânceres (Kay, Manno et al. 2000, Hacein-Bey-Abina, Le Deist et al. 2002, Losordo, Vale et al. 2002, Wilson 2002, Rajagopalan, Mohler et al. 2003). De modo geral a terapia gênica tem trazido bons resultados, e seus efeitos colaterais parecem ser reduzidos a um número pequeno de pacientes, o que é indicativo animador da segurança do tratamento. De qualquer forma, os cuidados que devem ser tomados com esses procedimentos, bem como os testes de certificação da segurança das preparações são inúmeros e muito rigorosos, o que torna o tratamento extremamente caro (Haisma and de Hon 2006).

De uma forma geral a maioria desses métodos não se demonstrou tóxica, patogênica e nem desencadeou respostas imunes ao hospedeiro, sendo úteis para situações em que a expressão gênica transitória é necessária, como cicatrização de feridas na córnea (Rosenblatt and Azar 2004, Mohan, Sharma et al. 2005, Nominato, Dias et al. 2018).

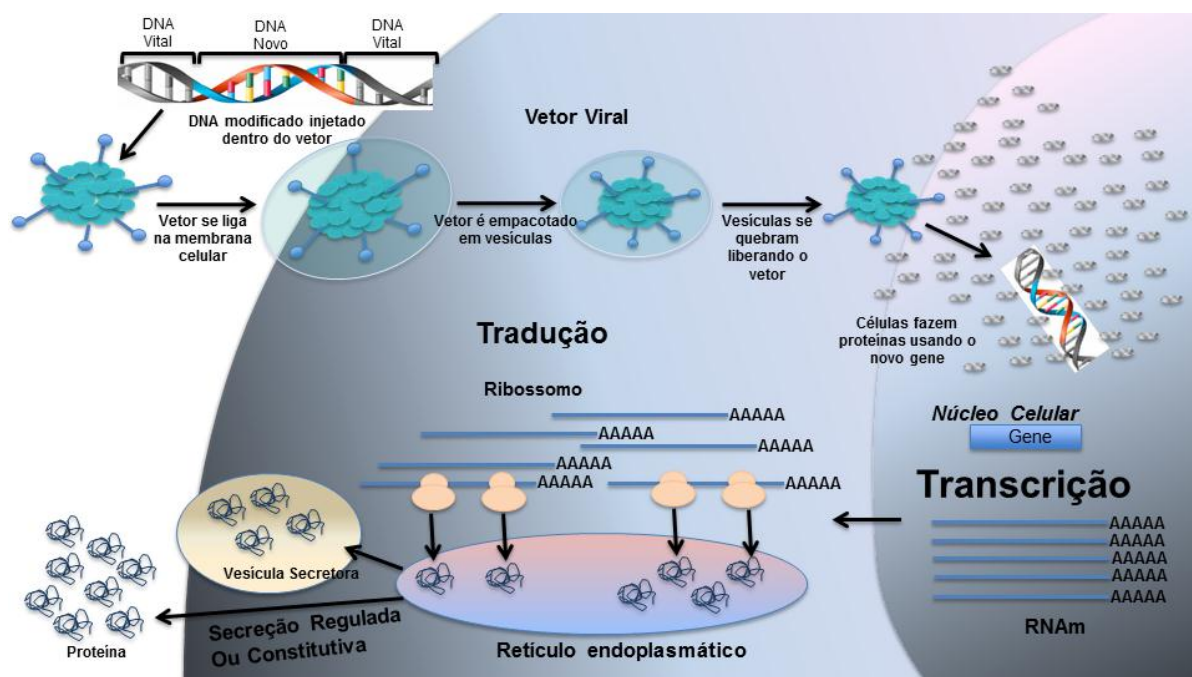
Por outro lado, embora muitas terapias tenham sido propostas para esses desafios, várias apresentam resultados limitados ou transitórios (Chang, Gabison et al. 2001).

A transferência de genes para glândulas exócrinas é uma estratégia interessante devido ao seu potencial em tratar não apenas o tecido alvo, a caso da

GS e da GL, mas também os órgãos que são favorecidos por sua acessibilidade e por receberem o produto da secreção da terapia gênica, como a boca e a superfície ocular, respectivamente (Baum, Adriaansen et al. 2010, Perez, Aguilera et al. 2010). O conceito pioneiro aqui é que a GS e também a GL possam funcionar como um reservatório para a produção de fatores terapêuticos que possam ser liberados em saliva e lágrimas, proporcionando tratamento para doenças da boca ou da SO.

Os vetores adenovírus podem transferir genes para uma variedade de tipos de células *in vivo*, permitindo diversas estratégias para a transferência gênica em fatores de crescimento hematopoiéticos.

Figura 2 – Terapia gênica usando um vetor adenovírus.



Fonte: adaptada de (Goncalves 2005)

1.6. Hormônio hEPO

A eritropoietina (*EPO*) é um hormônio glicoproteico, responsável pela produção de glóbulos vermelhos no corpo humano e em adultos. As células renais são as principais produtoras de *EPO* e a proteína secretada vai para a corrente sanguínea até a medula óssea fazendo a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em eritrócitos (Chateauvieux, Grigorakaki et al. 2011). Alguns estudos evidenciaram a

presença de *EPO* e seus receptores em tecidos extra hematopoiéticos incluindo a retina (Brines, Grasso et al. 2004, Caprara, Britschgi et al. 2014).

No sistema hematopoiético, a principal função da eritropoietina é a regulação da produção de glóbulos vermelhos, mediada por seu receptor específico de superfície celular (*rhEPO*) (Arcasoy 2008). A Eritropoietina Humana Recombinante contém 165 aminoácidos e é obtida por tecnologia de DNA recombinante. Possui um peso molecular de 34.000 Dalton e é produzida por células CHO (células de ovário de hamster chinês), nas quais o gene da eritropoietina humana foi transfectado.

Para entender o papel central da *EPO* na regulação da produção de eritrócitos, baseia-se que o gene *EPO* humano tem sido usado para produzir *EPO* recombinante humana (*rhEPO*) em células mamárias. (Jacobs, Shoemaker et al. 1985, Lin, Suggs et al. 1985, Sasaki, Bothner et al. 1987)

Uma alternativa à terapia com *rhEPO* é o uso do gene *EPO* como fármaco, transferindo o gene *EPO* humano para células autólogas *ex vivo* e transferindo as células modificadas de volta para o indivíduo, ou diretamente o gene da *EPO in vivo* (Perez, Rowzee et al. 2010). O uso de vetores adenovírus são eficientes para transfecção gênica em órgãos de animais experimentais *in vivo* com consequente aumento do nível da expressão do gene exógeno, sendo uma abordagem direta para avaliar a estratégia de terapia gênica com o gene *EPO* humano a fim de estimular a eritropoiese (Rosenfeld, Siegfried et al. 1991, Jaffe, Danel et al. 1992, Rosenfeld, Yoshimura et al. 1992, Mastrangeli, Danel et al. 1993).

A expressão da concentração de *EPO* foi encontrado em muitos tecidos extra-renais e alguns tipos de células incluindo astrócitos (Marti, Wenger et al. 1996), neurônios (Bernaudin, Marti et al. 1999), trato genital feminino (Masuda, Kobayashi et al. 2000), órgãos reprodutivos masculinos (Magnanti, Gandini et al. 2001, Kobayashi, Yanase et al. 2002), glândulas mamárias (Juul, Zhao et al. 2000), trofoblastos placentários (Conrad, Benyo et al. 1996), macrófagos da medula óssea (Vogt, Pentz et al. 1989) e progenitores eritróides (Stopka, Zivny et al. 1998, Sato, Maekawa et al. 2000).

As GS são consideradas alvo atraente para a transferência gênica quando usado genes como drogas (Baum, Voutetakis et al. 2004).

As proteínas destinadas à regulação da via de secreção em células polarizadas requerem um sinal direcionando ou retendo para dentro de grânulos onde aguardam

um sinal secretório externo para sua liberação. As proteínas secretadas pelas vias constitutivas são consideradas essenciais para a sua transdução, sem considerar alterações nos sinais extracelulares (Dannies 1999, Loh, Maldonado et al. 2002, Tekirian 2002).

Para uso eficaz das GS tanto em aplicações locais quanto aplicações sistêmicas de genes, é importante entender e eventualmente influenciar as vias de triagem usadas pelas proteínas secretoras transgênicas nas GS.

A *EPO* tem efeitos anabólicos, antioxidantes e anti-inflamatórios contra lesões podendo ter efeitos locais nas GS, GL e retinas (Gerina 1980, Brines and Cerami 2006, Arcasoy 2008, Wang, Zhao et al. 2009).

Portanto, a hipótese desse estudo é que um vetor viral adequado com um gene escolhido pode ser transferido para a GL e GS como uma estratégia útil no tratamento ou prevenção de condições patológicas de SO.

Neste estudo, nós investigamos o potencial terapêutico do adenovírus (Ad) para transfectar GL e GS de ratos. Além disso, exploramos a capacidade do gene da eritropoietina humana (*hEPO*) transportado pelo Ad para ser expresso, secretado e buscar efeito terapêutico sobre o sistema operacional, sem efeitos negativos sobre a GL, GS e SO.

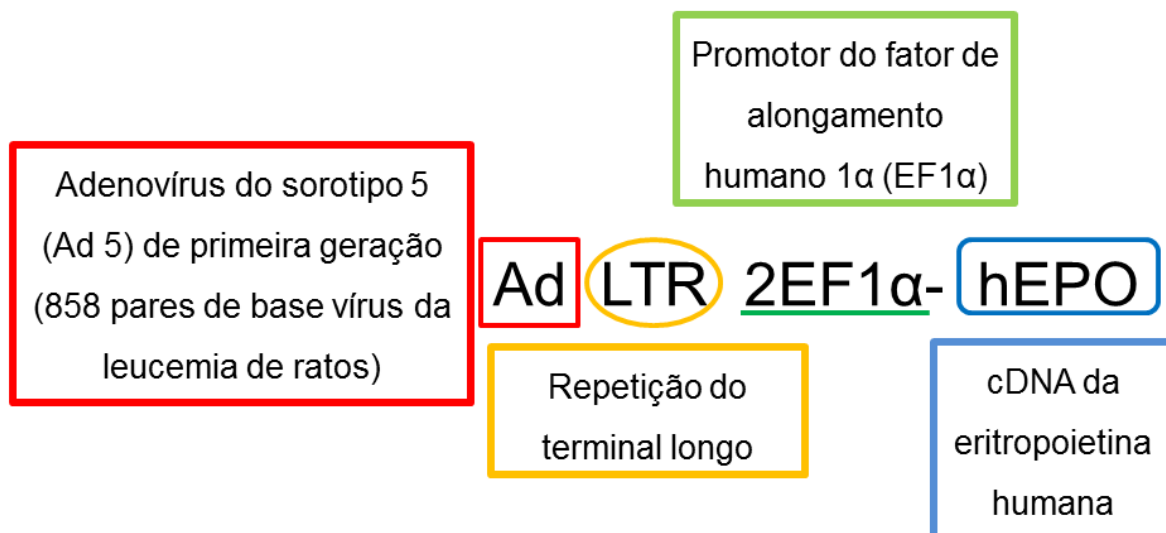
1.7. Adenovírus recombinante com o gene da eritropoietina humana (AdLTR2EF1 α -hEPO)

A terapia gênica requer vetores eficientes e não tóxicos para promover expressão adequada. Atualmente dois vetores virais bastante usados é o adenovírus sorotipo 5 (Ad5) de primeira geração por oferecer facilidade de produção, transdução eficiente de muitos tipos de células e pouca integração genômica, porém provocam respostas imunes vigorosas o que resulta em expressão transgênica a curto prazo (Schaack, Ho et al. 1990, Greber, Webster et al. 1996, Greber, Suomalainen et al. 1997, Harui, Suzuki et al. 1999). Já o vírus da leucemia de roedores Moloney (MoMLV) fornecem expressão a longo prazo do transgene e a transdução requer divisão celular e integração genômica não controlada ocorrendo o risco de mutagênese de inserção (Harel, Rassart et al. 1981, Springett, Moen et al.

1989, Miller, Adam et al. 1990, Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003, Baum, Kustikova et al. 2006).

A construção de um vetor adeno-retroviral híbrido, o AdLTR-luc é capaz de transduzir uma grande variedade de células e mediar a integração da fita transgênica no DNA genômico com eficiência (Zheng, Baum et al. 2000, Zheng and Baum 2002, Zheng, Wang et al. 2003).

Figura 3: figura esquemática do adenovírus utilizado no estudo e cedido pelo Dr. Changyu Zheng do Instituto Nacional da Saúde, Departamento de Saúde e Serviços Humanos, Bethesda, Maryland, EUA.



2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Investigar em ratos o potencial terapêutico do vetor adenovírus recombinante com o gene da eritropoietina humana (AdLTR2EF1 α -hEPO) em GL e GS no olho seco induzido por colírio de cloreto de benzalcônio.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão do gene da hEPO codificado através do vetor recombinante;
- Avaliar a segurança do vetor adenovírus aplicado em GL e GS de ratos;
- Analisar o benefício terapêutico da intervenção com AdLTR2EF1 α -hEPO nos parâmetros da superfície ocular.

3. Material e Métodos

3.1. Desenho do estudo

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com seis semanas de idade, criados no Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto - USP (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Todos os procedimentos experimentais aderiram à Declaração ARVO para o uso de animais em pesquisa oftalmológica e visual, aos "Princípios de cuidados com animais de laboratório" (publicação NIH. 85-23) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (Protocolo nº 040/2013)

Os animais tiveram livre acesso a ração e água. No dia do experimento, foi administrado anestesia intramuscular antes da injeção do vetor AdLTR2E1 α -hEPO e da solução salina (NaCl 0,9%) na GL direita e na glândula salivar submandibular direita (GS direita). A anestesia intramuscular foi composta por uma combinação de quetamina (10 mg / 100g pc) (União Química Farmacêutica SA, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (5 mg / 100g pc) (Laboratorio Callier SA, Barcelona, Espanha). Um subgrupo de ratos (n = 6) foi tratado com 1 gota do colírio BAC na concentração de 0,2% no olho direito, 2 vezes ao dia (12 em 12 horas) por 7 dias após a injeção de AdLTR2E1 α -hEPO na GL direita e GS direita (Figura 4).

A mesma anestesia foi também utilizada após 7 dias para um exame oftalmológico e uma dose excessiva de anestesia para eutanásia, após a eutanásia os tecidos foram coletados para análises histológica e molecular. Todos os procedimentos e manipulações foram realizados imediatamente após a abolição confirmada do reflexo caudal e corneano. Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n = 5 - 7 animais/grupo) descritos na Tabela 1.

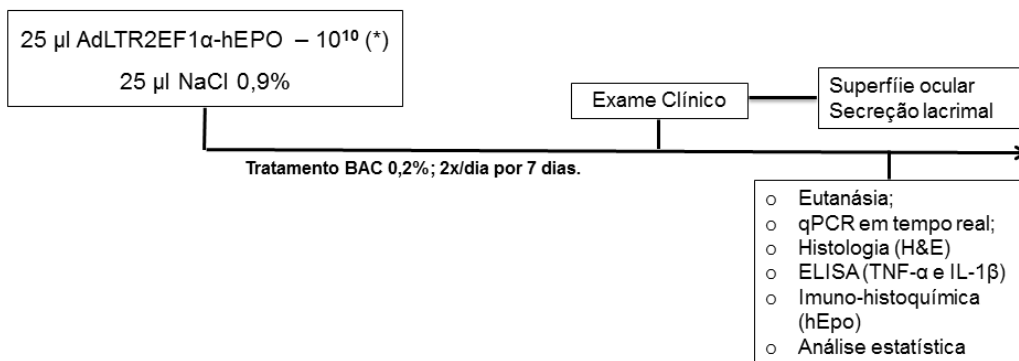
3.2. Vetor

O vetor adenovírus recombinante (AdLTR2EF1 α -hEPO) que codifica o gene da hEPO utilizado neste trabalho foi cedido gentilmente pelo Dr. Changyu Zheng do NIDCR/NIH (Zheng, Vitolo et al. 2008). Nos experimentos, foram administrados 25 μ L contendo 10^{10} partículas / mL deste vetor.

Tabela 1 – Grupos em estudo

Grupos	Número de animais por experimento
A. Grupo controle (que recebeu 25µl de NaCl 0,9% na GL direita e GS direita),	n = 4 – 6
B. Grupo BAC 0,2%	n = 6
C. Grupo AdLTR2EF1α-hEPO GL direita	n = 6
D. Grupo AdLTR2EF1α-hEPO GL direita com tratamento BAC 0,2% no olho direito (AdLTR2EF1α-hEPO GL direita + BAC)	n = 6
E. Grupo AdLTR2EF1α-hEPO GS direita com tratamento BAC 0,2% no olho direito (AdLTR2EF1α-hEPO GS direita + BAC)	n = 7

Figura 4 – Desenho do estudo.



3.3. Transferência gênica in vivo

Após a anestesia, foi realizada uma incisão na área temporomandibular do lado direito, onde houve a exposição da GL, e também uma incisão sob a cavidade bucal, expondo a GS direita. Foram utilizadas microseringas Hamilton de precisão (Reno, Nevada, EUA) contendo 25µl de AdLTR2EF1α-hEPO (10^{10} partículas/ml) nos grupos em estudo e NaCl 0,9% no grupo controle.

Em seguida, após a transfeção nas glândulas, foi realizada a selagem da incisão com cola de cianoacrilato (Superciano, São Paulo, Brasil).

Imediatamente após a recuperação anestésica, os animais foram alojados em caixas (4 animais/caixa), com livre acesso à água e ração, temperatura controlada ($23\pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12/12 horas e observados durante os 7 dias.

3.4. Avaliação da superfície ocular

Os animais foram observados todos os dias após o procedimento. No sétimo dia, eles foram novamente anestesiados como descrito acima, realizada a pesagem dos animais e a superfície ocular avaliada pela lâmpada de fenda (Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Alemanha, GE) e foto documentada com uma câmera digital (Sony, Cybershot DSC W5, Tóquio, Japão). A avaliação consistiu na presença de coloração da córnea pela fluoresceína ou opacidade e hiperemia conjuntival.

3.5. Avaliação da secreção lacrimal

O teste de Schirmer modificado foi realizado para medir a secreção lacrimal do olho direito, em todos os animais estudados colocando um fio de fenol vermelho (Zona-Rápida, Mericon América, Inc, San Mateo, CA, EUA), (1 mm de largura e 20 mm de comprimento) no fórnix conjuntival dos olhos por 30 seg.

3.6. Hematócrito

O sangue foi coletado por punção cardíaca e transferido para um capilar de vidro onde foi vedado para dosagem do hematócrito. Após a vedação, o sangue foi centrifugado na centrífuga Excelsa Flex modelo 3400, FANEM (São Paulo, SP) a 12000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos e houve a separação do sangue do plasma e a leitura foi realizada em porcentagem da medida em milímetros da coluna preenchida por células (vermelha) em relação a coluna total (células e soro) (%).

3.7. Coleta e análise das amostras

Após a coleta do sangue e demais avaliações propostas no estudo, os ratos foram eutanasiados, e os tecidos (GL, GO, GS, rim e fígado) foram coletados para avaliação histológica e molecular.

3.8. Coloração com hematoxilina de Harris e eosina (H&E)

As GL, GO e GS do lado direito dos ratos dos cinco grupos foram coletados e desidratados em série crescente de etanol, diafinizados em xilol e embebidos em banhos de parafina à 60°C para inclusão em blocos. Foram realizados cortes de 6 µm de espessura no micrótomo Jung RM2065 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em série decrescente de etanol e lavados em água destilada. A seguir, foram corados com solução de hematoxilina por 2 minutos, lavados em água corrente, imersos em eosina por 2 minutos, e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas em TissueMount (TissueTek® Glas™ Mounting Media, Sakura, Finetek USA).

As lâminas foram observadas e as imagens obtidas através de um microscópio de luz (Leica Microsystems, LED DM4000 B, Wetzlar, Alemanha), conectados a um computador, pelo software Leica LAS V4.2.

A espessura do epitélio da córnea foi medida através do software Leica LAS V4.2 e os dados medidos em micrometros, de todos os grupos e foram comparados.

3.9. Imunofluorescência

As amostras foram submetidas à imunomarcação, para localizar a proteína hEPO. Para este procedimento, as amostras de tecidos foram congelados em OCT - Tissue-TekSakura (Torrance, CA, EUA), micro seccionados (10 μ m) em um criostato Microm Heidelberg GmbH D-6900 (Heidelberg Instruments, Alemanha) e transferidos para lâminas silanizadas.

As lâminas de GL foram fixadas em acetona (-20 ° C) por 10 min, lavadas em PBS e submetidas ao procedimento de bloqueio das proteínas. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário policlonal de coelho anti-hEPO (H-162) sc-7956 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) a 200 μ g / mL por duas horas, seguido de lavagem com PBS e uma hora de incubação com o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com AlexaFluor® 488 (1: 1000 - Jackso Immuno Research Laboratories, West Groov, PA, EUA). As lâminas foram preparadas com o meio de montagem Prolong® Gold Antifade Reagent com DAPI (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

As lâminas foram observadas e as imagens obtidas no microscópio de luz equipado com filtros de fluorescência (Leica Microsystems, LED DM4000 B, Wetzlar, Alemanha), conectados a um computador, pelo software Leica LAS V4.2.

Análise bioquímica

3.10. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

As GL dos três grupos (controle, AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita e AdLTR2EF1 α -hEPO GL contra-lateral) foram homogeneizadas com o auxílio do equipamento PT1200E (Polytron, Kinematica, Luzern, Switzerland) em uma solução contendo tampão Tris 10 mM pH 7,4, Triton 150 mM e 1% de inibidor de protease completa (Roche DiagnosticCo, Indianápolis, IN, EUA) preparado conforme indicado pelo fabricante e armazenado a -20°C até a avaliação pelo método ELISA.

Os ensaios para medir citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) nas GL dos animais tratados com vetor viral (AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita e controle) foram realizados utilizando amostras homogenizadas por kits ELISA IL-1 β e TNF- α

(Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA).

3.11. Quantitativa PCR em tempo real (qPCR) para eritropoietina

O RNA total dos tecidos GL, fígado e rim foi extraído com PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Carlsbad, CA, EUA). Para remover qualquer contaminação com DNA genômico, foi utilizado o DNA-free kit (Ambion, Carlsbad, CA, EUA). Posteriormente, o RNA total foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop2000c (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA), e logo após foi realizada transcrição reversa para síntese de cDNA com 400 ng de RNA total, utilizando o High-Capacityc DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, realizou-se a qPCR no equipamento ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para análise da expressão do RNAm do gene humano eritropoietina (*hEPO*).

A beta actina (*Actb*) foi utilizada como gene de referência para rato. As sondas de hidrólise do tipo TaqMan Hs01071097_m1 (*hEPO*) e Rn00667869_m1 (*Actb*) foram utilizadas neste experimento. As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, nos seguintes ciclos: 1 ciclo de 95°C por 20 seg, 50 ciclos de 95°C por 1 seg e 60°C por 20 seg.

3.12. Análise estatística

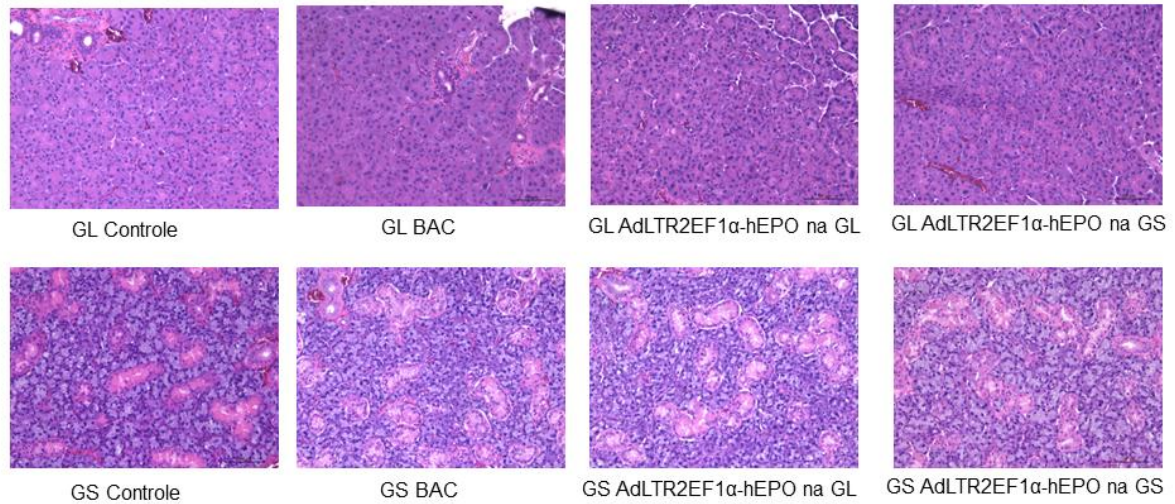
Os dados foram expressos como média \pm SE. As comparações de dados contínuos foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *posthoc* de Dunn, para três ou mais grupos; e Mann-Whitney U para comparações de dois grupos (software GraphPad 5.0, Prism, San Diego, CA). O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Segurança do AdLTR2EF1 α -hEPO na GL dos ratos

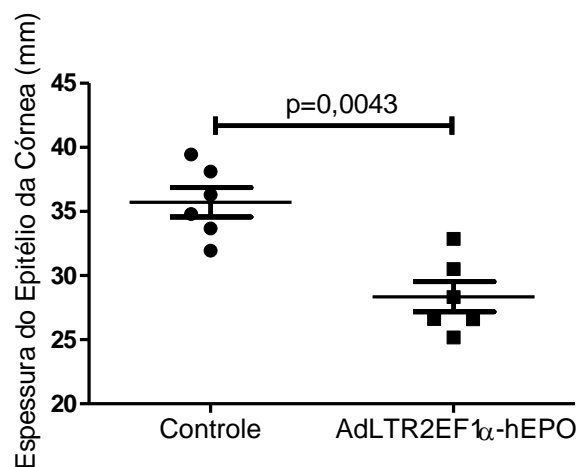
A injeção de AdLTR2EF1 α -hEPO na GL e na GS de ratos não afetou a morfologia de ambas como mostrado na figura 4, analisada por H&E.

Figura 5 – Análise da morfologia da GL e GS, coradas por H&E (aumento 200 x).



Os epitélios da córnea do lado direito eram mais finos no grupo AdLTR2EF1 α -hEPO ($28,4 \pm 1,1 \mu\text{m}$) do que no grupo controle ($35,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$) ($p = 0,0043$) (Figura 6).

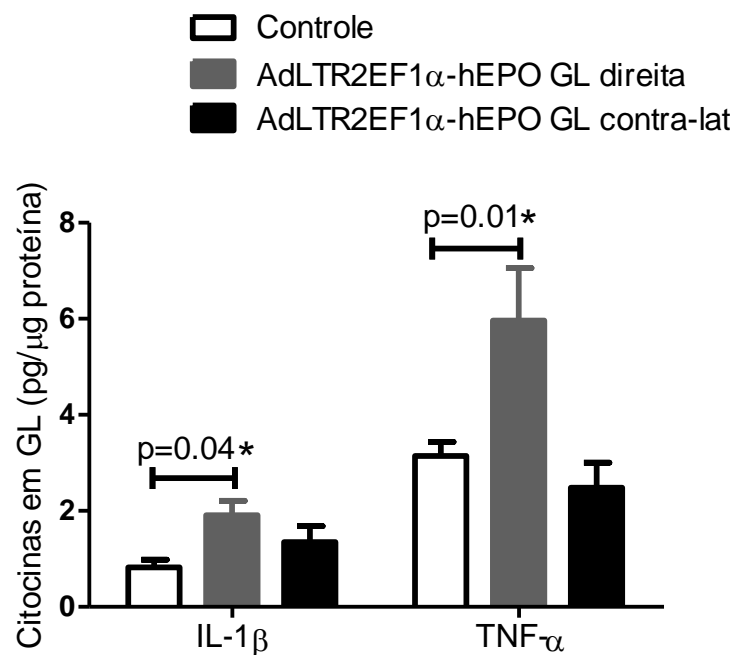
Figura 6 – Espessura do epitélio da córnea nos grupos controle (n=6) e AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita (n=6) (Mann-Whitney U).



4.2. Expressão de IL-1 β e TNF- α na GL

A expressão das proteínas IL-1 β e TNF- α foi analisada na GL direita dos grupos controle e AdLTR2EF1 α -hEPO e na GL esquerda dos ratos que receberam a injeção do vetor viral no lado contra-lateral. Houve um aumento na expressão de ambas as citocinas inflamatórias nas GLs que receberam o vetor AdLTR2EF1 α -hEPO, mas não nas GLs do lado contra-lateral (n = 6 para o grupo controle e n = 6 para AdLTR2EF1 α -hEPO, p = 0,04 e p = 0,01 para IL-1 β e TNF- α , respectivamente) (Figura 7).

Figura 7– Expressão das proteínas IL-1 β e TNF- α na GL pelo método ELISA (Mann-Whitney U).

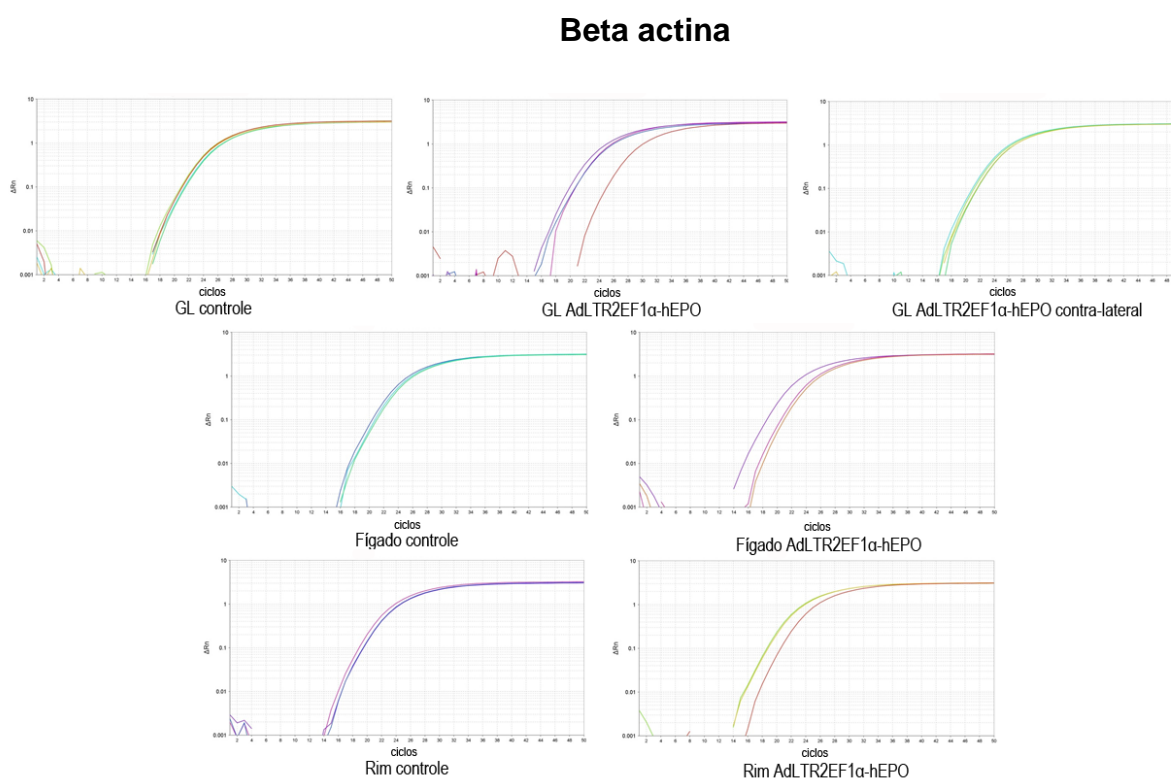


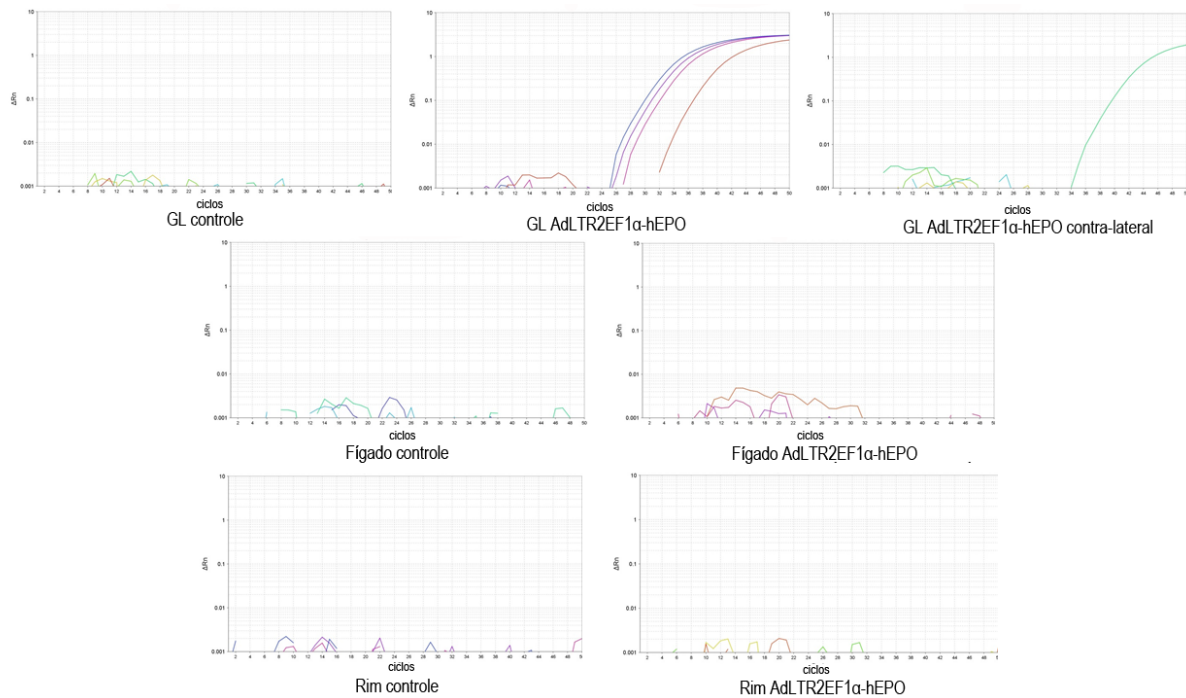
4.3. Análise da expressão do RNAm hEPO em GL, fígado e rim por qPCR

A figura 8 demonstra a expressão do gene de referência beta actina presente em todos os tecidos (GL, fígado e rim) dos grupos estudados, constatando que o RNAm utilizado na qPCR estava íntegro e de boa qualidade.

Por outro lado, observou-se expressão gênica da eritropoietina humana somente na GL dos animais que receberam a injeção do vetor viral recombinante. Não houve expressão desse gene no rim e fígado destes mesmos animais e no grupo controle que recebeu injeção de NaCl 0,9% na GL.

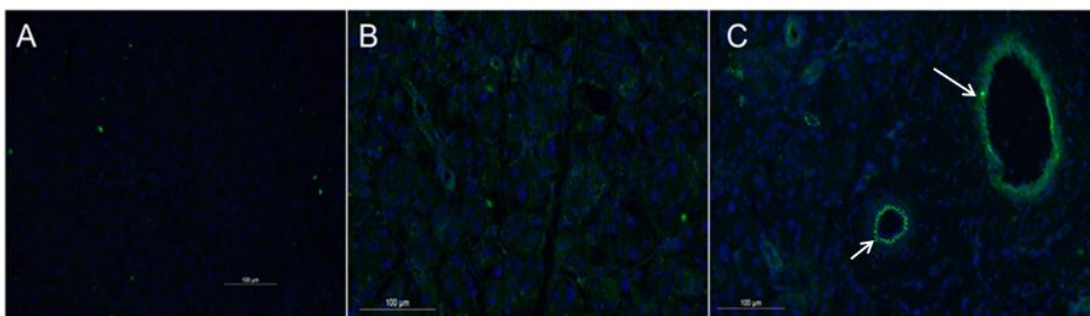
Figura 8 – Expressão do RNAm hEPO nos tecidos GL, fígado e rim nos grupos controle e AdLTR2EF1 α -hEPO (Mann-Whitney U).



hEPO**4.4. Imunofluorescência**

A imunofluorescência revelou coloração positiva para a proteína hEPO em células ductais epiteliais da GL direita de ratos injetados com AdLTR2EF1α-hEPO, em contrastando com ratos controle que não apresentou coloração no 7º dia (Figura 9).

Figura 9 – Imunofluorescência marcando a expressão de hEPO em células ductais de GL (aumento 200x) – conforme setas indicativas (C).

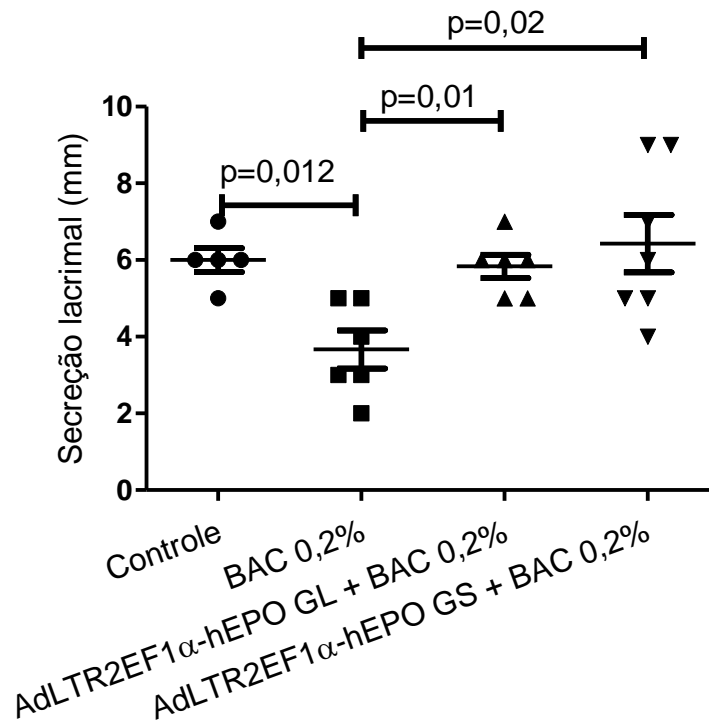


4.5. Comparação clínica da toxicidade do tratamento BAC a 0,2% nos grupos controle e AdLTR2EF1 α -hEPO

Para testar se a expressão da proteína EPO poderia proteger contra o dano desencadeado por colírios BAC 0,2%, duas vezes ao dia por 7 dias, os seguintes grupos foram comparados: controle, BAC, AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita + BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita + BAC (n = 4 – 6/ grupo).

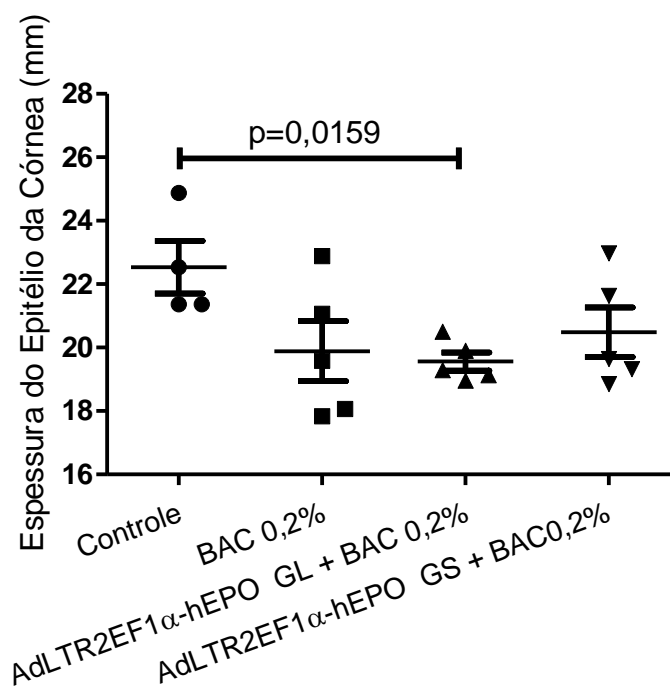
A secreção lacrimal foi reduzida pelo tratamento com BAC 0,2%, mas o pré-tratamento com o vetor AdLTR2EF1 α -hEPO evitou que o BAC diminuísse a secreção lacrimal nos grupos que o receberam na GL ou na GS (n = 5 / grupo para o grupo controle, n = 6 para BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita + BAC, n = 7 para AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita + BAC, p = 0,012 comparando o BAC ao controle, p = 0,01 comparando o BAC com o AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita e p = 0,02 comparando o BAC com o AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita) (Figura 10).

Figura 10 – Secreção lacrimal (mm) avaliada nos grupos controle (n=5), BAC 0,2% (n=6), AdLTR2EF1 α -hEPO GL + BAC 0,2% (n=5), AdLTR2EF1 α -hEPO GS + BAC 0,2% (n=6) (Mann-Whitney U).



A espessura epitelial da córnea apresentou tendência de redução pelo tratamento com BAC 0,2% e acentuada pela terapia gênica com vetor viral AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita (ipsilateral ao tratamento com colírio BAC 0,2%) ($p=0,0159$). O tratamento na GS direita manteve espessura mais baixa, mas não significativamente menor do que o grupo controle ($p>0,05$) ($n = 4$ para grupo controle, $n = 5$ para BAC, AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita + BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita + BAC) (Figura 11).

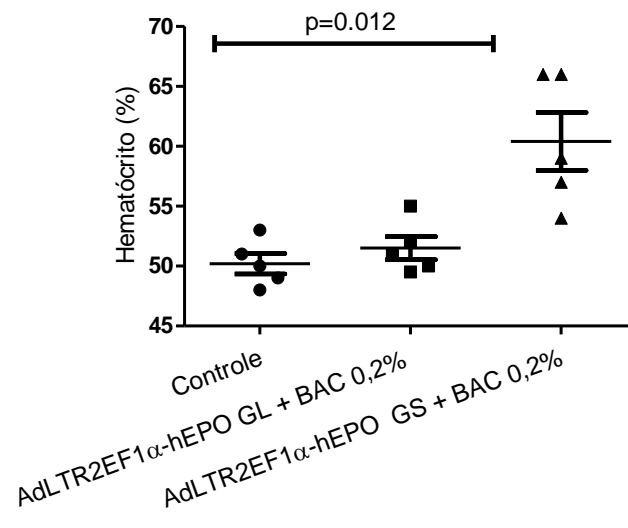
Figura 11 – Espessura epitelial da córnea nos grupos controle ($n=4$), BAC ($n=5$), AdLTR2EF1 α -hEPO na GL direita + BAC 0,2% ($n=5$) e AdLTR2EF1 α -hEPO na GS direita + BAC 0,2% ($n=5$) (Mann-Whitney U).



Como prova das repercussões sistêmicas da injeção de AdLTR2EF1 α -hEPO nas glândulas exócrinas, detectamos o aumento do hematócrito no grupo AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita, comparado ao grupo controle, mas não nos outros grupos. O hematócrito foi significativamente maior apenas em AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita + BAC 0,2% ($n = 5$ para o grupo controle, AdLTR2EF1 α -hEPO GL direita + BAC e AdLTR2EF1 α -hEPO GS direita + BAC, $p = 0,012$) (Figura 12).

Resultados

Figura 12 – Hematócrito dos grupo controle (n=5), AdLTR2EF1 α -hEPO na GL + BAC 0,2% (n=5), AdLTR2EF1 α -hEPO na GS + BAC 0,2% (n=5) (Mann-Whitney U).



5. Discussão

Este estudo mostrou que o vetor Ad viral injetado na GL não alterou a morfologia da GL, mas reduziu a espessura epitelial da córnea, porém preservou a secreção lacrimal nos olhos tratados com o colírio tóxico de BAC 0,2 %, usado duas vezes ao dia, por 7 dias, mesmo lado da GL injetada. Os animais que receberam o vetor Ad viral tiveram níveis mais elevados de citocinas TNF- α e IL1- β na GL injetada do que nas controles e nas contra-laterais, revelando uma resposta pró-inflamatória, provavelmente causada pela presença do Ad vírus, que pode ter contribuído para a produção de mediadores com repercussões na diminuição da espessura do epitélio da córnea ipsilateral. Estudos anteriores destinados a transferir o gene pelo vetor de adenovírus para a GL não abordaram o impacto na inflamação ou fluxo lacrimal da GL ou SO (Banin, Obolensky et al. 2003, Hodges, Raddassi et al. 2004). Por outro lado, a transferência gênica de inibidor de TNF- α com vetor viral Ad foi usada como estratégia de tratamento de TG em modelo animal nas quais a inflamação da GL foi induzida por estímulo antigênico (Zhu, Stevenson et al. 2002, Trousdale, Zhu et al. 2005).

Nas linhas a seguir vamos discutir os três aspectos conceituais do presente estudo, que são a efetividade da transdução, a característica clínica do modelo de olho seco e alteração da superfície ocular, a prova de que o gene foi transcrito, e segurança da intervenção por terapia gênica.

O tropismo do Ad na GL foi limitado a células ductais e esse achado foi observado pela primeira vez nesse estudo. A estrutura formada pelas células ductais é proporcionalmente pequena frente a estrutura acinar somada a de outras células que compõe a GL (mioepiteliais, vasculares, neurônios, fibroblastos e leucócitos). Assim, esse achado pode ajudar a explicar a modesta resposta terapêutica, mas também a modesta inflamação, nessas glândulas, e a leve redução no epitélio da córnea nos animais tratados com AdLTR2EF1 α -hEPO. Também reflete a baixa produção de hEPO, como observado, nos níveis de RNAm, que foram detectados após mais de 40 ciclos de PCR. Em cultura celular de GL, um vetor de adenovírus codificando β -galactosida se mostrou tropismo para células interacinares e níveis de transfecção em torno de 40% (Banin, Obolensky et al. 2003). Na GS o AdLTR2EF1 α -hEPO tem tropismo maior e o tecido também é mais volumoso, dessa forma o impacto da transferência gênica foi significativa na preservação da secreção lacrimal, da espessura do epitélio da córnea, mas também elevou o hematócrito.

Estudos prévios mostraram que esse vetor viral previne os efeitos negativos dos danos da radioterapia nas glândulas exócrinas, não apenas localmente, mas da mesma forma, também aumentando o hematócrito e protegendo as glândulas lacrimais indiretamente, uma vez que não foram submetidas a transferência gênica (Rocha, Cotrim et al. 2013). Essas observações indicam que uma boa combinação de gene terapêutico, vetor viral e órgão a ser transfectado é uma combinação em TG.

A toxicidade de BAC por aplicação tópica induziu vários elementos de doença do olho seco em ratos, incluindo ceratite, baixa secreção lacrimal e alta osmolaridade da lágrima, em estudos prévios do nosso grupo e de outros laboratórios. As possíveis causas são lesões epiteliais e epiteliais da córnea direta pela propriedade cáustica e neurotóxica do BAC, que afetam a córnea localmente e o arco-reflexo promovido pela inervação sensorial e efetora autonômica sobre a unidade funcional lacrimal (LFU) (Stern, Gao et al. 2004, Marques, Alves et al. 2015).

O efeito anabólico da *EPO* é agora bem reconhecido e vai além da linhagem de glóbulos vermelhos. Estudos recentes mostram, por exemplo, em células epiteliais, efeitos que vão da inibição de TNF- α e citoproteção contra infecção na retina em desenvolvimento (Brines and Cerami 2006, Arcasoy 2008, Loeliger, Mackintosh et al. 2011). Por outro lado, observações sugerem que a *EPO* desempenha papel no crescimento e manutenção do pterígio devido às suas características pró-angiogênicas (Kase, Osaki et al. 2007). No presente relato, a redução da secreção lacrimal causada pela aplicação tópica da BAC foi prevenida com TG, tanto a GL como a GS em ratos tratados com AdLTR2EF1 α -hEPO. Essas observações sugerem que a *EPO* não está atuando exclusivamente pela ação direta como um novo elemento no conteúdo das lágrimas, mas talvez atuando localmente no tecido e como agente terapêutico distante, já que sua expressão na GS também foi capaz de prevenir a redução da secreção, além de aumentar o hematócrito com AdLTR2EF1 α -hEPO na GS de ratos nesse estudo. Observações semelhantes foram relatadas em camundongos submetidos à radioterapia (Rocha, Cotrim et al. 2013).

Fragilidades do estudo: a acurácia da medida do epitélio da córnea mostrou grande variação entre 2 experimentos feitos em momentos diferentes. As causas podem ser relacionadas a grupos de animais diferentes, problemas na normatização da medida da espessura central ou outros fatores não identificados. De qualquer

forma, usamos controles simultâneos e consideramos relevante mostrar que o adenovírus reduz a espessura nas duas ocasiões, como alerta sobre a sua segurança. A medida da *EPO* na lágrima seria útil para confirmar o efeito terapêutico local, porém a instabilidade da lágrima, os baixos volumes obtidos em estudo do nosso grupo não tem permitido êxito nessa análise. O efeito da *EPO* no volume salivar não foi medido e esse teste poderia ter confirmado o efeito terapêutico na terapia genica na GS. A aplicação de Ad vírus com efeito nulo seria um controle interessante, mas estudo anterior do nosso grupo revelou que seu comportamento é similar ao da aplicação de simples salina em vários parâmetros e dessa forma, não foi usado.

Apesar de na natureza a exposição das células epiteliais de mamíferos ao adenovírus ter ação limitada no tempo, isso não corre com o vetor Ad viral usado aqui, por causa da sua modificação para perpetuar sua permanência e ação no tecido alvo, adicionando uma sequência genética de retrovírus como promotor, detalhada em publicação anterior (Zheng, Vitolo et al. 2008). Essas e outras ações da engenharia genética podem beneficiar no futuro uma boa proposta de TG.

Embora não se saiba se a terapia gênica em GL é sustentada e segura a longo prazo, o esclarecimento dessas questões pode torná-la uma estratégia útil para a cicatrização de feridas e prevenção de inflamação em várias doenças que causam ceratopatia neurotrófica ou inflamatória. Da mesma forma, estudos adicionais são necessários para esclarecer se a proteção epitelial oferecida pela *EPO* observada aqui teria benefícios clínicos adicionais (por exemplo, diminuir a dor, fotofobia e visão turva).

6. Conclusões

Conclusões

6.1. Conclusão Geral:

O tratamento com colírio BAC 0,2% diminuiu a secreção lacrimal nos animais tratados e o pré-tratamento com o vetor adenovírus recombinante com o gene da eritropoietina na GL ou na GS preveniu em parte esse efeito, sendo um potencial agente terapêutico.

6.2. Conclusões específicas:

- O gene da *hEPO* enviado com vetor de adenovírus foi expresso na GL.
- O vetor adenovírus aplicado em GL e GS de ratos se mostrou seguro pois a curto prazo, ele age localmente, sem alterar a estrutura e função dos tecidos tratados;
- AdLTR2EF1 α -*hEPO* teve impacto no aumento de citocinas pro-inflamatórias na GL, diminuição a espessura do epitélio da córnea, porém preveniu a redução da secreção lacrimal comparada aos animais tratados apenas com BAC.

7. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Alves, M., P. S. Reinach, J. S. Paula, A. A. Vellasco e Cruz, L. Bacheche, J. Faustino, F. P. Aranha, A. Vigorito, C. A. de Souza and E. M. Rocha (2014). "Comparison of diagnostic tests in distinct well-defined conditions related to dry eye disease." PLoS One **9**(5): e97921.
- Arcasoy, M. O. (2008). "The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin." Br J Haematol **141**(1): 14-31.
- Baffa Ldo, P., J. R. Ricardo, A. C. Dias, C. M. Modulo, A. M. Braz, J. S. Paula, L. Rodrigues Mde and E. M. Rocha (2008). "Tear film and ocular surface alterations in chronic users of antiglaucoma medications." Arq Bras Oftalmol **71**(1): 18-21.
- Bahlmann, F. H., K. De Groot, J. M. Spandau, A. L. Landry, B. Hertel, T. Duckert, S. M. Boehm, J. Menne, H. Haller and D. Fliser (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." Blood **103**(3): 921-926.
- Bangari, D. S. and S. K. Mittal (2006). "Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity." Curr Gene Ther **6**(2): 215-226.
- Banin, E., A. Obolensky, E. Piontek, H. Falk, E. Pikarsky, J. Pe'er, A. Panet and I. Chowers (2003). "Gene delivery by viral vectors in primary cultures of lacrimal gland tissue." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(4): 1529-1533.
- Baum, B. J., J. Adriaansen, A. P. Cotrim, C. M. Goldsmith, P. Perez, S. Qi, A. M. Rowzee and C. Zheng (2010). "Gene therapy of salivary diseases." Methods Mol Biol **666**: 3-20.
- Baum, B. J., I. Alevizos, C. Zheng, A. P. Cotrim, S. Liu, L. McCullagh, C. M. Goldsmith, P. D. Burbelo, D. E. Citrin, J. B. Mitchell, L. K. Nottingham, S. F. Rudy, C. Van Waes, M. A. Whatley, J. S. Brahim, J. A. Chiorini, S. Danielides, R. J. Turner, N. J. Patronas, C. C. Chen, N. P. Nikolov and G. G. Illei (2012). "Early responses to

adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(47): 19403-19407.

Baum, B. J., M. E. Berkman, Y. Marmary, C. M. Goldsmith, L. Baccaglini, S. Wang, R. B. Wellner, A. T. Hoque, J. C. Atkinson, H. Yamagishi, H. Kagami, A. F. Parlow and J. Chao (1999). "Polarized secretion of transgene products from salivary glands in vivo." Hum Gene Ther **10**(17): 2789-2797.

Baum, B. J., A. Voutetakis and J. Wang (2004). "Salivary glands: novel target sites for gene therapeutics." Trends Mol Med **10**(12): 585-590.

Baum, C., O. Kustikova, U. Modlich, Z. Li and B. Fehse (2006). "Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors." Hum Gene Ther **17**(3): 253-263.

Bernaudin, M., H. H. Marti, S. Roussel, D. Divoux, A. Nouvelot, E. T. MacKenzie and E. Petit (1999). "A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab **19**(6): 643-651.

Bessis, N., F. J. GarciaCozar and M. C. Boissier (2004). "Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms." Gene Ther **11 Suppl 1**: S10-17.

Bianchi, R., M. Brines, G. Lauria, C. Savino, A. Gilardini, G. Nicolini, V. Rodriguez-Menendez, N. Oggioni, A. Canta, P. Penza, R. Lombardi, C. Minoia, A. Ronchi, A. Cerami, P. Ghezzi and G. Cavaletti (2006). "Protective effect of erythropoietin and its carbamylated derivative in experimental Cisplatin peripheral neurotoxicity." Clin Cancer Res **12**(8): 2607-2612.

Bianchi, R., B. Buyukakilli, M. Brines, C. Savino, G. Cavaletti, N. Oggioni, G. Lauria, M. Borgna, R. Lombardi, B. Cimen, U. Comelekoglu, A. Kanik, C. Tataroglu, A.

Referências Bibliográficas

- Cerami and P. Ghezzi (2004). "Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(3): 823-828.
- Brines, M. and A. Cerami (2006). "Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise." Kidney Int **70**(2): 246-250.
- Brines, M., G. Grasso, F. Fiordaliso, A. Sfacteria, P. Ghezzi, M. Fratelli, R. Latini, Q. W. Xie, J. Smart, C. J. Su-Rick, E. Pobre, D. Diaz, D. Gomez, C. Hand, T. Coleman and A. Cerami (2004). "Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14907-14912.
- Bromberg, B. B. and M. H. Welch (1985). "Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats." Exp Eye Res **40**(2): 313-320.
- Bryskier, A. (2002). "Viridans group streptococci: a reservoir of resistant bacteria in oral cavities." Clin Microbiol Infect **8**(2): 65-69.
- Buron, N., O. Micheau, S. Cathelin, P. O. Lafontaine, C. Creuzot-Garcher and E. Solary (2006). "Differential mechanisms of conjunctival cell death induction by ultraviolet irradiation and benzalkonium chloride." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(10): 4221-4230.
- Caprara, C., C. Britschgi, M. Samardzija and C. Grimm (2014). "The erythropoietin receptor is not required for the development, function, and aging of rods and cells in the retinal periphery." Mol Vis **20**: 307-324.
- Carretero, M., M. J. Escamez, F. Prada, I. Mirones, M. Garcia, A. Holguin, B. Duarte, O. Podhajcer, J. L. Jorcano, F. Larcher and M. Del Rio (2006). "Skin gene therapy for acquired and inherited disorders." Histol Histopathol **21**(11): 1233-1247.
- Castle, D. and A. Castle (1998). "Intracellular transport and secretion of salivary proteins." Crit Rev Oral Biol Med **9**(1): 4-22.

- Chang, J. H., E. E. Gabison, T. Kato and D. T. Azar (2001). "Corneal neovascularization." Curr Opin Ophthalmol **12**(4): 242-249.
- Charnock, C. (2006). "Are multidose over-the-counter artificial tears adequately preserved?" Cornea **25**(4): 432-437.
- Chateauvieux, S., C. Grigorakaki, F. Morceau, M. Dicato and M. Diederich (2011). "Erythropoietin, erythropoiesis and beyond." Biochem Pharmacol **82**(10): 1291-1303.
- Chen, W., Z. Li, J. Hu, Z. Zhang, L. Chen, Y. Chen and Z. Liu (2011). "Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit." PLoS One **6**(10): e26103.
- Côco, M., N. T. Baba and J. M. F. Sallum (2007). "Avaliação da autofluorescência do fundo de olho nas distrofias de retina com o aparelho Heidelberg Retina Angiograph2." Arquivos Brasileiros de Oftalmologia **70**: 739-745.
- Conrad, K. P., D. F. Benyo, A. Westerhausen-Larsen and T. M. Miles (1996). "Expression of erythropoietin by the human placenta." FASEB J **10**(7): 760-768.
- Cope, D. K. and W. R. Lariviere (2006). "Gene therapy and chronic pain." ScientificWorldJournal **6**: 1066-1074.
- Dannies, P. S. (1999). "Protein hormone storage in secretory granules: mechanisms for concentration and sorting." Endocr Rev **20**(1): 3-21.
- Datta, S., C. Baudouin, F. Brignole-Baudouin, A. Denoyer and G. A. Cortopassi (2017). "The Eye Drop Preservative Benzalkonium Chloride Potently Induces Mitochondrial Dysfunction and Preferentially Affects LHON Mutant Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **58**(4): 2406-2412.
- Delporte, C., B. C. O'Connell, X. He, H. E. Lancaster, A. C. O'Connell, P. Agre and B. J. Baum (1997). "Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the

Referências Bibliográficas

- aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3268-3273.
- Diego, J. L., L. Bidikov, M. G. Pedler, J. B. Kennedy, H. Quiroz-Mercado, D. G. Gregory, J. M. Petrash and E. A. McCourt (2016). "Effect of human milk as a treatment for dry eye syndrome in a mouse model." Mol Vis **22**: 1095-1102.
- Enquist, I. B., E. Nilsson, A. Ooka, J. E. Mansson, K. Olsson, M. Ehinger, R. O. Brady, J. Richter and S. Karlsson (2006). "Effective cell and gene therapy in a murine model of Gaucher disease." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13819-13824.
- Faria e Souza, S. J., A. C. O. Romano, E. Espana, S. H. Yoo, S. C. Tseng and J. A. P. Gomes (2006). Anatomia Funcional da Superfície Ocular. Superfície Ocular. J. A. P. Gomes and M. R. Alves. Rio de Janeiro, Cultura Médica: 3-13.
- Friedmann, T. (1997). "The road toward human gene therapy--a 25-year perspective." Ann Med **29**(6): 575-577.
- Gardlik, R., R. Palffy, J. Hodossy, J. Lukacs, J. Turna and P. Celec (2005). "Vectors and delivery systems in gene therapy." Med Sci Monit **11**(4): RA110-121.
- George, J., E. Goldstein, A. Abashidze, D. Wexler, S. Hamed, H. Shmilovich, V. Deutsch, H. Miller, G. Keren and A. Roth (2005). "Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner." Cardiovasc Res **68**(2): 299-306.
- Gerina, L. S. (1980). "[Role of salivary glands in extrarenal production of erythropoietin]." Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova **66**(9): 1412-1417.
- Goncalves, M. A. (2005). "Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector." Virology **2**: 43-60.
- Gorr, S. U., S. G. Venkatesh and D. S. Darling (2005). "Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage." J Dent Res **84**(6): 500-509.

Grant, R. L., C. Yao, D. Gabaldon and D. Acosta (1992). "Evaluation of surfactant cytotoxicity potential by primary cultures of ocular tissues: I. Characterization of rabbit corneal epithelial cells and initial injury and delayed toxicity studies." Toxicology **76**(2): 153-176.

Greber, U. F., M. Suomalainen, R. P. Stidwill, K. Boucke, M. W. Ebersold and A. Helenius (1997). "The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry." EMBO J **16**(19): 5998-6007.

Greber, U. F., P. Webster, J. Weber and A. Helenius (1996). "The role of the adenovirus protease on virus entry into cells." EMBO J **15**(8): 1766-1777.

Grimm, C., A. Wenzel, M. Groszer, H. Mayser, M. Seeliger, M. Samardzija, C. Bauer, M. Gassmann and C. E. Reme (2002). "HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration." Nat Med **8**(7): 718-724.

Hacein-Bey-Abina, S., F. Le Deist, F. Carlier, C. Bouneaud, C. Hue, J. P. De Villartay, A. J. Thrasher, N. Wulffraat, R. Sorensen, S. Dupuis-Girod, A. Fischer, E. G. Davies, W. Kuis, L. Leiva and M. Cavazzana-Calvo (2002). "Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy." N Engl J Med **346**(16): 1185-1193.

Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer and M. Cavazzana-Calvo (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-419.

Referências Bibliográficas

- Haisma, H. J. and O. de Hon (2006). "Gene doping." Int J Sports Med **27**(4): 257-266.
- Harel, J., E. Rassart and P. Jolicoeur (1981). "Cell cycle dependence of synthesis of unintegrated viral DNA in mouse cells newly infected with murine leukemia virus." Virology **110**(1): 202-207.
- Harui, A., S. Suzuki, S. Kochanek and K. Mitani (1999). "Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors." J Virol **73**(7): 6141-6146.
- He, X., C. M. Goldsmith, Y. Marmary, R. B. Wellner, A. F. Parlow, L. K. Nieman and B. J. Baum (1998). "Systemic action of human growth hormone following adenovirus-mediated gene transfer to rat submandibular glands." Gene Ther **5**(4): 537-541.
- Heeschen, C., A. Aicher, R. Lehmann, S. Fichtlscherer, M. Vasa, C. Urbich, C. Mildner-Rihm, H. Martin, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." Blood **102**(4): 1340-1346.
- Hodges, R. R., I. Raddassi, D. Zoukhri, A. Toker, A. Kazlauskas and D. A. Dartt (2004). "Effect of overexpression of constitutively active PKC α on rat lacrimal gland protein secretion." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 3974-3981.
- Hoque, A. T., L. Baccaglini and B. J. Baum (2001). "Hydroxychloroquine enhances the endocrine secretion of adenovirus-directed growth hormone from rat submandibular glands in vivo." Hum Gene Ther **12**(10): 1333-1341.
- Huang, G. T., H. B. Zhang, D. Kim, L. Liu and T. Ganz (2002). "A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo." Hum Gene Ther **13**(17): 2017-2025.
- Huard, J., Y. Li, H. Peng and F. H. Fu (2003). "Gene therapy and tissue engineering for sports medicine." J Gene Med **5**(2): 93-108.

Jackson, D. A., R. H. Symons and P. Berg (1972). "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(10): 2904-2909.

Jacobs, K., C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch and et al. (1985). "Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin." Nature **313**(6005): 806-810.

Jaffe, H. A., C. Danel, G. Longenecker, M. Metzger, Y. Setoguchi, M. A. Rosenfeld, T. W. Gant, S. S. Thorgeirsson, L. D. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet and et al. (1992). "Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver." Nat Genet **1**(5): 372-378.

Juul, S. E., Y. Zhao, J. B. Dame, Y. Du, A. D. Hutson and R. D. Christensen (2000). "Origin and fate of erythropoietin in human milk." Pediatr Res **48**(5): 660-667.

Kagami, H., B. C. O'Connell and B. J. Baum (1996). "Evidence for the systemic delivery of a transgene product from salivary glands." Hum Gene Ther **7**(17): 2177-2184.

Karthikeyan, B. V. and A. R. Pradeep (2006). "Gene therapy in periodontics: a review and future implications." J Contemp Dent Pract **7**(3): 83-91.

Kase, S., M. Osaki, X. H. Jin, K. Ohgami, K. Yoshida, W. Saito, S. Takahashi, K. Nakanishi, H. Ito and S. Ohno (2007). "Increased expression of erythropoietin receptor in human pterygial tissues." Int J Mol Med **20**(5): 699-702.

Kay, M. A., C. S. Manno, M. V. Ragni, P. J. Larson, L. B. Couto, A. McClelland, B. Glader, A. J. Chew, S. J. Tai, R. W. Herzog, V. Arruda, F. Johnson, C. Scallan, E. Skarsgard, A. W. Flake and K. A. High (2000). "Evidence for gene transfer and

Referências Bibliográficas

- expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector." Nat Genet **24**(3): 257-261.
- Kendirici, M., S. Gur and S. C. Sikka (2005). "Gene therapy for erectile dysfunction." Front Biosci **10**: 2758-2769.
- Kim, J. M., S. J. Kim, H. C. Lee and K. S. Kim (2006). "Development of ligand-dependent regulatory system and its application to gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus." Exp Mol Med **38**(4): 385-392.
- Kinoshita, S., W. Adachi, C. Sotozono, K. Nishida, N. Yokoi, A. J. Quantock and K. Okubo (2001). "Characteristics of the human ocular surface epithelium." Prog Retin Eye Res **20**(5): 639-673.
- Kobayashi, T., H. Yanase, T. Iwanaga, R. Sasaki and M. Nagao (2002). "Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs." Biochem Biophys Res Commun **296**(1): 145-151.
- Kok, M. R., S. Yamano, B. M. Lodde, J. Wang, R. I. Couwenhoven, S. Yakar, A. Voutetakis, D. Leroith, M. Schmidt, S. Afione, S. R. Pillemer, M. T. Tsutsui, P. P. Tak, J. A. Chiorini and B. J. Baum (2003). "Local adeno-associated virus-mediated interleukin 10 gene transfer has disease-modifying effects in a murine model of Sjogren's syndrome." Hum Gene Ther **14**(17): 1605-1618.
- Lee, S., E. R. Barton, H. L. Sweeney and R. P. Farrar (2004). "Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats." J Appl Physiol (1985) **96**(3): 1097-1104.
- Lemp, M. A. and D. E. Wolfley (1992). The Lacrimal Apparatus. Adler's Physiology of the Eye. W. M. Hart Jr. St. Louis, MosbyYear Book, Inc. .
- Li, S. D. and L. Huang (2006). "Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery." Gene Ther **13**(18): 1313-1319.

Lin, C. R., L. C. Yang, T. H. Lee, C. T. Lee, H. T. Huang, W. Z. Sun and J. T. Cheng (2002). "Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats." Gene Ther **9**(18): 1247-1253.

Lin, F. K., S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky and et al. (1985). "Cloning and expression of the human erythropoietin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(22): 7580-7584.

Lin, Z., X. Liu, T. Zhou, Y. Wang, L. Bai, H. He and Z. Liu (2011). "A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride." Mol Vis **17**: 257-264.

Loeliger, M. M., A. Mackintosh, R. De Matteo, R. Harding and S. M. Rees (2011). "Erythropoietin protects the developing retina in an ovine model of endotoxin-induced retinal injury." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(5): 2656-2661.

Loh, Y. P., A. Maldonado, C. Zhang, W. H. Tam and N. Cawley (2002). "Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells." Ann N Y Acad Sci **971**: 416-425.

Losordo, D. W., P. R. Vale, R. C. Hendel, C. E. Milliken, F. D. Fortuin, N. Cummings, R. A. Schatz, T. Asahara, J. M. Isner and R. E. Kuntz (2002). "Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia." Circulation **105**(17): 2012-2018.

Maddula, S., D. K. Davis, S. Maddula, M. K. Burrow and B. K. Ambati (2011). "Horizons in therapy for corneal angiogenesis." Ophthalmology **118**(3): 591-599.

Magnanti, M., O. Gandini, L. Giuliani, P. Gazzaniga, H. H. Marti, A. Gradilone, L. Frati, A. M. Agliano and M. Gassmann (2001). "Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells." Blood **98**(9): 2872-2874.

Referências Bibliográficas

- Marques, D. L., M. Alves, C. M. Modulo, L. E. C. M. Silva, P. Reinach and E. M. Rocha (2015). "Lacrimal Osmolarity and ocular surface in experimental model of dry eye caused by toxicity." Rev Bras Oftalmol **74**(2): 68-72.
- Marti, H. H., R. H. Wenger, L. A. Rivas, U. Straumann, M. Digicaylioglu, V. Henn, Y. Yonekawa, C. Bauer and M. Gassmann (1996). "Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain." Eur J Neurosci **8**(4): 666-676.
- Martin, J. M., M. Green, K. A. Barbadora and E. R. Wald (2002). "Erythromycin-resistant group A streptococci in schoolchildren in Pittsburgh." N Engl J Med **346**(16): 1200-1206.
- Mastrangeli, A., C. Danel, M. A. Rosenfeld, L. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet, A. Pavirani, J. P. Lecocq and R. G. Crystal (1993). "Diversity of airway epithelial cell targets for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer." J Clin Invest **91**(1): 225-234.
- Mastrangeli, A., B. O'Connell, W. Aladib, P. C. Fox, B. J. Baum and R. G. Crystal (1994). "Direct in vivo adenovirus-mediated gene transfer to salivary glands." Am J Physiol **266**(6 Pt 1): G1146-1155.
- Masuda, S., T. Kobayashi, M. Chikuma, M. Nagao and R. Sasaki (2000). "The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(6): E1038-1044.
- Melli, G., C. Jack, G. L. Lambrinos, M. Ringkamp and A. Hoke (2006). "Erythropoietin protects sensory axons against paclitaxel-induced distal degeneration." Neurobiol Dis **24**(3): 525-530.
- Miller, D. G., M. A. Adam and A. D. Miller (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection." Mol Cell Biol **10**(8): 4239-4242.

Misra, S. (2013). "Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution." J Assoc Physicians India **61**(2): 127-133.

Mohan, R. R., A. Sharma, M. V. Netto, S. Sinha and S. E. Wilson (2005). "Gene therapy in the cornea." Prog Retin Eye Res **24**(5): 537-559.

Moon, J., J. H. Ko, C. H. Yoon, M. K. Kim and J. Y. Oh (2018). "Effects of 20% Human Serum on Corneal Epithelial Toxicity Induced by Benzalkonium Chloride: In Vitro and Clinical Studies." Cornea **37**(5): 617-623.

Murphy, J. E., S. Zhou, K. Giese, L. T. Williams, J. A. Escobedo and V. J. Dwarki (1997). "Long-term correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by a single intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus encoding mouse leptin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13921-13926.

Nelson, J. D. (1982). "Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. Ocular pemphigoid." Surv Ophthalmol **27**(1): 67-69.

Nominato, L. F., A. C. Dias, L. C. Dias, M. Z. Fantucci, L. E. C. Mendes da Silva, A. A. Murashima and E. M. Rocha (2018). "Prevention of Corneal Neovascularization by Adenovirus Encoding Human Vascular Endothelial Growth Factor Soluble Receptor (s-VEGFR1) in Lacrimal Gland." Invest Ophthalmol Vis Sci **59**(15): 6036-6044.

O'Connell, B. C., T. Xu, T. J. Walsh, T. Sein, A. Mastrangeli, R. G. Crystal, F. G. Oppenheim and B. J. Baum (1996). "Transfer of a gene encoding the anticandidal protein histatin 3 to salivary glands." Hum Gene Ther **7**(18): 2255-2261.

Perez, P., S. Aguilera, N. Olea, C. Alliende, C. Molina, M. Brito, M. J. Barrera, C. Leyton, A. Rowzee and M. J. Gonzalez (2010). "Aberrant localization of ezrin correlates with salivary acini disorganization in Sjogren's Syndrome." Rheumatology (Oxford) **49**(5): 915-923.

Referências Bibliográficas

- Perez, P., A. M. Rowzee, C. Zheng, J. Adriaansen and B. J. Baum (2010). "Salivary epithelial cells: an unassuming target site for gene therapeutics." Int J Biochem Cell Biol **42**(6): 773-777.
- Pflugfelder, S. C., A. Solomon and M. E. Stern (2000). "The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review." Cornea **19**(5): 644-649.
- Portal, C., V. Gouyer, F. Gottrand and J. L. Desseyn (2017). "Preclinical mouse model to monitor live Muc5b-producing conjunctival goblet cell density under pharmacological treatments." PLoS One **12**(3): e0174764.
- Rajagopalan, S., E. R. Mohler, 3rd, R. J. Lederman, F. O. Mendelsohn, J. F. Saucedo, C. K. Goldman, J. Blebea, J. Macko, P. D. Kessler, H. S. Rasmussen and B. H. Annex (2003). "Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication." Circulation **108**(16): 1933-1938.
- Reifenberg, K., E. Hildt, B. Lecher, E. Wiese, P. Nusser, S. Ott, K. Yamamura, G. Rutter and J. Lohler (2006). "IFN γ expression inhibits LHBs storage disease and ground glass hepatocyte appearance, but exacerbates inflammation and apoptosis in HBV surface protein-accumulating transgenic livers." Liver Int **26**(8): 986-993.
- Ritter, T., M. Lehmann and H. D. Volk (2002). "Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors." BioDrugs **16**(1): 3-10.
- Rocha, E. M., A. P. Cotrim, C. Zheng, P. P. Riveros, B. J. Baum and J. A. Chiorini (2013). "Recovery of radiation-induced dry eye and corneal damage by pretreatment with adenoviral vector-mediated transfer of erythropoietin to the salivary glands in mice." Hum Gene Ther **24**(4): 417-423.

Rosenblatt, M. I. and D. T. Azar (2004). "Gene therapy of the corneal epithelium." Int Ophthalmol Clin **44**(3): 81-90.

Rosenfeld, M. A., W. Siegfried, K. Yoshimura, K. Yoneyama, M. Fukayama, L. E. Stier, P. K. Paakko, P. Gilardi, L. D. Stratford-Perricaudet, M. Perricaudet and et al. (1991). "Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo." Science **252**(5004): 431-434.

Rosenfeld, M. A., K. Yoshimura, B. C. Trapnell, K. Yoneyama, E. R. Rosenthal, W. Dalemans, M. Fukayama, J. Bargon, L. E. Stier, L. Stratford-Perricaudet and et al. (1992). "In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium." Cell **68**(1): 143-155.

Rubanyi, G. M. (2001). "The future of human gene therapy." Mol Aspects Med **22**(3): 113-142.

Sasaki, H., B. Bothner, A. Dell and M. Fukuda (1987). "Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA." J Biol Chem **262**(25): 12059-12076.

Sato, T., T. Maekawa, S. Watanabe, K. Tsuji and T. Nakahata (2000). "Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin." J Clin Invest **106**(2): 263-270.

Schaack, J., W. Y. Ho, P. Freimuth and T. Shenk (1990). "Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA." Genes Dev **4**(7): 1197-1208.

Schein, O. D., B. Munoz, J. M. Tielsch, K. Bandeen-Roche and S. West (1997). "Prevalence of dry eye among the elderly." Am J Ophthalmol **124**(6): 723-728.

Referências Bibliográficas

Schein, O. D., J. M. Tielsch, B. Munoz, K. Bandeen-Roche and S. West (1997).

"Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective." Ophthalmology **104**(9): 1395-1401.

Schmidt, K., J. Hoffend, A. Altmann, F. Kiessling, L. Strauss, D. Koczan, W. Mier, M. Eisenhut, R. Kinscherf and U. Haberkorn (2006). "Troponin I overexpression inhibits tumor growth, perfusion, and vascularization of morris hepatoma." J Nucl Med **47**(9): 1506-1514.

Sekiguchi, Y., S. Kikuchi, R. R. Myers and W. M. Campana (2003). "ISSLS prize winner: Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush." Spine (Phila Pa 1976) **28**(23): 2577-2584.

Springett, G. M., R. C. Moen, S. Anderson, R. M. Blaese and W. F. Anderson (1989). "Infection efficiency of T lymphocytes with amphotropic retroviral vectors is cell cycle dependent." J Virol **63**(9): 3865-3869.

Stern, M. E., J. Gao, K. F. Siemasko, R. W. Beuerman and S. C. Pflugfelder (2004). "The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye." Exp Eye Res **78**(3): 409-416.

Stopka, T., J. H. Zivny, P. Stopkova, J. F. Prchal and J. T. Prchal (1998). "Human hematopoietic progenitors express erythropoietin." Blood **91**(10): 3766-3772.

Sullivan, D. A. and J. A. Edwards (1997). "Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjogren's syndrome." J Steroid Biochem Mol Biol **60**(3-4): 237-245.

Sullivan, D. A., E. M. Rocha, M. D. Ullman, K. L. Krenzer, J. Gao, I. Toda, M. R.

Dana, D. Bazzinotti, L. A. da Silveira and L. A. Wickham (1998). "Androgen regulation of the meibomian gland." Adv Exp Med Biol **438**: 327-331.

Tan, P. H. (2006). "9th American Society of Gene Therapy annual meeting." Expert Opin Biol Ther **6**(8): 839-842.

Tekirian, T. L. (2002). "The central role of the trans-Golgi network as a gateway of the early secretory pathway: physiologic vs nonphysiologic protein transit." Exp Cell Res **281**(1): 9-18.

Toda, I., B. D. Sullivan, E. M. Rocha, L. A. Da Silveira, L. A. Wickham and D. A. Sullivan (1999). "Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjogren's syndrome." Exp Eye Res **69**(4): 355-366.

Trousdale, M. D., Z. Zhu, D. Stevenson, J. E. Schechter, T. Ritter and A. K. Mircheff (2005). "Expression of TNF inhibitor gene in the lacrimal gland promotes recovery of tear production and tear stability and reduced immunopathology in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis." J Autoimmune Dis **2**: 6-12.

Tseng, S. C. and K. Tsubota (1997). "Important concepts for treating ocular surface and tear disorders." Am J Ophthalmol **124**(6): 825-835.

Vellai, T. and G. Vida (1999). "The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells." Proc Biol Sci **266**(1428): 1571-1577.

Verma, I. M. and N. Somia (1997). "Gene therapy -- promises, problems and prospects." Nature **389**(6648): 239-242.

Vogt, C., S. Pentz and I. N. Rich (1989). "A role for the macrophage in normal hemopoiesis: III. In vitro and in vivo erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization." Exp Hematol **17**(5): 391-397.

Voutetakis, A., I. Bossis, M. R. Kok, W. Zhang, J. Wang, A. P. Cotrim, C. Zheng, J. A. Chiorini, L. K. Nieman and B. J. Baum (2005). "Salivary glands as a potential gene transfer target for gene therapeutics of some monogenetic endocrine disorders." J Endocrinol **185**(3): 363-372.

Referências Bibliográficas

- Voutetakis, A., M. R. Kok, C. Zheng, I. Bossis, J. Wang, A. P. Cotrim, N. Marracino, C. M. Goldsmith, J. A. Chiorini, Y. P. Loh, L. K. Nieman and B. J. Baum (2004). "Reengineered salivary glands are stable endogenous bioreactors for systemic gene therapeutics." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3053-3058.
- Wang, Z., K. Zhao, Z. Song, L. Shen and J. Qu (2009). "Erythropoietin as a novel therapeutic agent for atrophic age-related macular degeneration." Med Hypotheses **72**(4): 448-450.
- Wilson, D. R. (2002). "Viral-mediated gene transfer for cancer treatment." Curr Pharm Biotechnol **3**(2): 151-164.
- Xiong, C., D. Chen, J. Liu, B. Liu, N. Li, Y. Zhou, X. Liang, P. Ma, C. Ye, J. Ge and Z. Wang (2008). "A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(5): 1850-1856.
- Yang, Q., Y. Zhang, X. Liu, N. Wang, Z. Song and K. Wu (2017). "A Comparison of the Effects of Benzalkonium Chloride on Ocular Surfaces between C57BL/6 and BALB/c Mice." Int J Mol Sci **18**(3).
- Ye, J., H. Wu, H. Zhang, Y. Wu, J. Yang, X. Jin and X. Shi (2011). "Role of benzalkonium chloride in DNA strand breaks in human corneal epithelial cells." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **249**(11): 1681-1687.
- Zhang, Z., W. Z. Yang, Z. Z. Zhu, Q. Q. Hu, Y. F. Chen, H. He, Y. X. Chen and Z. G. Liu (2014). "Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(5): 2963-2974.
- Zheng, C. and B. J. Baum (2002). "Long-term expression after infection by the hybrid vector AdLTR-luc is from integrated transgene." Biochem Biophys Res Commun **291**(1): 34-40.

- Zheng, C., B. J. Baum, M. J. Iadarola and B. C. O'Connell (2000). "Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector." Nat Biotechnol **18**(2): 176-180.
- Zheng, C., J. M. Vitolo, W. Zhang, F. Mineshiba, J. A. Chiorini and B. J. Baum (2008). "Extended transgene expression from a nonintegrating adenoviral vector containing retroviral elements." Mol Ther **16**(6): 1089-1097.
- Zheng, C., J. Wang and B. J. Baum (2003). "Integration efficiency of a hybrid adenoretroviral vector." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 115-120.
- Zhou, L., S. Z. Zhao, S. K. Koh, L. Chen, C. Vaz, V. Tanavde, X. R. Li and R. W. Beuerman (2012). "In-depth analysis of the human tear proteome." J Proteomics **75**(13): 3877-3885.
- Zhou, S., J. E. Murphy, J. A. Escobedo and V. J. Dwarki (1998). "Adeno-associated virus-mediated delivery of erythropoietin leads to sustained elevation of hematocrit in nonhuman primates." Gene Ther **5**(5): 665-670.
- Zhu, Z., D. Stevenson, T. Ritter, J. E. Schechter, A. K. Mircheff, H. R. Kaslow and M. D. Trousdale (2002). "Expression of IL-10 and TNF-inhibitor genes in lacrimal gland epithelial cells suppresses their ability to activate lymphocytes." Cornea **21**(2): 210-214.
- Zoukhri, D. (2006). "Effect of inflammation on lacrimal gland function." Exp Eye Res **82**(5): 885-898.