Expressão do vetor retroviral pCLPG medido em receptores de transplante de medula óssea

Paula Fratini

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT/ para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área de Concentração:
Biotecnologia

São Paulo

2008

Expressão do vetor retroviral pCLPG medido em receptores de transplante de medula óssea

Paula Fratini

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT/ para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientador (a): Prof. Dr. Bryan Eric
Strauss

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fratini, Paula.

Expressão do vetor retroviral pCLpG medido em recipientes de transplante de medula óssea / Paula Fratini. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Assessment of pCLpG retroviral vector expression in vivo utilizing serial transplantation of transduced bone marrow cells.

Descritores: 1. Retroviridae 2. Transplante de medula óssea 3. Expressão gênica 4. Câncer 5. Oncogenes 6. Vírus I. Strauss, Bryan Eric II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB215/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Paula Fratini.

Título da Tese: Expressão do vetor retroviral pCLPG medido em
recipientes de transplante de medula óssea.

Orientador(a): Bryan Eric Strauss.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Agradecimentos

Ao Dr. Bryan Eric Strauss, pela sua orientação constante, apoio e ensinamentos durante a execução deste trabalho, muito importantes para meu desenvolvimento científico.

À minha equipe de trabalho do Setor de Vetores Virais – Incor: Márcio, Christian, Rafael, Vinícius, Carol e Daniela, pelos aprendizados, trocas de idéias e momentos de descontração.

Ao Dr. Márcio Chaim Bajgelman, pelo ensinamentos de várias técnicas de grande importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Eugenia Costanzi-Strauss por colaborar em diversas etapas deste experimento desenvolvidas em seu laboratório.

À Dra. Juliana Colozzo Gregório , pelas “dicas” de trabalho e grande amizade ao longo desses anos de Doutorado.

Ao Dr. José Eduardo Krieger, diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – INCOR FMUSP, por disponibilizar toda seu laboratório , técnicos e demais profissionais para as etapas principais do desenvolvimento deste trabalho.

À Mariliza Velho e Daniela Jardim – Incor, pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas de Real Time PCR.

À Eng. Elisabeth Somessari e Carlos Gaia – IPEN USP, por disponibilizar a irradiação dos animais.

Ao Dr. Roger Chammas, Cinthia e Milena Coutinho por sempre disponibilizarem o uso do Centro de Bioterismo FMUSP.

À técnica do setor de Imunologia – Incor, Sandra Maria, por disponibilizar e auxiliar no manuseio do citômetro de fluxo.

À Fapesp pelo apoio Financeiro e ao Instituto do Milênio – Rede de Terapia Gênica, CNPq/MCT.

À toda minha família, pela compreensão durante estes anos de trabalho.

Aos meus tios e mestres Teresa e Paulo Marinho pelo exemplo de carreira a ser seguido.

Ao Marcos, Toti, por todo apoio e compreensão ao longo desses anos.

Resumo

Fratini P. Expressão do vetor retroviral pCLPG medido em animais recipientes de transplante de medula óssea. [Tese de Doutorado]. - São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008

O vetor retroviral é uma ferramenta de transferência gênica largamente utilizada em ensaios de laboratório e em protocolos clínicos. Nosso laboratório desenvolveu um novo vetor, chamado pCLPG, com expressão viral sob comando de p53, um supressor de tumor e um ativador indutível de transcrição, com alvo de estabelecer um vetor com alta expressão. O sistema pCLPG demonstrou um nível de expressão superior ao vetor não modificado em ensaios em cultura de células. Neste projeto, nosso objetivo foi caracterizar a expressão do vetor pCLPG *in vivo*, utilizando um modelo animal de transdução de células da medula óssea (CMO) do camundongo C57BL/6 seguido por transplante em animais recipientes previamente irradiados para abolir o sistema hematopoiético. Visando observar a expressão sustentada do transgene *in vivo*, padronizamos o transplante de CMO seriado, transdução do vetor retroviral, realizamos análise do gene repórter eGFP por citometria de fluxo e análise por real time PCR, além da observação de outros tecidos como baço, timo, sangue periférico. Realizamos também análises hematológicas nos animais transplantados para observação de possíveis efeitos adversos relacionados com a presença do retrovírus. Com estes ensaios não foi observado uma diferença significativa entre o desempenho do vetor parental pCLeGFP e o pCLPGeGFP. Tanto o número de células eGFP positivas quanto a expressão do gene repórter diminuíram ao longo do processo de transplante seriado. Expressão foi observada em 3-4%, 2-3% ou 2-3% das células recuperadas da medula óssea dos recipientes primários, secundários ou terciários de CMO transduzida com o vetor pCLeGFP, mas não no sangue periférico, timo ou baço. Semelhantemente, células eGFP-positivas (6-7%, 4-4,5% ou 3-3,5%) foram observadas após transplante seriado somente na medula óssea de animais recipientes de CMO transduzida com o vetor pCLPGeGFP. Entretanto, sangue periférico foi recuperado dos recipientes e tratado com 5-asacitidina, proporcionando a indução de expressão de eGFP a partir de ambos os vetores em aproximadamente 4% das células, implicando

que o silenciamento viral poderia estar relacionado com processos de metilação. Este estudo demonstrou que as modificações no promotor do vetor pCLPG não foram suficientes para evitar silenciamento de expressão viral no modelo utilizado.

Palavras-chave: retrovírus; transplante de medula óssea; p53; terapia gênica; expressão gênica.

Abstract

Fratini P. Assessment of pCLPG retroviral vector expression in vivo utilizing serial transplantation of transduced bone marrow cells. [Thesis] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008

The retroviral vector is a widely used gene transfer tool in both laboratory assays and clinical trials. Our laboratory developed a new vector, called pCLPG, with viral expression under the command of p53, a tumor suppressor and inducible activator of transcription, with the aim of establishing a vector with high level expression. The level of expression offered by the pCLPG system was superior to the non-modified vector in cell culture assays. In this project, our objective was to characterize the expression of the pCLPG vector in vivo utilizing an animal model where bone marrow cells (BMC) from C57BL/6 mice are transduced and then transplanted in recipient animals that have been previously irradiated in order to abolish the hematopoietic system. With the aim of observing sustained transgene expression in vivo, we standardized serial BMC transplantation, transduction with retroviral vectors and analyzed the eGFP reporter gene by flow cytometry and real time PCR, and also studied other tissues, such as spleen, thymus and peripheral blood. We also performed hematologic analyses in the transplanted animals in to observe possible adverse events related to the presence of the retrovirus. These assays did not reveal a significant difference between the performances of the parental pCLeGFP vector and pCLPGeGFP. Both the number of eGFP-positive cells and the intensity of reporter gene expression diminished during the serial transplant process. Expression was observed in 3-4%, 2-3% or 2-3% of cells recovered from bone marrow of the primary, secondary or terciary recipients of BMC transduced with the pCLeGFP vector, but not in peripheral blood, thymus or spleen. Similarly, eGFP-positive cells (6-7%, 4-4.5% or 3-3.5%) were observed after serial transplantation only in the bone marrow of animals that received BMC transduced with the pCLPGeGFP vector. However, peripheral blood was recovered from recipients and treated with 5-azacytidine, inducing the expression of eGFP from both vectors in approximately 4% of these cells, implying that viral silencing may have been related with methylation. This study

demonstrated that the modifications in the promoter of the pCLPG vector were not sufficient to avoid silencing of viral expression in this model.

Keywords: retrovirus; bone marrow transplant; p53; gene therapy; epigenetics; hematopoietic system.

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição dos protocolos de Terapia Gênica	17
Figura 2. Vetores utilizados em Terapia Gênica	18
Figura 3. Transcrição retroviral reversa.....	24
Figura 4. Esquema de produção e uso de Retrovírus.....	27
Figura 5. Representação esquemática do vetor pCLPG.....	30
Figura 6. Curva padrão para PCR em tempo real – CMO	44
Figura 7. Curva padrão para PCR em tempo real – Cromossomo Y.....	45
Figura 8. Mapas dos vetores pCLeGFP e PCLPGeGFP.....	46
Figuras 9 -10. Porcentagem de células K562 sensíveis à temperatura .	48
Figuras 11-12. Intensidade de expressão de células K562 sensíveis à temperatura	49
Figura 13. Comparação morfológica entre sangue periférico e CMO	50
Figura 14. CMO transduzida com vírus pCLeGFP	52
Figura 15. Transplante seriado de CMO.....	54
Figura 16. Transplante seriado de CMO transduzidas.....	57
Figura 17. CMO transduzidas com pCLeGFP recuperadas de recipiente 2º	61
Figura 18. Esquema de transplante: experimento principal	63
Figura 19. CMO transduzidas transplantadas em recipiente 1º.....	65
Figura 20. Porcentagem e intensidade de eGFP em recipientes 1º	67
Figura 21. Análise de CMO recuperadas de recipiente 1º pCLeGFP....	68
Figura 22 Análise de CMO recuperadas de recipiente 1º pCLPGFP....	68
Figura 23. Porcentagem e intensidade de eGFP em recipientes 2º	69
Figura 24. Análise de CMO recuperadas de recipiente 2 pCLeGFP.....	70
Figura 25. Análise de CMO recuperadas de recipiente 1º pCLPGFP.....	70
Figura 26. Porcentagem e intensidade de eGFP em recipientes 3º	71
Figura 27. Análise de CMO recuperadas de recipiente 3º pCLFP.....	73
Figura 28. Análise de CMO recuperadas de recipiente 3º CLeGFP.....	73
Figura 29. Porcentagem e expressão de CMO transduzidas com pCLeGFP e pCLPGeGFP tratadas com 5-asa	76

Figura 30. Citometria de fluxo para CMO e sangue periférico tratadas com 5-asa	76
Figura 31. PCR em tempo real de recipientes 1º pCLeGFP	82
Figura 32. PCR em tempo real de recipientes 1º pCLPGeGFP.....	82
Figura 33. PCR em tempo real de recipientes 2º pCLeGFP.....	83
Figura 34. PCR em tempo real de recipientes 2ºpCLPGeGFP.....	83
Figura 35. PCR em tempo real de recipientes 3º pCLeGFP.....	84
Figura 36. PCR em tempo real de recipientes 3º pCLPGeGFP.....	84
Figura 37.PCR em tempo real de recipientes 1º pCLeGFP cromossomo Y.....	85
Figura 38.PCR em tempo real de recipientes 1ºpCLPGeGFP cromossomo Y.....	85
Figura 39.PCR em tempo real de recipientes 2º pCLeGFP cromossomo Y.....	86
Figura 40.PCR em tempo real de recipientes 2º pCLPGeGFP cromossomo Y.....	86
Figura 41.PCR em tempo real de recipientes 3º pCLeGFP cromossomo Y.....	87
Figura 42.PCR em tempo real de recipientes 3º pCLPGeGFP cromossomo Y.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers utilizados em ensaios preliminares de PCR	41
Tabela 2. Primers para Real Time PCR	43
Tabela 3. Títulos virais obtidos	47
Tabela 4. Ensaio de transdução de CMO e K562	51
Tabela 5. Sumário de transplante seriado – ensaio piloto.....	55
Tabela 6. Análise de recipientes 3ºsem transdução	55
Tabela 7. Análise hematológica recipiente 1º cmo transduzida	58
Tabela 8. Análise hematológica após 90 dias de transplante	59
Tabela 9. Análise hematológica recipiente 2º após 54 dias de transplante	60
Tabela 10. Sumário de transplantes dos grupos G0, G1 e G2	63
Tabela 11. Exames hematológicos Grupo G0	77
Tabela 12. Exames hematológicos Grupo G1.....	78
Tabela 13.Exames hematológicos Grupo G2	79
Tabela 14. Exames hematológicos Grupo G3	80

Lista de abreviaturas

ADA Adenosina desaminase

CAT *Chloramphenicol acetyl-transferase*

cfu/mL Unidades formadoras de colônia por mililitro

CMV citomegalovírus

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA ácido desoxirribonucléico

FACS citômetro de fluxo

G418 geneticina

GFP proteína fluorescente verde

gfu/mL unidades fluorescentes verdes por mililitro

HBS-2x Solução salina tamponada com hepes, concentrada duas vezes

HIV vírus da imunodeficiência humana

IMDM *Iscove's Modified Dulbecos Medium*

MoMuLV *Moloney Murine Leukemia Virus*

Neo resistência a neomicina

Pb pares de base

PBS sítio de ligação do iniciador

PBS-1x solução salina tamponada com fosfato, concentrada uma vez

RNA ácido ribonucléico

RPM rotações por minuto

SCID Imunodeficiência combinada severa

SV40 *Simian Virus 40*

TR enzima transcriptase reversa

VSV-G proteína G do vírus da estomatite vesicular

Wt tipo selvagem

Sumário

1 Introdução.....	16
1.1 Considerações sobre terapia gênica.....	16
1.2 Uso do retrovírus em terapia gênica	18
1.3 Características dos retrovírus e seus vetores recombinantes	21
1.3.1 Transcriptase reversa	23
1.3.2 pCL: Um vetor retroviral recombinante.....	25
1.4 p53: o supressor de tumor e fator de transcrição.....	27
1.5 pCLPG: Um vetor retroviral com expressão controlada por p53.....	28
1.6 Avaliação da expressão de vetores retrovirais aplicados no sistema hematopoiético	31
2 Objetivos do Projeto	34
2.1 Implementar um modelo de transplante seriado de medula óssea	34
2.2 Avaliação de expressão retroviral em animais transplantados com CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP	34
3. Materiais e Métodos	35
3.1 Preparação de plasmídeos	35
3.2 Manutenção das linhagens celulares	35
3.3 Produção de vírus	36
3.4 Titulação por citometria de fluxo (FACS).....	36
3.5 Análise por citometria de fluxo da expressão de EGFP em células transduzidas	37
3.6 Atividade dos vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP medida em células K562.....	37
3.7 Coleta e cultura de CMO	38
3.8 Transdução de CMO	39
3.10 Análise hematológica de sangue periférico.....	40
3.11 Extração de DNA genômico e PCR comum– ensaio preliminar.....	40
3.12 Extração de DNA genômico a ser utilizado em ensaio de PCR em tempo real	41
3.13 Desenho de oligos iniciadores (primers) para PCR em tempo real e ensaio piloto	42

3.14 PCR em tempo real (Real Time PCR).....	43
3.14.1 Determinação do número de provírus/célula.....	43
3.14.2 Determinação do grau de quimerismo nos animais recipientes.....	45
4. Resultados.....	46
4.1 Produção de vírus pseudotipado com envelope VSVg ou anfotrópico	46
4.2 Teste do vetor pCLPG em célula hematopoiética, ensaios com células K562 contendo um alelo de p53 sensível a temperatura	47
4.3 Padronização dos protocolos de coleta e cultivo de CMO.....	50
4.4 Padronização dos protocolos de transdução de CMO	50
4.5 Transplante seriado de CMO não transduzida	52
4.6.a Transplante seriado de CMO transduzidas revelaram marcação do vírus, mas não foi detectada sua expressão em ensaio preliminar.....	56
4.6.b Análise de DNA genômico de CMO transduzidas	61
4.7 Experimento principal: Avaliação de expressão retroviral em animais transplantados com CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP....	62
4.7.a Transplante seriado de CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP	64
4.7.b Avaliação da expressão viral nos animais recipientes.....	66
4.7.c Ensaios com CMO, sangue periférico, baço e timo recuperados de animais recipientes terciários tratados com 5-asacitidina	74
4.7.d Análises hematológicas dos grupos estudados	76
4.7.e Análise de DNA genômico dos recipientes de transplante para quantificar quimerismo e o número de provírus presente	81
5.Discussão	88
6.Referências bibliográficas.....	96
Anexos.....	100

1 Introdução

1.1 Considerações sobre terapia gênica

A terapia gênica é idealizada como alternativa para o tratamento de doenças em que protocolos convencionais não apresentam resultados satisfatórios. As expectativas atuais indicam que a terapia gênica não se limitará somente a substituir ou corrigir genes defeituosos. Novas possibilidades terapêuticas dessa recente tecnologia estão sendo desenvolvidas, para permitir a liberação de proteínas que também controlem os níveis hormonais ou estimulem o sistema imunológico. A terapia gênica é a esperança de tratamento para um grande número de doenças até hoje consideradas incuráveis por métodos convencionais, que vão das hereditárias e degenerativas às diversas formas de câncer e doenças infecciosas. Neste contexto, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas e testadas em ensaios clínicos, para o tratamento de doenças monogênicas, vasculares e câncer (Figura 1). A terapia gênica vem como uma terapia em ascensão da medicina molecular baseada na adição da cópia correta de um gene às células somáticas de um indivíduo visando curar ou remediar sua doença. Este tipo de estratégia promete promover novos tratamentos para um grande número de doenças no futuro. A transferência de genes ausentes e/ou defeituosos em células alvo, com o objetivo de curar ou amenizar o progresso de uma doença é o conceito definido para terapia gênica (Verma e Weitzman, 2005). É uma estratégia de inovação biomédica e biotecnológica, que data de 1990 com a utilização do retrovírus carregando uma cópia normal do gene ADA (adenosina deaminase), perdido na doença da imunodeficiência combinada severa (ADA-SCID). Nesse tratamento, foi possível atingir um benefício clínico, sem efeitos colaterais associados ao vetor retroviral (Muul et al., 2003).

O uso prático da terapia gênica é geralmente limitado a dois tipos celulares somáticas: células-tronco acessíveis pós-mitóticas e células de longa duração. As características das células-alvo influenciam na escolha do vetor viral para entrega do gene. Vetores capazes de integrar no genoma da célula hospedeira se fazem necessários quando células em divisão são alvo

quando a expressão do transgene deve ser duradora, como no caso na terapia gênica de várias doenças hematológicas.

Figura 1: Distribuição dos protocolos clínicos de terapia gênica desenvolvidos de acordo com as doenças descritas.

As técnicas e vetores de transferência gênica estão em constante aperfeiçoamento e desenvolvimento, visando desta forma melhorar a eficiência de transfecção, aumentar a especificidade por uma determinada célula alvo, diminuir problemas relacionados à resposta imune do organismo (no caso de um sistema *in vivo*), bem como aprimorar o controle da expressão do transgene na célula alvo (Su et al., 1999; Robbins et al., 1998, Strauss et al., 2005).

Dentre os protocolos clínicos de terapia gênica em execução, aproximadamente 22% utilizam vetores retrovirais (Figura 2). A escolha do retrovírus (Rv) como vetor de transferência gênica têm suas vantagens, entre elas destacam-se: (1) O genoma viral integra de forma estável no cromossomo da célula hospedeira e é transmitido às células filhas; (2) O Rv pode infectar vários tipos celulares; (3) O genoma retroviral é bem manipulável; (4) A produção do Rv é mais rápida quando comparada a outros sistemas virais. (5) Considerando-se os aspectos de segurança para

a produção e manipulação, os Rv são facilmente destruídos com detergentes e etanol (Kriegler, 1990; David, 1994; Coffin et al., 1997).

Figura 2: Vetores utilizados em terapia gênica. Distribuição dos protocolos clínicos em execução com diferentes vetores de transferência gênica.

1.2 Uso do retrovírus em terapia gênica

Nas doenças hematopoiéticas humanas, as mutações genéticas de p53 são menos freqüentes quando comparadas com tumores malignos (cerca de 60% dos casos de neoplasias), mas estão relacionadas geralmente com casos de evolução prognóstica ruim. Um vetor viral dito “ideal” precisa teoricamente ter baixa imunogenecidade e citotoxicidade, possibilitando também a regulação do gene exógeno quando necessário. Pra uso em terapia gênica, ele precisa acomodar uma molécula de DNA de tamanho adequado para permitir o funcionamento do transgene, ser facilmente produzido e direcionado para tipos específicos de células e não permitir replicação autônoma do DNA, além de garantir uma expressão gênica a longo prazo. As seqüências virais, e até o próprio transgene, podem ativar o sistema imunológico do hospedeiro causando respostas não desejáveis, por isso existe a necessidade de utilizar vetores e transgenes que minimizem a resposta imunológica.

Atualmente, a transferência de material genético utiliza também vetores não virais, como DNA plasmidial ou DNA plasmidial complexado a outros carreadores, ou vetores virais, como vetores retrovirais, adenovirais e vetores baseados no vírus adeno-associado.

O retrovírus é utilizado como uma importante ferramenta de transferência gênica em ensaios de laboratório e em protocolos clínicos de terapia gênica. Existem muitas características nos retrovírus que fazem deles instrumentos interessantes para ensaios em terapia gênica. O Rv é maleável e de fácil manipulação em laboratório, podendo-se alterar os genes carregados, a regulação de expressão destes e o tropismo do vírus para a célula alvo (Coffin et al., 1997). A produção de Rv também é fácil e rápida, como descrito em detalhe abaixo, podendo-se obter a produção de vírus em 24 horas (Naviaux et al., 1996). A propriedade que o retrovírus tem de se integrar no DNA genômico de células animais e ser estável para ser transmitido para todas as gerações de células-filhas e faz com que ele seja um dos vetores mais adequados para transferência gênica em doenças que requerem expressão sustentada do transgene (Baum et al., 2003). São ferramentas bastante interessantes para tratamentos que requeiram a expressão sustentada do transgene, mas é preciso ter um cuidado especial no monitoramento deste processo, observando possíveis problemas de mutagênese insercional, resultado da integração aleatória do retrovírus no genoma da célula hospedeira, podendo causar sérios problemas como integração próximas a oncogenes, além do silenciamento de genes essenciais.

Já os adenovírus são pouco patogênicos e tem um amplo tropismo por células humanas, mas com expressão transiente e alto potencial imunogênico. O vetor adenoviral é utilizado como veículo de entrega dos genes de interesse em muitos estudos para vários tipos de doenças, como o câncer e outras malignidades genéticas. Com vantagens importantes, como a habilidade de transduzir células mitóticas e pós-mitóticas em diferentes tipos celulares e produção com alto título os fazem participar de muitos protocolos clínicos. Além das vantagens citadas, os adenovírus recombinantes possuem desvantagens consideráveis, sendo a mais

preocupante o fato do vírus causar uma forte resposta imunológica contra antígenos virais.

Os vetores adeno associados (AAV) tem como vantagem ter seu tropismo ampliado, não ser patogênico e fornecer expressão duradora, mas tem limitações quanto ao tamanho do transgene a ser expresso. O perfil de integração de vetores recombinantes AAV é um assunto de estudos atuais, entretanto parece ser mais seguro (e pouco frequente) em comparação com vetores retrovirais (Miller et al., 2005). Alguns relatos indicam que AAV seria uma opção interessante para terapia gênica no sistema hematopoiético, porém este é um assunto pouco explorado na literatura (Zhong et al., 2006).

O primeiro protocolo clínico de terapia gênica foi o tratamento do *severe combined immunodeficiency* (SCID) causado pela deficiência do gene adenosine deaminase um gene defeituoso em linfócitos T de crianças portadoras de imunodeficiência grave combinada. A doença ADA-SCID é caracterizada por uma mutação no gene adenosina desaminase (ADA), ocasionando perda de atividade funcional linfocitária. A primeira paciente foi tratada em setembro de 1990 e recebeu infusões de seus próprios linfócitos transduzidos *ex vivo* por um retrovírus carregando o cDNA do ADA (Blaese et al., 1993; Blaese et al., 1995). Após 12 anos, uma população representando 20% de seus linfócitos apresentaram-se portadores do vírus e do transgene e esta paciente não sofreu nenhum problema adverso relacionado à terapia gênica (Muul et al., 2003). Atualmente, protocolos clínicos para tratamento de ADA-SCID envolvem a introdução de um retrovírus portador do cDNA de ADA diretamente em células tronco hematopoiéticas. Estes protocolos demonstraram uma excelente eficiência em tratar os pacientes, sendo que 20 de 22 pacientes reestabeleceram a função normal do sistema imune após tratamento sem nenhum efeito adverso grave (Aiuti et al., 2007; Gaspar et al., 2006; Kohn, 2008).

A imunodeficiência severa combinada ligada ao X (*x-linked severe combined immunodeficiency*, X-SCID) é uma doença que resulta de uma mutação no gene IL2RG (ou γc), que codifica uma subunidade do receptor para IL-2 o qual tem um papel fundamental na diferenciação de progenitores linfóides. Para tratamento de X-SCID, células CD34(+) foram retiradas da medula óssea, transduzidas *ex vivo* com um vetor retroviral contendo o gene

IL2RG, e re-introduzidas nos pacientes. Neste protocolo, verificou-se a recuperação de função normal do sistema imunológico em 18 de 20 pacientes, (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Deichmann et al., 2007; Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Schwarzwaelder et al., 2007). Infelizmente, cinco destas crianças desenvolveram leucemia causada, em parte, pela integração do retrovírus próximo de um oncogene, LMO2, e um paciente morreu (Pike-Overzet et al., 2007).

Os protocolos do tratamento de X-SCID servem como exemplo do delicado equilíbrio entre o benefício e o risco de terapia gênica, mas continuam sendo um dos poucos exemplos de uma “cura” realizada com terapia gênica (Friedmann, 2003). Muitos destes veículos de transferência gênica ainda não estão suficientemente aperfeiçoados. Os protocolos de terapia gênica para tratamento de X-SCID e ADA-SCID foram realizados na França, Itália e Inglaterra obtendo-se sucesso e melhora significativa para os pacientes, bem como atestando a reprodutibilidade da terapia gênica *ex vivo* de células progenitoras da medula óssea para o tratamento de SCID (Aiuti et al., 2002, Gaspar et al., 2004, Cavazzana-Calvo et al., 2004).

As observações dos resultados clínicos e efeitos adversos relativos à terapia gênica de pacientes com SCID contribuíram para implementar quesitos no sentido de aprimorar e reforçar os aspectos de segurança do tratamento (Cavazzana-Calvo et al., 2004). Tanto as técnicas utilizadas para seu estudo quanto a segurança e eficácia dos vetores, precisam ser melhorados para evitar a duplicação dos problemas aqui descritos.

1.3 Características dos retrovírus e seus vetores recombinantes

A família *Retroviridae* é constituída por vírus de RNA envelopados, classificados taxonomicamente de acordo com parâmetros estruturais, composição e forma de replicação. O envelope apresenta glicoproteínas que caracterizam o tropismo viral. O formato e a localização da estrutura protéica interna determina o gênero do retrovírus. Morfologicamente, as partículas virais apresentam cerca de 80 nm de diâmetro (Coffin et al., 1997).

O MoMuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) é um típico retrovírus e apresenta, basicamente, os genes *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* (*Group-*

specific antigen) codifica as proteínas internas estruturais, o gene *pol* (*RNA-dependent DNA polymerase-reverse transcriptase*) codifica a transcriptase reversa e a integrase, e o gene *env* (*envelope glycoprotein*) codifica as glicoproteínas do envelope viral. O genoma retroviral apresenta-se como RNA (+) fita simples, quando empacotado no vírus, e como DNA dupla-fita, quando integrado no cromossomo de uma célula hospedeira sob a forma de provírus. O provírus é flanqueado por seqüências regulatórias denominadas LTR (*long terminal repeats*) necessárias tanto para a integração na célula hospedeira quanto para a definição do início e fim da transcrição.

Durante o processo de infecção, o Rv liga-se a receptores da célula alvo, mediado pelas glicoproteínas do envelope viral. A seguir, ocorre a fusão do envelope e membrana da célula alvo, e o RNA do genoma viral é internalizado no citoplasma celular. A transcriptase reversa, trazida pelo retrovírus, sintetiza o DNA dupla-fita, regenerando os LTRs nas extremidades 5' e 3' do DNA nascente. Após a transcrição reversa, a enzima integrase forma um complexo DNA-integrase, catalisando a integração do DNA dupla-fita retroviral ao cromossomo da célula hospedeira, estabelecendo-se o provírus.

O DNA proviral integrado poderá ser transcrito pela maquinaria da célula hospedeira para produzir o RNA viral, o qual servirá tanto como genoma viral a ser empacotado, como mRNA para a expressão de proteínas virais. Cada partícula viral apresentará duas cópias de RNA (+). O vírus infecta somente células em divisão, desde que o genoma viral entre no núcleo somente após a membrana nuclear ter se preparado para o processo de mitose. A expressão do genoma viral providencia o mRNA para a síntese de proteínas virais e este também serve para que o genoma viral seja encapsulado na progênese (Coffin et al., 1997). Os efeitos naturais do ciclo de vida do retrovírus oferece vantagens para os vetores de transferência gênica, mas também há o risco de efeitos adversos.

1.3.1 Transcriptase reversa

A transcriptase reversa (TR) retroviral inicia-se com a síntese do filamento de DNA (-) a partir de um iniciador (*primer*) de tRNA, trazido no vírus, com o sítio de ligação do iniciador PBS (*primer binding site*), próximo da região U5 na extremidade 5' do RNA(+) (Figura 3). A fita de DNA(-) nascente conterà as subunidades R e U5 do LTR 5', sendo que a região já utilizada como molde, na fita de RNA(+) é hidrolisada pela atividade RNase H da TR. A seguir, a fita de DNA(+) hibrida com a subunidade R 3' da fita molde de RNA(+), reiniciando a transcrição da fita de DNA(-) até a região do PBS, quando a fita molde de RNA(+) é degradada, restando-se apenas algumas regiões, que atuarão como iniciadores para a síntese de uma fita de DNA(+). A extremidade 3' da fita de DNA(+) é sintetizada, e o RNA(+) restante e o tRNA são removidos. A fita de DNA(+) híbrida com a extremidade 3' do DNA(-), sendo ambos filamentos completados (**Figura 3**).

A dupla-fita de DNA resultante apresentará duas extremidades idênticas: os LTRs, que contém elementos necessários para a integração e regulação transcricional do retrovírus. A transcrição do vírus poderá ocorrer após a integração proviral no núcleo da célula hospedeira (Coffin et al., 1997; Lewin, 2000; Stryer, 1994).

1.3.2 pCL: Um vetor retroviral recombinante

Em laboratório, os vetores retrovirais são manipulados com dois ou mais plasmídeos distintos. Um plasmídeo irá codificar o gene terapêutico mais os elementos regulatórios necessários e o sinal de empacotamento (ψ) que dirige o encapsulamento do genoma viral, mas não codifica nenhuma proteína viral. Os cDNA's para proteínas virais são colocados em plasmídeos separados, assegurando que os genes transcritos não serão empacotados na progênese viral. Quando todos os plasmídeos estão presentes na linhagem celular apropriada, como no caso da 293T, a célula está apta para expressar o genoma viral mais suas proteínas, permitindo a formação da progênie viral. Esta progênie não é apta para replicar, uma vez que ela não carrega genes para proteínas virais, assim os vetores retrovirais são defectivos para replicação. A estratégia de dividir o genoma viral entre vários plasmídeos limita a possibilidade de recombinação que poderia produzir um retrovírus replicante competente. Deste modo, o vírus é limitado à transdução celular e a infecção generalizada pode ser prevenida (Coffin et al., 1997).

O sistema pCL de retrovírus foi construído especificamente para a produção de vírus codificando genes citotóxicos (Naviaux et al., 1996). A produção de pCL é transiente e requer transfecção de plasmídeos codificando o vírus em células para iniciar a produção e estas são descartadas depois da coleta de vírus.

A vantagem desta estratégia é que a célula produtora não sofre seleção na presença do transgene e uma das desvantagens é a utilização de transfecção transiente, um protocolo pouco reprodutível, de difícil reprodução em larga escala, que requer otimização em todas as suas etapas (Bajgelman et al., 2003).

Podemos subdividir os vetores plasmídias componentes de um sistema de produção retroviral em (1) plasmídio viral: contém o sinal de empacotamento (ψ) e o gene de interesse e fornece para a célula produtora o RNA que será empacotado na partícula viral, e (2) plasmídios de empacotamento: permitem que a célula produtora sintetize as proteínas necessárias à produção da partícula viral. O plasmídio de empacotamento é

desprovido do sinal de empacotamento ($\Delta\psi$), e portanto o RNA gerado não fará parte do genoma empacotado na partícula viral. O genoma de empacotamento pode ser subdividido em vários vetores plasmídias permitindo-se por exemplo, aumentar a flexibilidade do sistema (podem-se construir vetores com diferentes tipos de envelope).

A produção do vetor retroviral pCL segue protocolo transitório, evitando a seleção de clones, e permitindo a rápida produção de vírus contendo genes citotóxicos e citostáticos. O sistema pCL possibilita obter a preparação viral em 24 horas (Naviaux et al., 1996, Bajgelman et al., 2003). O título viral do sistema pCL atinge valores 100 vezes superiores aos obtidos nos sistemas convencionais para vírus portadores de seqüências citotóxicas, incluindo o gene supressor de tumor p53. (Naviaux et al., 1996; Costanzi-Strauss et al., 1998, Strauss e Costanzi-Strauss, 1999).

Os vetores plasmidiais pCL são caracterizados pela presença do promotor químera CMV-LTR, produto da fusão do *enhancer* do citomegalovírus humano (CMV) com a região TATA box da subunidade U3 do LTR 5' derivado do vírus MoMuLV. O promotor quimérico pCL aumenta cerca de 20 vezes a quantidade de mRNA que pode ser empacotado (Naviaux et al., 1996). A produção dos vetores retrovirais pCL é feita utilizando-se a co-transfecção da linhagem 293 (derivada de células de rim embrionário humano imortalizada com adenovírus – Graham et al., 1977) com um vetor pCL portador do gene de interesse, pCLXSN, e com o vetor pCL de empacotamento (Anfotrópico ou Ecotrópico) portador das seqüências *gag*, *pol* e *env*. A eficiência de transfecção da linhagem 293T em protocolos otimizados pode atingir valores superiores a 60% (Naviaux et al., 1996). É interessante observar que o *enhancer* CMV está presente apenas na célula produtora, pois a transcrição viral começa na subunidade R do LTR, sendo que o genoma viral resultante é de um típico retrovírus de Moloney.

Os vetores de empacotamento do sistema pCL são SIN (*self-inactivating*), apresentando uma deleção do *enhancer* e TATA box da região U3 do LTR 3'. Esta modificação impede a produção de um vírus competente, constituindo-se num importante fator de segurança. No caso de um Rv competente, a porção U3 do LTR 3' é utilizada como molde durante a

transcrição reversa, para reconstituir o LTR 5' (Figura 3), permitindo a integração e expressão do provírus no genoma da célula hospedeira.

A deleção do elemento U3 no LTR 3' resulta na síntese de um LTR defectivo inviabilizando a transcrição do provírus na célula hospedeira (Yu et al., 1986; Naviaux et al., 1996; Diaz et al., 1998). Além disso, os vetores de empacotamento não possuem a sequência ψ , responsável pelo sinal de empacotamento. Dessa forma, o vírus produzido não contém informação de empacotamento, sendo que a transdução é restrita à célula alvo, não podendo disseminar-se para células vizinhas, ou pelo organismo, considerando-se uma aplicação *in vivo*.

Figura 4: Esquema de produção e uso do retrovírus

1.4 p53: o supressor de tumor e fator de transcrição

A proteína p53 é constituída por 393 aminoácidos, e pode ser dividida em três partes, incluindo um domínio de ativação amino-terminal, uma parte central de seqüências específicas para ligação ao DNA, e um domínio carboxi-terminal multifuncional (Ko e Prives, 1996; www.iarc.fr/p53).

A região amino terminal de p53 interage com vários fatores de transcrição (Vogelstein et al., 1992), como o TBP (TATA Binding Protein) ou o TFIID, proteínas virais como E1B de adenovírus, e o produto do gene mdm-2. Essas interações são muito importantes para a regulação

transcricional de p53. Mutações nos resíduos 22 e 23 amino-terminais ocasionam perda de atividade transcricional e ausência de interação com fatores ligados a TBPs e mdm-2 (Seto et al., 1992; Ko e Prives, 1996).

Na região central encontram-se seqüências de ligação ao DNA. Grande parte das mutações em p53 estão localizadas nessa região. A proteína p53 selvagem pode regular a transcrição ligando-se diretamente a elementos *enhancer-like* no DNA (Kern et al., 1991, 1992) ou interagindo com outros reguladores transcricionais como TATA e CAAT (Seto et al., 1992; Mack et al., 1993). A proteína p53 atua primariamente como um fator de transcrição que ativa a expressão de uma variedade de genes, os quais apresentam o elemento responsivo PuPuPuC(A/T)(A/T)GPiPiPi (Pu = purina, Pi= pirimidina) (Funk et al., 1992; Ko e Prives, 1996; Vogelstein, 1992).

Na ausência de condições tóxicas, o gene p53 está presente em níveis baixos. Na presença de danos no DNA, p53 é ativado e age como fator de transcrição promovendo parada do ciclo mitótico, senescência, apoptose, inibição da angiogênese e metástase. Esses efeitos dependem do tipo celular e são conseqüências de numerosas interações das diversas cascatas transducionais responsivas a p53 (Harris e Levine, 2005).

A extremidade carboxi-terminal pode atuar como um domínio inespecífico de ligação ao DNA, incluindo DNA danificado, atuando no reparo. Esta região carboxi-terminal também contém os sinais de localização nuclear e seqüências de interação proteína-proteína, proteína-DNA e tetramerização. A formação de complexos tetrâmeros entre moléculas de p53 selvagens e mutantes leva a uma perda de função da molécula de p53 selvagem (Milner e Medcalf, 1991; Friedman et al., 1993).

1.5 pCLPG: Um vetor retroviral com expressão controlada por p53

O vetor pCLPG foi construído com o objetivo de se criar um sistema retroviral com controle de transcrição que tem a propriedade de ser induzível e ter uma alta expressão viral sustentada *in vivo*, utilizando-se o supressor de tumor e fator de transcrição p53 para dirigir a expressão do transgene.

A inovação do vetor pCLPG envolveu a substituição do *enhancer* por um elemento responsivo ao p53. O LTR (o promotor viral) do sistema

retroviral pCL foi modificado pela adição de uma seqüência responsiva a p53 (o elemento PG). O LTR foi então convertido a um promotor p53 dependente para a obtenção de um alto nível de expressão dirigido por p53 em células transduzidas (Figura 5).

O controle de transcrição do vetor pCLPG é controlado por p53 e a expressão alcançada é até sete vezes maior que o sistema pCL parental (Strauss et al., 2005; Strauss e Costanzi-Strauss, 2004). Demonstramos que o vetor pCLPG portador do cDNA de p53 estabelece um sistema de *feedback* positivo, permitindo altos níveis de expressão de p53. Quando aplicado em células tumorais, o vetor pCLPG portador de p53 ofereceu uma inibição de proliferação celular mais eficaz do que visto com o vetor parental, pCLp53. Acreditamos que a super-expressão de p53 quando, fornecido pelo vetor pCLPGp53, permitiu esta melhora em seu desempenho (Strauss et al., 2005).

Este vetor foi desenvolvido com o intuito de melhorar a expressão do transgene. Como descrito, este princípio foi comprovado em cultura de células e em modelos de proliferação de células cancerosas. Porém, o vetor retroviral realmente não é eficiente para transferência gênica *in situ*, como seria o caso de tratamento de tumores sólidos, e sim, mais apropriado e mais amplamente aplicado em transferência gênica no sistema hematopoiético, onde a transferência gênica é realizada *ex vivo* e expressão do transgene deve ser duradoura. Como descrito, o aperfeiçoamento do vetor retroviral poderia proporcionar uma melhora em expressão *in vivo*. Vários alvos de metilação no LTR do vetor parental foram removidos na criação do vetor pCLPG, existindo assim, a possibilidade de que o vetor pCLPG poderá oferecer expressão sustentada *in vivo*.

O emprego de p53 como fator de transcrição para controlar a expressão do vetor pCLPG pode oferecer vantagens quando utilizado em terapia gênica no sistema hematopoiético. Neste cenário, o p53 endógeno seria utilizado para regular a expressão do transgene. Como p53 é um fator induzível e dinâmico, este pode criar a possibilidade de aumentar a expressão viral quando p53 for ativado com drogas ou em resposta ao stress ou proliferação celular.

Este trabalho foi iniciado antes do surgimento dos casos de leucemia nos protocolos clínicos de X-SCID, mas o estudo de vetores retrovirais no sistema hematopoiético continuam. Neste trabalho, temos a oportunidade de avaliar não só a expressão *in vivo* do vetor pCLPG, mas também estabelecer um modelo que poderá servir para outras utilidades, como revelar o perfil de segurança deste vetor.

Figura 5: Representação esquemática do vetor pCLPG e seu funcionamento. O vetor pCLPG possui uma alteração no LTR que torna-o responsivo a p53. O LTR foi modificado com a reposição da região controladora e do “*enhancer*” com um elemento, chamado PG, responsivo a p53. A. transcrição do vetor pCLPG pode ser dirigido pelo p53 endógeno, permitindo expressão do transgene de maneira p53-dependente. Este é o cenário que está sendo avaliado neste projeto. B. O vetor pCLPGp53 codifica o cDNA de p53 sob comando do promotor p53-responsivo, estabelecendo uma situação de feedback positivo. Este arranjo já foi comprovado em cultura de células cancerosas (Strauss, 2007).

1.6 Avaliação da expressão de vetores retrovirais aplicados no sistema hematopoiético

Apesar da popularidade da aplicação de retrovírus para ensaios de terapia gênica, existem ainda certos aspectos indesejáveis nestes vetores, estando entre um dos principais obstáculos encontrados, o variável perfil da expressão do retrovírus *in vivo*. Sabe-se, por exemplo, que a transdução *ex vivo* de células de medula óssea (CMO) é facilmente realizada com a utilização de retrovírus, mantendo um nível de expressão constante em cultura.

Entretanto, a expressão viral é reduzida após a implantação destas células em recipientes (Challita e Kohn, 1994). Doenças como X-SCID, hemofilia, câncer, entre outros, poderiam se beneficiar de um tratamento gênico baseado na transdução *ex vivo* de células tronco com um vírus portador de um gene terapêutico, seguido por transplante autólogo. Na clínica, estas estratégias geralmente não são satisfatórias por motivo da falta de expressão viral.

No laboratório, ensaios de transplante seqüenciais de medula óssea previamente transduzida por retrovírus vêm sendo amplamente utilizados. Estes ensaios de transplante de medula óssea que tem como objetivo medir a expressão viral e são descritos na literatura. Por exemplo, a expressão do RV foi silenciada *in vivo* quando CMO transduzidas foram transplantadas seqüencialmente (Robbins et al.,1998). No caso do recipiente primário, a expressão do vetor viral foi detectada. Em seguida, CMO foi recolhida do primeiro recipiente e implantada em um recipiente secundário, mas a expressão viral foi silenciada, geralmente devido à metilação do promotor viral durante o processo de diferenciação celular (Challita e Kohn, 1994). O ensaio envolvendo transplante seqüencial cria uma demanda para a célula tronco se dividir e diferenciar para reconstituir o sistema hematopoiético. No entanto, a diferenciação das células tronco envolve mudanças no perfil de expressão gênica e metilação, um dos mecanismos responsáveis pelo silenciamento de genes celulares e o LTR. Com a modificação do LTR, a

expressão do retrovírus pode ser resgatada no recipiente secundário (Challita et al., 1995).

Este fato indica que o problema da perda da expressão viral está realmente associado com o promotor do RV e não com o tipo de célula transduzida pois, com o aperfeiçoamento do promotor, a expressão do RV é sustentada.

Vale ressaltar que os ensaios descritos acima utilizaram genes marcadores que são inócuos para a célula, como o eGFP (*enhanced green fluorescent protein*). A expressão deste cDNA não oferece nenhuma vantagem ou desvantagem para a célula, não existe uma pressão seletiva a favor ou contra células apresentando expressão viral. Em comparação, os ensaios clínicos para tratamento de X-SCID, por exemplo, representam um caso de seleção positiva. A função do gene IL2RG transmite o sinal proliferativo iniciado pelas interleucinas e, desta maneira, estimulam a divisão celular. Neste exemplo, o silenciamento do vetor não foi observado devido a seleção para células onde a expressão foi sustentada.

O ensaio de transplante seqüencial de CMO transduzida também foi utilizado para revelar efeitos adversos devido a inserção do vetor retroviral (Li et al., 2002). Neste exemplo, recipientes primários de CMO tratados com retrovirus portadores de gene marcador dLNGFR não demonstraram nenhum efeito adverso e a expressão do transgene foi sustentada. Porém, surgiram casos de leucemia nos recipientes secundários. Talvez, a atividade anti-apoptótica do gene deva ter contribuído para a seleção positiva.

Também há o fato de que a inserção do vírus ocorreu perto de um oncogene (Evi1) (Li et al., 2002). Neste caso, o modelo recapitulou a situação observada clinicamente: um vetor retroviral portador de um cDNA que favoreceu a proliferação celular induziu leucemia quando inserido perto de um oncogene (Strauss e Costanzi-Strauss, 2007).

Seguimos orientações do artigo de Andersson et al., (Andersson et al., 2003), descrevendo uma metodologia para a transdução de CMO de camundongo a partir de sobrenadante viral sem a necessidade de criar uma linhagem produtora estável e sem utilizar o sistema de co-cultivação. Este protocolo utiliza vírus pseudotipado com VSVg que oferece um tropismo

mais abrangente e permite a ultracentrifugação do vírus (Burns et al., 1993; Ory et al., 1996). A progênie viral pseudotipada com VSVg permite a concentração de preparações por meio de ultracentrifugação vindo a conferir um aumento em sua estabilidade.

Para este trabalho, o modelo de transplante seqüencial de CMO transduzida nos foi útil para medir a expressão *in vivo* do vetor pCLPG. O estabelecimento deste modelo pode criar a perspectiva de monitorar a ocorrência ou não de efeitos adversos relacionados com as conseqüências de inserção do provírus.

2 Objetivos do Projeto

O trabalho apresentado teve duas metas principais: 1) implementar um modelo de transplante seriado de medula óssea; 2) utilizar este modelo para medir a expressão *in vivo* do vetor retroviral pCLPG desenvolvido em nosso laboratório. Este trabalho representa o estabelecimento de um modelo para avaliação do desempenho e segurança de novos vetores de transferência gênica e abre o caminho para futuros estudos de terapia gênica no sistema hematopoiético.

2.1 Implementar um modelo de transplante seriado de medula óssea

- 2.1.a Produção de estoques de vírus pCLeGFP e pCLPGeGFP
- 2.1.b Teste do vetor pCLPG em célula hematopoiética
- 2.1.c Padronização dos protocolos de coleta e transdução de CMO
- 2.1.d Piloto para o transplante de CMO (sem transdução)
- 2.1.e Piloto para o transplante de CMO (com transdução)

2.2 Avaliação de expressão retroviral em animais transplantados com CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP

- 2.2a Realizar transplante seriado de CMO transduzida
- 2.2b Avaliar expressão viral no CMO, sangue periférico, timo e baço recuperado dos animais recipientes
- 2.2c Realizar análise hematológica nos animais recipientes
- 2.2d Análise de DNA genômico dos recipientes de transplante para quantificar quimerismo e o número de provírus presente.

3 Materiais e Métodos

3.1 Preparação de plasmídeos

Os vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP foram construídos previamente em nosso laboratório (Strauss et al., 2005; Strauss e Costanzi-Strauss, 2004). Nestes trabalhos, o vetor denominado pCLPG- Δ U3 ofereceu o maior nível de indução na presença de p53 e por este motivo, foi escolhido para o projeto atual. Para simplificar, utilizamos o nome pCLPG para este vetor.

O vetor pLPCp53(223) foi gentilmente cedido pelo Dr. Andrei Gudkov (Lerner Research Institute, Cleveland, OH, EUA).

O vetor pCMV-gag-pol (gentilmente cedido pelo Dr. Richard Mulligan, Harvard University, EUA) e o vetor pCMV-VSVg (gentilmente cedido pela Dra. Jane Burns, University of California, San Diego, EUA) são utilizados durante a produção de estoques retrovirais. Alternativamente, utilizamos o vetor pCL-anfo durante a produção viral (Naviaux et al., 1996).

Preparações de plasmídeos foram realizadas com o kit comercial Quiagen EndoFree, Maxi ou Mega, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

3.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens 293T derivada de células de rim embrionário humano imortalizada com adenovírus e NIH-3T3 derivada de fibroblasto de camundongo foram mantidas no meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro de bezerro suplementado com ferro (BCS, bovine calf serum, Hyclone, Logan Utah, USA), 100 μ g/mL de gentamicina, 50 μ g/mL de ampicilina e 2,5 μ g/mL de Fungizona (anfotericina B). Células K562 (leucemia crônica mielóide humana, p53-nulo) (Johnson et al., 1991) foram mantidas em meio IMDM (Iscove's Modified Dulbeccos's Medium) com os suplementos citados acima. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

3.3 Produção de vírus

Foram semeadas, com 24h de antecedência, 1.0×10^6 células da linhagem 293T para transfecção em placa 6 cm. O DNA (10 µg de vetor viral, 7.5 µg pCMV-gag-pol, 4 µg pCMV-VSVg) foi misturado em 250µL de cloreto de cálcio 0,25M, e precipitado com a adição de 250µL do tampão fosfato de sódio/HEPES HBS-2x pH 7,05 (cloreto de sódio 274mM, HEPES 40mM, fosfato monoácido de sódio 2,8mM), sob agitação. A suspensão contendo o precipitado de DNA foi gotejada no meio de cultura das células plaqueadas, seguindo-se incubação por 4h. As células foram submetidas a um tratamento com PBS-1x contendo 15% de glicerol (choque de glicerol) durante 3 minutos, lavadas com PBS-1x e, a seguir, adicionou-se meio DMEM com 10% de soro fetal bovino. Vinte e quatro a quarenta e oito horas após o início da transfecção o sobrenadante viral foi coletado, centrifugado 5 min, 1000 rpm e estocado a -80°C . Alternativamente, 35 ml de sobrenadante foi concentrado utilizando o método de ultracentrifugação que consiste em centrifugar o sobrenadante a 25.000 rpm em rotor SW 28 por 90 min, seguido por descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet viral em 200 µl de Hank's Balanced Salt Solution e estocagem de alíquotas a -80°C .

3.4 Titulação por citometria de fluxo (FACS)

Células NIH3T3 foram plaqueadas ($1,5 \times 10^5$ cels. em placa 35mm). No dia seguinte, estas foram transduzidas com o sobrenadante viral recolhido anteriormente em meio DMEM e adicionado polibreno (concentração final $8 \mu\text{g ml}^{-1}$). As células foram então incubadas por 48h. Posteriormente, estas foram tripsinizadas, lavadas em PBS 1X e ressuspensas na concentração de 1.10^6 cel/ml em meio DMEM. A suspensão de células foi analisada utilizando-se o equipamento para citometria de fluxo FACScalibur (Becton-Dickenson, CA, USA) avaliando-se a porcentagem de células transduzidas, e o nível de expressão, calculado utilizando-se o *software* Cell Quest (Becton Dickinson, EUA), considerando-

se a intensidade média das células transduzidas. A intensidade é medida em comparação a um controle negativo não transfectado, ou transfectado com um vetor sem o marcador fluorescente. O fator de diluição aplicado para o cálculo da titulação é o número de *green fluorescent units* por milímetro (gfu ml^{-1}) do sobrenadante viral.

3.5 Análise por citometria de fluxo da expressão de EGFP em células transduzidas

Células foram coletadas (após trisinização de células aderidas ou via coleta de células em suspensão), sujeitas a centrifugação a 1500 g por 5 minutos e ressuspensas em 1 ml de PBS-1x. A aquisição da amostra no citômetro (FACS-CALIBUR, Becton Dickinson-EUA) foi realizada e, posteriormente, os dados foram analisados. A porcentagem de células transduzidas e o nível de expressão foram revelados utilizando-se o *software* Cell Quest (Becton Dickinson, EUA). Em nossos resultados e gráficos, indicamos a intensidade média de EGFP em unidades arbitrárias (ua).

3.6 Atividade dos vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP medida em células K562

Células K562, 5×10^5 células/poço em placa 24 poços, foram transduzidas em 0,5 ml de meio contendo 5×10^5 partículas do vírus pCLeGFP ou pCLPGeGFP na presença de polibreno, 8 $\mu\text{g/ml}$. Em seguida, as células foram sujeitas a tratamento com G418, 1000 $\mu\text{g/ml}$, durante três semanas para selecionar células contendo provírus. Assim que as novas linhagens (K562-pCLeGFP ou K562-pCLPGeGFP) foram estabelecidas, estas e células K562 parentais foram transduzidas com vírus pCLp53(223) na presença de polibreno, 8 $\mu\text{g/ml}$, conforme descrito acima. Em seguida, as células foram sujeitas a tratamento com puromicina, 1 $\mu\text{g/ml}$, durante três semanas para selecionar células contendo o provírus pLPCp53(223), assim

estabelecendo as linhagens K562-223, K562-pCLeGFP-223 e K562-pCLPGeGFP-223.

Para os ensaios, células K562, K562-pCLeGFP, K562-pCLPGeGFP, K562-223, K562-pCLeGFP-223, K562-pCLPGeGFP-223 foram semeadas em placas 6-poços e incubadas a 37 ou 32 °C durante 24h. As células foram sujeitas a análise para detecção de eGFP por citometria de fluxo, conforme descrito acima.

3.7 Coleta e cultura de CMO

Para os experimentos com animais, os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, ICB-USP (protocolo 097/04) e também pela Comissão Científica do Instituto do Coração, FM-USP (Protocolo de Pesquisa SDS 2832/06/077). Animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo, FM-USP e também mantidos no Centro de Bioterismo durante a experimentação.

Para doadores de CMO, utilizamos camundongos machos linhagem C57BL/6 com aproximadamente 3 meses de idade (jovens adultos). Após 7 dias da injeção com 5-florouracil (150 mg/kg, injetado i.p.) para enriquecer a população de células tronco, os animais foram sacrificados e foi feito o isolamento do fêmur e tíbia, seguido pela extração da medula óssea com meio Iscove's Modified Dulbecos Medium (IMDM) suplementado com soro fetal bovino 15%. As células da medula óssea (CMO) coletadas foram centrifugadas 1800 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em meio IMDM com soro fetal bovino 15% mais citocinas (IL-3 200 unidades/ml, IL-6 200 unidades/ml e stem cell factor 2.5 ng/ml) para estimular a proliferação celular. Estas condições foram padronizadas experimentalmente e atualmente são utilizadas rotineiramente. As CMO foram cultivadas na presença de citocinas por 72 horas antes de serem transduzidas com os vetores retrovirais.

3.8 Transdução de CMO

Após 72 h em cultura na presença de citocinas, as CMO coletadas foram transduzidas com os vírus ultracentrifugados pCLLeGFP e pCLPGeGFP seguindo o protocolo de Andersson et al., 2003.

Placas 35 mm estéreis foram tratadas com Retronectina* (TaKaRa Biotechnology) por 2 horas e posteriormente mantidas em PBS 1X e BSA 2% por 30 minutos. Em seguida as placas foram lavadas com HBSS (Hanks Balanced Salt Solution), estando assim, prontas par uso. Após este tratamento foi adicionado vírus ultracentrifugado (título: 1.2×10^8) na placa e esta foi incubada (37°C ; 5% CO_2) por 1h30 (processo que pré-carregada as placas com vírus, realizado duas vezes). Em uma etapa seguinte foram adicionadas $3-4 \times 10^6$ células por placa, adicionado mais 1.6×10^8 partículas virais e incubadas por 48 horas na presença de citocinas.

3.9 Transplante de CMO

O protocolo de transplante foi padronizado empiricamente e consiste no pré-condicionamento dos animais recipientes com irradiação, 8.5 Gy, administrado em dose única e com atenuação de 70% (contamos com apoio técnico do IPEN-CTR, São Paulo, para realização deste procedimento) com o objetivo de abolir o sistema hematopoiético do animal receptor. Imediatamente após irradiação, os animais foram injetados via veia caudal com $4-5 \times 10^6$ CMO (com ou sem transdução, dependendo no alvo do experimento). Em paralelo, animais irradiados foram mantidos nas mesmas condições, mas sem ter recebido transplante de CMO, assim servindo como controle funcional do procedimento. Em geral, animais controles morrem dentro de 18-21 dias após irradiação, enquanto animais transplantados sobrevivem. Após o transplante estes animais foram mantidos em gaiolas micro-isoladoras, com água, ração e maravalha autoclavadas e posterior adição de Tetraciclina (100 mg/ml) na água do bebedouro.

3.10 Análise hematológica de sangue periférico

Amostras de sangue periférico coletadas via retro-orbital em tubo com EDTA foram submetidas a contagem diferencial das células, realizada por esfregaço corado pelo método de Panótico seguido por contagem manual. Para este procedimento, contamos com o apoio técnico do Centro de Bioterismo, FM-USP. Com estes dados, média e desvio padrão foram determinados e apresentados nos resultados. Dados completos foram incluídos nos Anexos.

3.11 Extração de DNA genômico e PCR comum– ensaio preliminar

Para a extração de DNA genômico das CMO, utilizamos o kit comercial *Kit Perfect gDNA blood mini* Eppendorf, segundo as recomendações do fabricante. Obtivemos uma concentração de 1,8 µg/µl de DNA genômico – 100 µl finais.

Com o DNA genômico obtido, realizamos a reação de PCR para detectar a presença de seqüências virais. Para cada reação, 100 ng de DNA genômico foi utilizado como template, adicionando 2.5 µl de tampão 10x, 1.5 µl de MgCl₂, 50 mM, 50 pmol de primer forward, 50 pmol de primer reverse, 1 µl de dNTP, 10 mM, 2.5 unidades de Platinum Taq (Invitrogen) e H₂O para completar o volume final de 25 µl. Para a amplificação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 95°C, 1min; 58°C, 1min, 72°C, 1 min e finalmente incubadas a 72°C por 5min. As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose, 1%, corado com brometo de etídio e visualizado por fotografia digital. Primers descritos na Tabela I e Figura 14.

Tabela 1: Primers utilizados nos ensaios preliminares de PCR

Alvo	Forward primer	Reverse primer	Banda esperada
eGFP	5' tgaagttcatctgcaccacc 3'	5' ttctgctgtcggccatgat 3'	350 pb
Neo	5' gaggtattcggctatgactg 3'	5' tgctcgctcgatgcgatgttt 3'	400 pb
eGFP/Neo	5' tgaagttcatctgcaccacc 3'	5' tgctcgctcgatgcgatgttt 3'	1400 pb

3.12 Extração de DNA genômico a ser utilizado em ensaio de PCR em tempo real

Para extração do DNA genômico das cmo seguimos o protocolo do kit para Trizol. As células foram coletadas, centrifugadas e o pellet resultante foi homogeneizando em solução de trizol e estocado a -80 °C. No momento da coleta, a mostra foi descongelada a temperatura ambiente e adicionado 100 µl de clorofórmio, esta foi homogeneizada e centrifugada 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Em seguida a fase aquoda da amostra foi retirada e adicionado 150 µl de etanol 100%, homogeneizou-se por inversão e esta ficou em temperatura ambiente por 3 minutos. Em uma próxima etapa, a amostra foi centrifugada 12000rpm por 5 minutos a 4°C e descartou-se todo o sobrenadante. O pellet resultante foi lavado 2 vezes (30 minutos cada a temperatura ambiente) em 400 µl da solução de citrato de sódio 0,1M em EtOH 10%.

As amostras foram então centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C e o pellet lavado 2 vezes com 800 µl de etanol 75% e novamente centrifugado 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. O pellet foi deixado para secar de 5 a 15 minutos e à ele foi adicionado 300 µl de NaOH 8 mM.

Em seguida realizou-se a extração fenol clorofórmio. Para 300 µl de DNA genômico em NaOH 8 mM, adicionou-se 150 µl de fenol mais 150 µl de clorofórmio e homogeneizou-se a amostra. Esta foi centrifugada 12000 rpm por 3 minutos e a camada superior foi transferida para um novo tubo.

Adicionou-se então 300µl de EtOH mais 30µl de NaOC 3 molar. Incubou-se por 15 minutos a -20°C e posteriormente foram centrifugadas 12000rpm por 15 minutos a 4°C, descartou-se o EtOH e adicionou-se 300 µl de EtOH 70% seguido por mais uma etapa de centrifugação 12000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartou-se o EtOH e ressuspendeu-se o pellet em 50 µl de água e medida sua concentração em Nanodrop.

3.13 Desenho de oligos iniciadores (primers) para PCR em tempo real e ensaio piloto

Para o desenho dos iniciadores descritos na Tabela II, utilizou-se o programa *Primer 3* (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Seguindo os parâmetros estipulados, os *primers* fornecidos pelo programa foram testados quanto à presença de estruturas secundárias (*hairpins* e formação de *self-dimers* e *primer-dimers*) no programa *Net Primer*: <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>

Os *primers* foram testados quanto suas especificidades no programa BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Os *primers sense* e *antisense* específicos para o gene de interesse e do controle foram desenhados com o auxílio do *Primer3*: http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi

De uma forma geral, os *primers* foram selecionados pelo seu tamanho (18-30 nucleotídeos), conteúdo de G/C (20-80%), proximidade da terminação 3', inexistência de mais de 2 Gs ou Cs na extremidade 3', temperatura de anelamento entre 58-60°C, tamanho do amplicon entre 50-150 nucleotídeos e especificidade utilizando-se a o programa BLAST. Sequências de *primers* já publicadas na literatura, para β-actina e cromossomo Y (Mortellaro et al., 2006), também foram submetidas à análise.

Tabela 2: Primers para PCR em Tempo Real

	foward	reverse	Banda esperada
pCLeGFP	CCCGACAACCACTACCTGA	TCCACACCCTAACTGACACA	191pb
Beta actina	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	137pb
Cromossomo Y	GCGCCCCATGAATGCAT	TCCACCTGCATCCCAGCT	112pb

3.14 PCR em tempo real (Real Time PCR)

A reação de PCR foi composta de 6,5 ng de DNAg, 200 nM de cada primer, 10 µl de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 7,36 µL de água. A Master Mix (Applied Biosystems) é composta de AmpliTaq DNA Polymerase, SYBR Green buffer, SYBR Green I e dNTP's. Cada amostra ou controle foi analisada em triplicata. Os controles incluem reação sem template, reação sem primers ou DNA genômico do alvo experimental. O aparelho 7500 Fast System PCR foi utilizado para estes ensaios.

As condições de pcr no real time foram:

Estágio 1: 95°C por 10 min

Estágio 2: 40 ciclos de 95° por 15 seg e 60° por 1 min

Estágio 3: 95°C por 15 seg ; 60° por 1 min; 95° por 15 seg

Terminação: 60°C por 60 seg

3.14.1 Determinação do número de provírus/célula

Para análise quantitativa de PCR em tempo real do número de provírus/célula, foi necessário a construção de uma curva padrão contendo um número conhecido de provírus/célula. Esta curva foi montada utilizando o vetor plasmidial pCLeGFP diluído em DNA genômico retirado de CMO não transduzida. Primeiramente, o número de cópias de plasmídeo por microlitro da preparação plasmidial foi determinado utilizando a equação abaixo:

$$\text{Cópias}/\mu\text{l} = \frac{[\text{plasmídeo}]\text{g}/\mu\text{l} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ cópias/mol}}{\text{tamanho do vetor(pb)} \times 649 \text{ g/mol/pb}}$$

Onde o tamanho do vetor pCL_eGFP foi 8300 pb e a concentração da preparação plasmidial foi $1,07 \times 10^{-6}$ g/ μ l. Foi calculado então, que cada μ l de preparação plasmidial continha $1,2 \times 10^{11}$ cópias do plasmídeo. Esta preparação foi diluída a $1,0 \times 10^8$ cópias por μ l, o que corresponde a 0.83 μ l em 999 μ l de H₂O. Realizamos uma diluição seriada, para obtenção de pontos que fossem importantes para avaliarmos nossas amostras de células transduzidas. Foi preparada uma solução de DNA_g a 6,5 ng/ μ l diluídas com plasmídeo, ou seja equivalente a 1000 células por microlitro, e utilizada para montagem da curva padrão da seguinte maneira:

Figura 6: Curva padrão para análise de amostras de cmo em PCR em tempo real. Tubo 1: 99 μ l de cmo + 1 μ l pCL : 1000 cópias por célula. Tubo 2: 99 μ l de cmo + 1 μ l do tubo 1 : 10 cópias por célula. Tubo 3: 95 μ l de cmo + 5 μ l do tubo 2 : 0,5 cópias por célula. Tubo 4: 99 μ l de cmo + 1 μ l do tubo 2: 0,1 cópia por célula. Tubo 5: 90 μ l de cmo + 10 μ l do tubo 3: 0,05 cópias por célula. Tubo 6: 80 μ l de cmo + 20 μ l do tubo 5: 0,025 cópias por célula. Tubo 7: 90 μ l de cmo + 10 μ l do tubo 4: 0,01 cópia por célula. Tubo 8: 20 μ l de cmo + 20 μ l do tubo 7: 0,005 cópia por célula. Tubo 9: 40 μ l de cmo + 10 μ l do tubo 8: 0,001 cópia por célula. Tubo 10: 100 μ l de cmo sem plasmídeo : 0 cópias por célula

3.14.2 Determinação do grau de quimerismo nos animais recipientes

Para esta análise, uma curva padrão de DNA genômico de machos diluída com DNAg de fêmeas foi estabelecido, obtendo-se uma curva, em porcentagens descrita a seguir: 100% Y (100% DNA do animal macho), 75% Y, 50% Y, 25% Y, 12,5% Y, 6% Y, 3%Y (100% DNA do animal fêmea). Adotamos esta curva como padrão para análise do cromossomo Y em animais fêmeas receptoras de transplante de cmo de animais machos.

Figura 7: Curva padrão para análise do quimerismo do cromossomo Y.

4. Resultados

4.1 Produção de vírus pseudotipado com envelope VSVg ou anfotrópico

Os vetores retrovirais pCLeGFP e pCLPGeGFP foram construídos em nosso laboratório (Bajgelman et al., 2003; Strauss e Costanzi-Strauss, 2004). Estes vetores recombinantes são derivados do MoMuLV e apresentam o cDNA para NeoR (*neomycin resistance gene*) com expressão regulada pelo promotor heterólogo viral SV40 e eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) com expressão dirigida pelo LTR 5' (Figura 8). No caso do vetor pCLeGFP, o LTR 5' não foi modificado e expressão do eGFP é constitutiva. Porém, o vetor pCLPGeGFP apresenta um elemento responsivo a p53 nos LTRs e apresenta expressão do eGFP dependente da atividade de p53 (Strauss et al., 2005; Strauss e Costanzi-Strauss, 2004).

Figura 8: Mapas esquemáticos dos vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP. Após padronização e otimização dos protocolos, realizamos produções virais de pCLeGFP e pCLPGeGFP pseudotipados com VSVg para satisfazer as demandas dos experimentos. O sobrenadante recolhido das células transfectadas, mas sem ultracentrifugação, mostrou um título de vírus na ordem de 10^6 gfu/ml. O título observado após ultracentrifugação de vírus foi da ordem de 10^8 gfu/ml, na maioria dos ensaios, indicando um aumento significativo na concentração viral (Tabela IV).

Tabela 3: Exemplos de títulos virais obtidos.

pCLPGeGFP	Título sem ultracentrifugação (gfu/ml)^a	Título após ultracentrifugação (gfu/ml)^a
Preparação 1	8,5.10 ⁶	1,6.10 ⁸
Preparação 2	7,3.10 ⁶	1,5.10 ⁸
Preparação 3	8,6.10 ⁵	8,5.10 ⁷
pCLeGFP		
Preparação 1	5,6.10 ⁶	1,2.10 ⁸
Preparação 2	8,0.10 ⁶	1,5.10 ⁸
Preparação 3	3,5.10 ⁶	1,3.10 ⁸

a: O título destes vírus foi determinado por meio de detecção de eGFP por FACS.
Gfu/ml: green fluorescent units/ml

4.2 Teste do vetor pCLPG em célula hematopoiética, ensaios com células K562 contendo um alelo de p53 sensível a temperatura

Foi verificado a resposta do vetor pCLPG na presença de p53 em uma célula hematopoiética, K562 (leucemia mielóide crônica humana, p53-nulo). Para isto, células K562 foram transduzidas com o vetor pCLeGFP ou pCLPGeGFP e células resistentes a G418 foram selecionadas. Em seguida, um alelo de p53 mutante sensível a temperatura foi introduzido com um vetor retroviral adicional e células resistentes a puomicina foram selecionadas. O p53(223) age de forma mutante (transcricionalmente inativo) a 37°C, mas a 32°C a proteína retoma a conformação e atividade selvagem (Bajgelman e Strauss, 2006).

Como visto na Figura 9, a intensidade de eGFP aumentou especificamente nas células K562-pCLPGeGFP-223 quando estas foram cultivadas a 32°C, mas não foi alterada na ausência de p53(223) ou a 37° ou 32°C. Em contraste, a intensidade de eGFP não foi alterada significativamente nas células K562-pCLeGFP-223 quando cultivadas ou a 37° ou 32°C. Estes resultados confirmam que, *in vitro*, a expressão do vetor pCLPGeGFP é controlada especificamente por p53. Também, estes resultados demonstram que o vetor pCLPGeGFP tem a capacidade de ser expresso em células hematopoiéticas.

Ensaio de células K562 transduzidas a 32° e 37°

Ensaio de células K562 transduzidas a 32° e 37°

Figuras 9 e 10: Ensaio em células com alelo sensível à temperatura K562(223) pCLLeGFP **A** para avaliação do perfil de expressão e pCLPGeGFP **B** a 32° e 37° C. Porcentagem de células positivas para eGFP.

Ensaio de células K562 transduzidas a 32° e 37°

Ensaio de células K562 transduzidas a 32° e 37°

Figura 11 e 12: Intensidade de expressão do vetor pCLLeGFP **A** e **B** pCLPGeGFP na presença de p53 na linhagem hematopoiética K562(223).

4.3 Padronização dos protocolos de coleta e cultivo de CMO

Para coleta e cultivo de CMO de camundongos machos C57BL/6, testamos vários protocolos descritos na literatura (Andersson et al., 2003; Robbins et al., 1998). Nós monitoramos a proliferação destas células na presença de citocinas, como indicado na literatura. Observamos que o cultivo das células na presença de IL-3 200 unidades/ml, IL-6 200 unidades/ml e stem cell factor 2.5 ng/ml foi a condição mais confiável, com melhor desempenho. Em geral, coletamos $4-6 \times 10^6$ células nucleadas/animal e observamos, após 72 horas de cultivo um aumento de 20% no número de células. Um exemplo da diferença e morfologia entre CMO e sangue periférico está apresentado na Figura 10.

Figura 13: Comparação morfológica entre sangue periférico (esquerda) e CMO (direita), ambos com coloração policromática Leishmann, aumento 100x

4.4 Padronização dos protocolos de transdução de CMO

Durante o andamento do projeto, tentamos vários protocolos de transdução de CMO. Várias destas tentativas, como descrito posteriormente, não resultaram em transdução detectável por meio de expressão de eGFP. Aqui nós descrevemos somente os ensaios que

proporcionaram os maiores níveis de transdução e menor variação entre experimentos. Utilizando o protocolo de (Andersson et al., 2003) como modelo, exploramos a importância de Retronectina, um derivado de fibrina, que poderá aumentar a eficiência do processo. Também examinamos a influência da pseudotipagem com VSVg em comparação com o envelope anfotrópico.

Como visto na Tabela V, a presença de Retronectina não proporcionou um aumento significativo no número de células eGFP-positivas. Também, não observamos diferença significativa entre os envelopes VSVg ou anfotrópico. Os resultados apresentados aqui representam um experimento típico, mas este resultado foi reproduzido em várias ocasiões e foi consistente entre as CMO e a linhagem K562. Apresentamos um exemplo de CMO transduzida com o vírus pCLeGFP na Figura 14. A quantidade de vírus utilizado em cada transdução foi equivalente ao rendimento de vírus de uma produção inteira (MOI de 10).

Tabela 4: Ensaio típico de transdução CMO e K562

Cél	Retronectina	pCLeGFP (Anfo)	pCLeGFP (VSVg)	% eGFP+	Y média (medida da intensidade de eGFP)
K562	+	-	-	1.87	21.17
K562	+	+	-	9.69	88.73
K562	+	-	+	12.75	96.56
K562	-	+	-	10.75	92.56
K562	-	-	+	13.04	99.19
CMO	+	-	-	0.81	19.73
CMO	+	+	-	6.67	86.11
CMO	+	-	+	5.75	79.49
CMO	-	+	-	7.05	96.76
CMO	-	-	+	4.96	78.80

Figura 14: CMO transduzida com vírus pCLeGFP e visualizada com microscopia de fluorescência. À esquerda, células fotografadas em luz branca. À direita, as mesmas células fotografadas com fluorescência e filtro para eGFP. Aumento, 40x.

4.5 Transplante seriado de CMO não transduzida

Implementamos um modelo de transplante seriado de medula óssea. O total de células retiradas da tíbia e fêmur dos animais C57BL/6 doadores foram cultivadas por 48-72h na presença das citocinas IL-3, IL-6 and SCF, mas sem transdução.

Estas células foram injetadas via veia caudal em animal recipiente previamente irradiado (8.5 Gy em fonte de cobalto com atenuação de 70%). Como controle do procedimento, alguns animais irradiados não receberam células transplantadas. Como visto na Figura 12A, os recipientes primários de transplante (n=4) foram mantidos por 124 dias, enquanto os animais controle sem transplante (n=2) morreram em torno de 21 dias. Transplantes seriados foram realizados quando os recipientes primários foram sacrificados, suas CMO foram coletadas, cultivadas e transplantadas em segundo animal recipiente previamente irradiado. Os recipientes secundários (n=4) Figura 15, mantiveram-se saudáveis por 54 dias, quando foram sacrificados e suas CMO utilizadas para o transplante terciário. No

grupo final transplantado (n=3) Figura 16, 2 animais foram sacrificados após 180 dias de transplante e feitos exames hematológicos. Um recipiente terciário foi mantido por um total de 367 dias pós-transplante e morreu antes que exames pudessem ser realizados.

Alterações hematológicas foram observadas nos recipientes terciários como descrito a seguir. Como mostrado na Tabela 6, estes animais apresentaram um aumento no número de monócitos e neutrófilos, mas um decréscimo nos linfócitos e células polimorfonucleares, comparados com animais jovens adultos não manipulados. Esta alteração pode ter ocorrido devido ao processo experimental, incluindo mobilização das células tronco com 5-FU e cultivo na presença de determinadas citocinas, devido à idade das CMO transplantadas nos recipientes ou a combinação dos dois fatores. Nós calculamos a idade das CMO transplantadas em recipientes terciários serem de 433 dias, a soma das idades do doador, CMO primárias, secundárias e terciárias (75+124+54+180 dias).

Figura 15: Transplante seriado de CMO em camundongos C57BL/6. CMO foi coletada e cultivada na presença de citocinas durante 72 horas, então, implantou-se, por injeção via veia caudal as CMO. Os C57BL/6 foram previamente irradiados para abolir o sistema imune. (A) 3 de 4 camundongos que receberam o transplante eram saudáveis até o dia 124, quando eles foram sacrificados e sua CMO coletadas para o trasplante subsequente. (B) os recipientes de transplante secundários (n=4) eram saudáveis até o 54º dia, quando eles foram sacrificados e sua CMO utilizadas para o transplante terciário. (C) Dois dos três terciários transplantados foram sacrificados após 180 dias para análise

hematológica, o animal restante foi mantido por um total de 367 dias. Em cada painel, o grupo controle (n=2) representa animais irradiados que não receberam o transplante de CMO.

Tabela 5: Sumário de transplante seriado de CMO (ensaio piloto)

	Transplante primário	Transplante secundário	Transplante terciário
Nº. Doadores	5	3	3
Total CMO recolhida	$3,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
Nº. animais controles ^a	2	2	2
Sobrevida animais controles ^b	18-21 d	18-21 d	18-21 d
Nº. animais transplantadas ^c	4	3	3
Manutenção animais transplantadas ^d	42-124 d	56 d	376 d ^e

a: Animais irradiados, mas não transplantados

b: Tempo até a morte do animal

c: Transplante realizado em animal recipiente previamente irradiado e utilizando 4×10^6 células

d: Neste caso, o animal transplantado foi observado para sobrevida e foi sacrificado para servir como fonte de CMO para o próximo transplante seriado

e: Dois animais recipientes terciários foram sacrificados e sangue periférico utilizado para análise hematológica após 120 dias de manutenção.

Tabela 6: Análise de recipientes terciários de CMO (sem transdução)

	Referência: animal ^a adulto		Transplante terciário recipiente ^b		Mudança
	1	2	3	4	
Hematócitos %	42	40	44	46	-
Monócitos %	02	04	09	11	aumento
Eosinófilos %	02	01	01	01	-
Linfócitos %	58	60	37	34	decréscimo
Neutrófilos %	27	24	11	09	decréscimo
Bastonetes %	11	10	44	44	aumento
Basófilos %	-	-	-	-	-

a: aprox 90d de idade

b: sangue periférico coletado 120d pós-transplante

4.6.a Transplante seriado de CMO transduzidas revelaram marcação do vírus, mas não foi detectada sua expressão em ensaio preliminar

Pretendemos avaliar a expressão do vetor retroviral pCLPGeGFP responsivo a p53 em experimentos *in vivo*. Para este ensaio preliminar, CMO foi coletada e cultivada na presença de citocinas e transduzidas com pCLPGeGFP ou com o controle parental do vírus pCLeGFP na presença de Retronectina. A expressão de eGFP foi procurada em CMO transduzida por meio de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, mas não observada (dados não mostrados). Acreditamos que o protocolo utilizado não estava totalmente otimizado e foi realizado antes dos ensaios descritos. Estas CMO transduzidas foram transplantadas em recipientes primários (n=3 para pCLPGeGFP e n=3 para pCLeGFP) e mantidos por um total de 90 dias. Um animal de cada grupo foi sacrificado após 45 dias e suas células recuperadas do sangue, timo e baço e analisadas em citometria de fluxo para expressão de eGFP, esta não foi observada em nenhum dos grupos. Análises hematológicas foram realizadas 54 dias (sangue periférico removido via retro-orbital Tabela VII) e novamente após 90 dias, quando foram sacrificados (Tabela VIII) não foram observadas mudanças significantes nesta ocasião dos exames. A expressão de eGFP foi analisada, mas não observada após 90 dias (dados não mostrados).

CMO coletadas de recipientes primários foram transplantadas em recipientes secundários sem transduções adicionais. Como mostrado na Figura 15, estes recipientes secundários foram mantidos por 54 dias (n=2 para pCLPGeGFP e n=3 para pCLeGFP). Estes animais foram sacrificados e foi feita a análise de expressão de eGFP, mas expressão não foi detectada. Análises hematológicas revelaram aumento de linfócitos nos dois grupos, assim como linfócitos atípicos. Para o grupo pCLPGeGFP, estes linfócitos apresentavam aparência linfoblástica. Adicionalmente, observou-se níveis reduzidos de hematócritos e hemoglobinas foram observadas no grupo pCLPGeGFP.

Figura 16: Transplante seriado de CMO transduzida por pCLEGFP ou pCLPGeGFP. (A) Foram sacrificados os recipientes de transplante primários de transdução de CMO com o pCLEGFP (n=3) ou vetores de pCLPGeGFP (n=3) em dia 90 e suas CMO utilizadas para o transplante secundário. Como demonstrado (B), estes recipientes secundários foram mantidos durante 54 dias antes de sacrifício para análises hematológicas. Em ambos os painéis, as linhas que representam 100% de sobrevivência estavam separadas para revelar as curvas distintas.

Tabela 7: Análise hematológica de recipientes primários de CMO transduzida (sangue periférico coletado via retro-orbital após 54 dias de transplante).

	Ref. padrão	pCLP6eGFP (animal 2)	pCLP6eGFP (animal 3)	pCLeGFP (animal 5)	pCLeGFP (animal 6)
Glóbulos vermelhos RDC $10^6 / \text{mm}^3$	7.10	6.84	7.15	7.62	7.60
Hematócritos %	39	35	34	33	37
Hemoglobina g/dl	14.5	11.6	11.3	11.0	2.3
Vol globular médio % (VGM)	42.5	51.16	47.55	43.30	48.68
Conc média hemoglobina %	12.0	33.14	33.23	33.33	33.24
Conc média hemoglobina corpuscular%	30.0	16.95	15.80	14.41	16.18
Glóbulos brancos $10^3 / \text{mm}^3$	7.62	3.2	3.8	6.2	5.7
Eosinófilos %	0	01	02	0	0
Monócitos %	0.2	0	0	01	0
Linfócitos %	46	88	90	87	91

a: Sem transdução, animal jovem adulto

Tabela 8: Análise hematológica de recipientes primários de CMO transduzidas (sangue periférico coletado via retro-orbital após 90 dias de transplante e sacrifício dos animais) .

	Ref. Padrão	pCLPGeGFP (animal 2)	pCLPGeGFP (animal 3) ^b	pCLeGFP (animal 5)	pCLeGFP (animal 6)
Glóbulos vermelhos RDC 10 ⁶ /mm ³	7.10	6.76	NA	7.63	7.75
Hematócritos %	39	36	NA	35	38
Hemoglobina g/dl	14.5	12.6	NA	11.5	12.3
Vol globular médio % (VGM)	42.5	52.14	NA	44.50	42.66
Conc média hemoglobina %	12.0	29.12	NA	31.15	32.22
Conc média hemoglobina corpuscular%	30.0	17.85	NA	15.42	15.75
Glóbulos brancos 10 ³ /mm ³	7.62	3.3	NA	6.0	3.6
Eosinófilos %	0	01	NA	0	0
Monócitos %	0.2	0	NA	01	0
Linfócitos %	46	90	NA	89	92

a: Sem transdução, animal jovem adulto

b: Animal morreu após 81 dias de transplante

Obs: presença de aglomerados de linfócitos em todas as amostras de CMO transduzidas

Tabela 9: Análise hematológica de recipientes secundários de CMO (sangue periférico removido após sacrifício, 54 dias pós-transplante) .

	Ref. Padrão	pCLPGeGFP (animal 7) ^b	pCLPGeGFP (animal 8) ^b	pCLeGFP (animal 9) ^c	pCLeGFP (animal 10) ^c	pCLeGFP (animal 11) ^c
Glóbulos vermelhos RDC $10^6/\text{mm}^3$	7.10	5.53	5.79	9.61	9.31	5.63
Hematócitos %	39	20	21	40	34	20
Hemoglobina g/dl	14.5	7.6	8.2	12.3	11.3	9.2
Vol globular médio % (VGM)	42.5	36.16	35.98	41.62	36.51	36.22
Conc média hemoglobina %	12.0	27.65	27.22	30.75	33.23	29.1
Conc média hemoglobina corpuscular%	30.0	13.38	13.94	12.79	12.13	13.22
Glóbulos brancos $10^3/\text{mm}^3$	7.62	4.0	4.2	4.6	15.8	4.3
Eosinófilos%	0	01	01	01	0	1
Monócitos %	0.2	01	01	03	03	1
Linfócitos%	46	96	98	90	95	92

a: Sem transdução, animal jovem adulto

b: animais pCLPGeGFP apresentam linfócitos atípicos e periféricos associados a linfoblastos

c: animais pCLeGFP apresentam linfócitos atípicos

4.6.b Análise de DNA genômico de CMO transduzidas

DNA genômico foi coletado das CMO dos recipientes secundários e submetidas a amplificação por PCR para observar a presença das seqüências virais. Como mostrado na Figura 14, foi detectado a presença de provírus, indicando que o provírus foi mantido e observado no nível molecular no recipiente secundário. Porém, não detectamos a expressão de eGFP dos vírus pCLLeGFP e pCLPGeGFP.

Figura 17: Análise das células de medula óssea transduzidas com o vírus pCLLeGFP recuperadas de um trasplante secundário. PCR comum para seqüências virais (GFP, Neomicina e GFP/Neo, posição dos primers mostrado no mapa acima) a partir de DNA genômico isolado de um recipiente secundário. Reação de PCR sem template (faixas 1, 2 e 3) ou com DNA genômico (faixas 4, 5 e 6) utilizando primers para neomicina (faixas 1 e 4), eGFP (faixas 2 e 5) ou eGFP (forward) e Neomicina (reverse, faixas 3 e 6).

A falta de expressão poderia ter várias causas, incluindo um baixo teor de provírus no sistema sangüíneo dos recipientes ou a possibilidade de que o vírus esteja presente, mas sem capacidade de expressar o transgene.

4.7 Experimento principal: Avaliação de expressão retroviral em animais transplantados com CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP

Conforme a proposta original deste projeto, procuramos validar a expressão *in vivo* dos vírus pCLeGFP e pCLPGeGFP no modelo de transplante de CMO. Consideramos que a fase de aprendizagem e início dos ensaios foi completada com sucesso, uma vez que conseguimos manipular e transplantar CMO. Realizamos a partir deste, o esquema de transplantes, apresentado na Figura 24, inclui quatro grupos de experimentação. O grupo G0 consiste em 10 machos mantidos para servir como controle para as análises hematológicas a serem realizadas a cada 2 meses a partir de coleta retro-orbital de sangue periférico. O grupo G1 consiste em fêmeas transplantadas com CMO não transduzida para servir como controle do procedimento. Os grupos G2 e G3 representam os animais transplantados com CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP, respectivamente.

Até o momento de escrever esta tese, temos realizado a análise dos animais recipientes primários, secundários e terciários, com respeito a expressão de eGFP e análise de quimerismo e número de provírus no CMO, sangue periférico, timo e baço. Porém, os animais de observação a longo prazo ainda não foram analisados.

G0: Machos utilizados como controle de idade da CMO

G1: Transplante seriado: sem transdução, como controle do processo

G2: Transplante seriado: transdução com pCLLeGFP

G3: Transplante seriado: transdução com pCLPGeGFP

Figura 18: Esquema de transplantes para o experimento principal. O grupo G0 serve como controle dos ensaios hematológicos, G1 como controle do procedimento e grupos G2 e G3 representam a avaliação da expressão dos vetores.

4.7.a Transplante seriado de CMO transduzida com pCLeGFP ou pCLPGeGFP

A coleta de CMO seguiu o protocolo previamente descrito em material e métodos, com adição de citocinas e manutenção de células em cultura por 72h para enriquecimento da população células antes de seguirmos com o protocolo de transdução.

Para o transplante seriado de cmo, seguimos o protocolo demonstrado em materiais e métodos, com utilização de Retronectina e dois pré-carregamentos com vírus ultracentrifugado e adição de 4×10^6 células mais um terceiro pré-carregamento com vírus com adição de polibreno (dois pré-carregamentos mais uma outra adição de vírus juntamente com as células) e incubadas por 48 horas na presença de citocinas. A quantidade de vírus utilizado em cada transdução foi equivalente ao rendimento de vírus de uma produção inteira de vírus ultracentrifugado (MOI de 10). Títulos virais demonstrados na tabela 4.

Com a padronização correta deste protocolo conseguimos aumentar a eficiência de transdução para aproximadamente 3 a 4% de células positivas para eGFP com intensidade média de 40-45 em células transduzidas com o vetor retroviral pCLeGFP, já as células transduzidas com o veto retroviral pCLPGeGFP atingiram uma porcentagem de 7 a 9% de células eGFP positivas com uma intensidade média de 80-97.

Conforme descrito na Tabela 10, as CMO sem transdução (grupo G0) ou com transdução com pCLeGFP ou pCLPGeGFP (grupos G1 e G2) foram transplantadas em recipientes e, posteriormente, foi realizado o transplante seriado.

Figura 19: Cmo transduzidas com os vetores retrovirais pCLeGFP e PCLPGeGFP posteriormente transplantadas em animais recipientes primários previamente irradiados.

Tabela 10: Sumário de transplante seriado de CMO média do número de células coletadas e transduzidas dos grupos G1, G2 e G3

	Transplante primário	Transplante secundário	Transplante terciário
Nº. Doadores	17	16	16
Total CMO recolhida por animal	1-1,5X10 ⁷	1-1,5X10 ⁷	1-1,5X10 ⁷
Nº. animais controles	3	3	3
Sobrevida animais controles	18-21 dias	18-22 dias	17-21 dias
Nº. animais transplantadas	18	18	14
Manutenção animais pós-transplante	64 dias	59 dias	62dias
Manutenção de animais transplantados (observação ao longo prazo)	Abril 2008 até a presente data ^a	Junho 2008 até a presente data ^a	Agosto 2008 até a presente data ^a

a: 08/12/08, data da entrega da tese

4.7.b Avaliação da expressão viral nos animais recipientes

Para a análise, coletamos células e DNA genômico da medula óssea, sangue periférico, baço e timo dos animais recipientes de transplante de CMO. Pudemos observar expressão de eGFP nas CMO dos animais (Figuras 26, 27, 29, 30, 32 e 33), porém não foi possível detectar a presença do gene repórter no sangue periférico, baço e timo por meio de citometria de fluxo (dados não mostrados). Nas CMO recuperadas dos recipientes primários, nós observamos uma porcentagem de células eGFP positivas entre 3,5-4% para pCLeGFP e 6,5-7,3% para pCLPGeGFP (Figura 21 e 22). Em comparação, as CMO recuperados dos recipientes secundários, foi visto uma porcentagem de 2,8-3,2% de células positivas para pCLeGFP e 4,2-4,7% de células positivas para pCLPGeGFP (Figura 24 e 25). E para os recipientes terciários, observamos 2,3-2,9% de células positivas para pCLeGFP e 3,2-3,6% de células positivas para pCLPGeGFP (Figura 27 e 28). De maneira geral, não foi detectada uma diferença significativa entre o desempenho do vetor pCLPGeGFP em comparação com o vetor pCLeGFP. Também, tanto o número de CMO positiva para expressão de eGFP quanto sua intensidade diminuiu com cada transplante. Maiores detalhes podem ser observados nos gráficos 20, 23, 26.

A.

B.

Figura 20: Gráfico **A**: porcentagens de CMO EGFP positivas recuperadas de animais recipientes primários de transplante (n=3 animais controle, n=6 animais transduzidos com o vetor retroviral pCLeGFP e n=6 animais transduzidos com o vetor retroviral pCLPGeGFP). **B**: Intensidade de expressão de eGFP dos mesmos animais recipientes de transplante.

Figura 21: Análise CMO transduzidas com pCLeGFP recuperadas de animal recipiente primário em citometria de fluxo.

Figura 22: Análise CMO transduzidas com pCLPGeGFP recuperadas de animal recipiente primário em citometria de fluxo.

A.

B.

Figura 23: **A** porcentagens de CMO EGFP positivas recuperadas de animais recipientes secundários de transplante (n=3 animais controle, n=6 animais transduzidos com o vetor retroviral pCLeGFP e n=6 animais transduzidos com o vetor retroviral pCLPGeGFP). **B:** Intensidade de expressão de eGFP dos mesmos animais recipientes de transplante.

Figura 24: Análise CMO transduzidas com pCLGFP recuperadas de animal recipiente secundário

Figura 25: Análise CMO transduzidas com pCLPGGFP recuperadas de animal recipiente secundário.

Figura 26: A: porcentagens de CMO EGFP positivas recuperadas de animais recipientes terciários de transplante (n=3 animais controle, n=6 animais transduzidos com o vetor retroviral pCLeGFP e n=6 animais transduzidos com o vetor retroviral pCLPGeGFP). B: Intensidade de expressão de eGFP dos mesmos animais recipientes de transplante.

File: cmo3.001

Region	% Gated	Y Mean
R1	82.14	1.02
R2	0.63	2.72

File: cmo3.002

Region	% Gated	Y Mean
R1	86.59	1.05
R2	2.40	30.61

File: cmo3.003 Gate:

Region	% Gated	Y Mean
R1	86.15	1.06
R2	2.37	29.35

File: cmo3.004

Region	% Gated	Y Mean
R1	87.20	1.04
R2	2.65	30.11

File: cmo3.005

Region	% Gated	Y Mean
R1	82.24	1.02
R2	2.88	31.07

File: cmo3.006

Region	% Gated	Y Mean
R1	88.63	1.16
R2	2.61	31.49

File: cmo3.007

Region	% Gated	Y Mean
R1	90.80	1.10
R2	2.95	31.26

Figura 27: Análise CMO transduzidas com pCLEGFP recuperadas de animal recipiente terciário

Figura 28: Análise CMO transduzidas com pCLPGeGFP recuperadas de animal recipiente terciário

4.7.c Ensaio com CMO, sangue periférico, baço e timo recuperados de animais recipientes terciários tratados com 5-asacitidina

A observação de expressão de eGFP a partir dos vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP no CMO foi positiva, mas não nos outros tecidos examinados. Isto sugere, entre várias possibilidades, que os vírus poderiam ter sido silenciados. Um dos mecanismos mais comuns de silenciamento retroviral envolve a metilação de seqüências regulatórias, como os LTRs. Um ensaio comum, porém indireto, para revelar a presença de metilação é o tratamento de células com 5-asacitidina, um agente que bloqueia a atividade de metiltransferases e, como resultado, permite que o promotor previamente silenciado retome sua função. Para este ensaio, CMO, sangue periférico, timo e baço recuperados dos recipientes terciários foram sujeitos a tratamento com 5-asacitidina (5mM). Pudemos observar algumas diferenças nas porcentagens de células positivas e intensidade de expressão nos diferentes tecidos tratados quando comparado com os controles transduzidos não tratados (onde não observamos expressão de eGFP no sangue periférico, baço e timo dos animais recipientes de transplante), porém com o tratamento com a droga, pudemos observar um aumento de células positivas e intensidade de eGFP (Figuras 29, 30 e gráfico 28). Isto indica a possibilidade de que o promotor pudesse estar silenciado nos tecidos periféricos analisados, uma vez que, antes do tratamento, só foi possível observar expressão de eGFP em CMO.

Figura 28: Gráfico de intensidade de expressão e porcentagem de cmo transduzidas com os vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP tratadas com 5-asa. Tratamento com 5-asa induziu expressão de eGFP no animal recipiente terciário.

Figura 29: Citometria de fluxo de cmo transduzidas com os vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP tratadas com 5-asa.

Figura 30: Citometria de fluxo de células de sangue periférico transduzidas com os vetores pCLeGFP e pCLPGeGFP tratadas com 5-asa.

4.7.d Análises hematológicas dos grupos estudados

Realizamos as análises hematológicas dos grupos estudados esquematizados na Figura 13. Nas tabelas abaixo, apresentamos as médias dos grupos e desvio padrão. Análises mais detalhadas de cada grupo podem ser observadas nas tabelas no anexo.

Para o grupo G0 analisado (grupo controle do experimento) não observamos mudanças significativas nos parâmetros analisados (Tabela 11) No grupo G1, células transplantadas, porém não transduzidas, observamos uma diminuição no número de glóbulos brancos e aumento do número de linfócitos (Tabela 12)

Nos grupos G2 e G3 (Tabelas 13 e 14) constituídos por animais transplando com cmo transduzidas com os vetores retrovirais, observamos um aumento na porcentagem de hematócritos e linfócitos e diminuição em hemoglobinas e porcentagem de neutrófilos.

Tabela 11: Exames hematológicos grupo G0: média do grupo n=6

	Ref. Padrão	G0 2 meses	G0 4 meses	G0 6 meses
RDCx $10^6/\text{mm}^3$	7.8±0.9	8,18±0,54	8,45±0,68	7,88±0,10
Hematócrito %	38.7 ± 6.0	42,2 ± 1,60	39,8 ± 2,73	38,8 ± 1,16
Hemoglobina g/dl	15.5 ± 4.9	13,9 ± 0,64	13,2 ± 0,87	12,92 ± 0,34
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ± 5.7	44,82 ± 2,74	44,12 ± 2,39	56,93 ± 3,02
Concentração média hemoglobina fl%	34 ± 3.9	32,94 ± 0,82	38,47 ± 0,40	30,21 ± 0,83
Concentração média hemoglobina corpuscular% (CHCM)	17 ± 2.4	14,99 ± 1,06	15,69 ± 1,09	21,60 ± 1,80
WBCx $10^3/\text{mm}^3$	6.6 ± 1.6	4,42 ± 1,02	5,66 ± 0,67	6,48 ± 0,14
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	01 ± 0,81	0 ± 0	01 ± 0,75
Monócitos %	2.4 ±1.5	01 ± 0,75	01 ± 0,76	02 ± 0,51
Linfócitos%	46 ±15	56,6 ± 2,48	67,46 ± 2,78	68,6 ± 2,68
Neutrófilos %	50 ±24.9	41,8 ± 3,02	42,8 ± 3,60	43,4 ± 2,09

Tabela 12: Exame hematológico Grupo G1 média do grupo n=6

	Ref. Padrão	G1 2 meses	G1 4 meses	G1 6 meses
RDCx $10^6/\text{mm}^3$	7.8 ± 0.9	$9,63 \pm 0,79$	$6,59 \pm 0,25$	$8,51 \pm 0,46$
Hematócrito %	38.7 ± 6.0	$32 \pm 1,83$	$39 \pm 2,73$	$46 \pm 4,50$
Hemoglobina g/dl	15.5 ± 4.9	$10,78 \pm 0,43$	$10,78 \pm 0,43$	$11,92 \pm 0,19$
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ± 5.7	$37,83 \pm 1,21$	$59,8 \pm 2,58$	$60,83 \pm 2,10$
Concentração média hemoglobina fl%	34 ± 3.9	$12,56 \pm 0,73$	$17,6 \pm 0,63$	$18,70 \pm 3,68$
Concentração média hemoglobina corpuscular% (CHCM)	17 ± 2.4	$31 \pm 1,03$	$33,70 \pm 0,97$	$36,16 \pm 4,75$
WBCx $10^3/\text{mm}^3$	6.6 ± 1.6	$6,1 \pm 0,41$	$3,5 \pm 0,45$	$4,27 \pm 0,79$
Eosinófilos %	1.1 ± 1.4	$04 \pm 1,92$	$03 \pm 0,75$	$02 \pm 0,51$
Monócitos %	2.4 ± 1.5	$07 \pm 1,47$	$03 \pm 1,50$	$02 \pm 1,36$
Linfócitos%	46 ± 15	$53,6 \pm 2,68$	$62,2 \pm 3,79$	$67,6 \pm 2,31$
Neutrófilos %	50 ± 24.9	$38,6 \pm 3,72$	$30 \pm 2,63$	$28,75 \pm 1,96$

Tabela 13: Exame hematológico Grupo G2 média do grupo n=6

	Ref. Padrão	G2 2 meses	G2 4 meses	G2 6 meses
RDCx $10^6/\text{mm}^3$	7.8 ± 0.9	$9,55 \pm 1,02$	$6,07 \pm 0,24$	$8,41 \pm 0,42$
Hematócrito %	38.7 ± 6.0	$32,2 \pm 2,3$	$40,2 \pm 2,87$	$48 \pm 4,0$
Hemoglobina g/dl	15.5 ± 4.9	$11,22 \pm 1,62$	$11,36 \pm 0,74$	$12,91 \pm 0,34$
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ± 5.7	$35,20 \pm 1,32$	$48,95 \pm 2,75$	$62,55 \pm 3,50$
Concentração média hemoglobina fl%	34 ± 3.9	$12,44 \pm 0,92$	$17,59 \pm 1,37$	$19,92 \pm 0,75$
Concentração média hemoglobina corpuscular% (CHCM)	17 ± 2.4	$29,87 \pm 1,19$	$35 \pm 0,59$	$36,86 \pm 4,90$
WBCx $10^3/\text{mm}^3$	6.6 ± 1.6	$4,6 \pm 0,92$	$3,72 \pm 0,56$	$4,52 \pm 0,98$
Eosinófilos %	1.1 ± 1.4	$4,6 \pm 1,09$	$2,8 \pm 0,51$	$2,4 \pm 0,75$
Monócitos %	2.4 ± 1.5	$3 \pm 0,98$	$1 \pm 0,81$	$03 \pm 1,65$
Linfócitos%	46 ± 15	$53,4 \pm 3,80$	$69,6 \pm 1,86$	$72,6 \pm 0,98$
Neutrófilos %	50 ± 24.9	$38,9 \pm 3,27$	$26 \pm 2,04$	$27,75 \pm 2,25$

Tabela 14: Exame hematológico Grupo G3 média do grupo n=6

	Ref. Padrão	G3 2 meses	G3 4 meses	G3 6 meses
RDCx $10^6/\text{mm}^3$	7.8 ± 0.9	$10,15 \pm 1,30$	$6,08 \pm 0,28$	$8,51 \pm 0,40$
Hematócrito %	38.7 ± 6.0	$35 \pm 1,63$	$40,2 \pm 3,20$	$46 \pm 4,60$
Hemoglobina g/dl	15.5 ± 4.9	$10,38 \pm 1,47$	$11,36 \pm 0,86$	$12,92 \pm 0,39$
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ± 5.7	$36,28 \pm 2,71$	$54,95 \pm 2,92$	$60,64 \pm 3,51$
Concentração média hemoglobina fl%	34 ± 3.9	$10,59 \pm 1,30$	$18,76 \pm 0,86$	$19,70 \pm 0,61$
Concentração média hemoglobina corpuscular% (CHCM)	17 ± 2.4	$26,90 \pm 2,70$	$35 \pm 0,59$	$37,16 \pm 0,15$
WBCx $10^3/\text{mm}^3$	6.6 ± 1.6	$6,24 \pm 0,83$	$3,72 \pm 0,47$	$4,27 \pm 0,30$
Eosinófilos %	1.1 ± 1.4	$03 \pm 1,47$	$01 \pm 0,51$	$02 \pm 0,75$
Monócitos %	2.4 ± 1.5	$3,8 \pm 1,21$	$01 \pm 0,81$	$03 \pm 0,89$
Linfócitos%	46 ± 15	$57,8 \pm 3,88$	$76,2 \pm 2,22$	$77,5 \pm 1,72$
Neutrófilos %	50 ± 24.9	$36,6 \pm 3,48$	$26,85 \pm 1,26$	$29 \pm 2,29$

4.7.e Análise de DNA genômico dos recipientes de transplante para quantificar quimerismo e o número de provírus presente

Foi de nosso interesse investigar o número de cópias de vírus presentes nas células transduzidas. Realizamos estes experimentos utilizando Real Time PCR para quantificar de forma absoluta o número de provírus presentes. Para isto, a quantidade de provírus presente no DNAg de CMO recuperadas dos recipientes seria revelada a partir da amplificação do provírus e este valor comparado com uma curva padrão contendo quantidades conhecidas de provírus. Também, a quantificação por PCR em tempo real da presença do cromossomo Y serve para monitorar o grau de quimerismo nos animais recipientes de transplante.

Como descrito nos Materiais e Métodos, temos desenhado primers específicos para os provírus (tanto pCLeGFP quanto pCLPGeGFP), o cromossomo Y e, como controle, o gene de β -Actina. Estes primers foram validados em ensaios de PCR comum antes de iniciar os ensaios de real time PCR. A curva padrão de provírus foi montada a partir da mistura de quantidades específicas de DNA plasmidial do vetor pCLeGFP com DNA genômico derivado de CMO (não transduzida) para atingir uma proporção que representa um determinado número de provírus por célula. Para os ensaios de padronização do protocolo de real time PCR, começamos com a análise da presença da sequência viral em diluições seriadas criadas a partir da mistura DNA genômico/plasimidial. Posteriormente, construímos a curva padrão. Obtivemos nesta fase de ensaios, valores bem próximos do ideal, os quais foram aprimorados para atingir a melhor eficiência possível, conforme figuras 6 e 7. O número de cópias por célula foi estimado comparando o valor de Ct das amostras da curva padrão vs. As amostras experimentais. Observamos que os valores absolutos obtidos em números de cópias são consistentes, apresentando em torno de 0,01 a 0,05 cópia por célula nas amostras experimentais de DNA genômico dos animais recipientes de transplante. Condizentes com os dados obtidos em citometria de fluxo. Análise da presença do cromossomo Y nas CMO dos recipientes indica que essencialmente todo o sistema hematopoiético foi repovoado com células derivadas do doador (Figuras 37-42)

Figura 31: Para os animais recipientes de transplante primário transduzidos com o vetor retroviral pCLeGFP, observamos valores entre 3,75% e 4,27% de células eGFP positivas, o que corresponde a valores entre 0,03 e 0,04 cópias por célula.

Figura 32: Para os animais recipientes de transplante primário transduzidos com o vetor retroviral pCLPGeGFP, observamos valores entre 6,59% e 7,31% de células eGFP positivas, o que corresponde a valores entre 0,06 e 0,07 cópias por célula.

Figura 33: Para os animais recipientes de transplante secundário transduzidos com o vetor retroviral pCLGFP, observamos valores entre 2,86% e 3,16% de células eGFP positivas, o que corresponde a valores entre 0,02 e 0,03 cópias por célula.

Figura 34: Para os animais recipientes de transplante secundário transduzidos com o vetor retroviral pCLPGGFP, observamos valores entre 4,19% e 4,69% de células eGFP positivas, o que corresponde a valores de 0,04 cópias por célula.

Figura 35: Para os animais recipientes de transplante terciários transduzidos com o vetor retroviral pCLLeGFP, observamos valores entre 2,37% e 2,95% de células eGFP positivas, o que corresponde a valores entre 0,02 e 0,03 cópias por célula.

Figura 36: Para os animais recipientes de transplante terciários transduzidos com o vetor retroviral pCLPGeGFP, observamos valores entre 3,27% e 3,57% de células eGFP positivas, o que corresponde a valores de 0,03 cópias por célula.

Figura 37: Análise de real time em tempo real para o cromossomo Y de animais recipientes primários de transplante pCLLeGFP. Em azul estão as amostras experimentais em rosa, a curva padrão. O mesmo padrão pode ser observado nas figuras 38 e 39.

Figura 38: Análise de real time em tempo real para o cromossomo Y de animais recipientes primários pCLPGeGFP de transplante. Em azul estão as amostras experimentais em rosa, a curva padrão.

Figura 39: Análise de real time em tempo real para o cromossomo Y de animais recipientes secundários pCLeGFP de transplante. Em azul estão as amostras experimentais em rosa, a curva padrão.

Figura 40: Análise de real time em tempo real para o cromossomo Y de animais recipientes secundários de transplante pCLPGeFP. Em verde estão as amostras experimentais em rosa, a curva padrão. O mesmo padrão pode ser observado nas figuras 25 e 26.

Figura 41: Análise de real time em tempo real para o cromossomo Y de animais recipientes terciários de transplante pCLLeGFP. Em verde estão as amostras experimentais em rosa, a curva padrão.

Figura 42: Análise de real time em tempo real para o cromossomo Y de animais recipientes terciários de transplante pCLPGeFP. Em verde estão as amostras experimentais em rosa, a curva padrão.

5. Discussão

A primeira meta deste trabalho foi padronizar e montar o transplante seriado de CMO. Baseado em artigos que descrevem modelos semelhantes de transplante (Challita et al., 1994 e Robbins, 1998), adotamos um sistema de coleta de CMO da tíbia e fêmur de animais machos seguido por estimulação destas células com citocinas e posterior transplante em fêmeas previamente irradiadas. Nesta primeira etapa, consolidamos o processo de coleta e transplante seriado, observando sobrevida dos animais recipientes neste ensaio piloto. Realizamos ensaios utilizando Retronectina e envelopes VSVg ou anfotrópico procurando uma melhora na eficácia da transdução viral. No entanto, não observamos mudanças significativas para a transdução utilizando Retronectina e optamos por utilizar VSVg para produção de vírus ultracentrifugado. No último ensaio de padronização de transplante seriado de CMO transduzidas com o vetor retroviral pCLpGFP ou pCLPGeGFP revelou células marcadas com vírus, porém não foi observado expressão de eGFP. Com estes ensaios iniciais, foi padronizado os protocolos de coleta, transdução e transplante seriado de CMO.

A segunda meta deste trabalho foi investigar a expressão do vetor retroviral pCLPGeGFP *in vivo*, em um experimento principal. Antes deste experimento, tínhamos observado a expressão do vetor pCLPGeGFP somente em cultura de células. Para medir a expressão *in vivo* do vetor pCLPG, realizamos transdução de CMO e transplante das células contendo nosso vetor de interesse com o objetivo de observar ao longo prazo, no transplante seriado, a expressão sustentada do vetor pCLPGeGFP comparada com o parental pCLpGFP. No vetor pCLPG, o LTR foi modificado com a remoção de elementos *enhancer* e o *negative control region*, sendo que um elemento responsivo a p53 foi colocado no seu lugar. Com esta nova configuração no promotor do vetor retroviral, questionamos se esta não ofereceria em benefício em evitar silenciamento de expressão viral *in vivo* quando comparado com o vetor parental, não modificado. Também, por ser induzível por p53, poderia ser de grande valia uma vez que, quando p53 fosse ativado por drogas quimioterápicas ou stress, a expressão viral aumentaria.

Para medir a expressão *in vivo* do vetor pCLPG, utilizamos o modelo de transplante seriado com CMO transduzida ou com o vetor parental pCLeGFP ou o vetor de interesse pCLPGeGFP. Ao longo das coletas dos animais recipientes de transplante, coletamos CMO, baço, timo e sangue periférico destes. Realizamos análise por citometria de fluxo para observação da expressão do gene repórter eGFP. Pudemos observar a expressão de eGFP somente em CMO, mas não nos demais tecidos coletados. O silenciamento de expressão retroviral poderia ter várias causas, incluindo metilação do promotor.

Para explorar a possibilidade que o silenciamento viral podia ser relacionado com metilação, o total de células coletadas de CMO, baço, timo e sangue periférico de animais recipientes terciários (grupo controle, pCLeGFP e pCLPGeGFP) foram submetidas a tratamento com 5-asacitidina. Observamos um aumento no número de células eGFP-positivas principalmente no sangue periférico. Isto nos leva a propor que a metilação foi revertida com o tratamento realizado, uma observação que será investigada com mais precisão futuramente. Este ensaio também indica que o provírus estava presente nas células no sangue periférico e que a falta de sua expressão não foi devido à perda de células transduzidas.

A taxa de transdução com os vetores pCLeGFP ou pCLPGeGFP foi aproximadamente de 8,5 % e 10%, respectivamente, nas CMO utilizadas para o transplante primário do experimento principal. Foi observado uma diminuição gradual tanto no número de CMO eGFP-positivas quanto na intensidade de eGFP após cada re-transplante. A taxa inicial de transdução foi aquém do desejado para este experimento. Nosso alvo foi atingir entre 20 e 30% das células com o intuito de limitar o número de cópias de provírus presente em cada célula transduzida. Seguindo a literatura, transdução de células K562 resultou em mais que 30% de células transduzidas foi associado com um número elevado de cópias de provírus detectado (Kustikova et al., 2003). Como nosso alvo é determinar o nível e duração de expressão do transgene, preferimos realizar a transdução de maneira que resulte em uma única cópia do provírus presente por célula transduzida. Tratando-se de protocolos clínicos, sabe-se que altas taxas de transdução aumentam a variabilidade, mas também podem aumentar o risco de

mutagênese insercional. Estando assim, estabelecido um dilema quanto aos níveis de transdução ideais e uso seguro dos retrovírus.

Em trabalhos típicos de terapia gênica *ex vivo* do sistema hematopoiético incluía ativação de células T do sistema imune para tratamento de câncer com a introdução de um gene selvagem para o tratamento de imunodeficiências ou superexpressão à drogas resistentes, visando proteger o sistema hematopoiético de altas doses de quimioterápicos. Isto requer expressão sustentada do transgene a longo prazo para obtenção de benefício terapêutico, mesmo que em testes clínicos a expressão viral é freqüentemente perdida. A perda da expressão viral pode estar relacionada à seleção positiva de células transduzidas ou como resultado de alterações na cromatina como a metilação.

Seleção positiva foi observada em tratamentos como da imunodeficiência X-SCID, com a introdução de uma cópia selvagem do gene IL2RG mediada por transdução retroviral. Neste caso, o LTR de MoMuLV foi utilizado para dirigir a expressão. A atividade de IL2RG, do receptor IL-2, participa da transdução, diferenciação e sinalização de várias citocinas. A expressão do transgene, pode então levar a uma seleção proliferativa às células transduzidas permitindo a expansão e expressão do gene terapêutico.

Em contraste, a esperada seleção positiva de células transduzidas com retrovírus com o cDNA para MDR-1 não foi observada. Seria de grande utilidade se esta estratégia protegesse as células hematopoiéticas contra os efeitos adversos da quimioterapia e permitisse a aplicação de altas doses de medicamentos contra tumores sólidos. A seleção positiva *in vivo*, neste caso, seria benéfica, mas testes clínicos ainda não foram realizados. O uso da seleção positiva é claro, mas não testado em protocolos clínicos. Outros estudos mostraram que parte do problema é a funcionalidade da proteína MDR-1. O cDNA selvagem foi sujeito a efeitos de splicing que reduziram a função da proteína. Modificações no cDNA para arrumar estes eventos poderiam restaurar a esperada função da proteína e auxiliar na seleção positiva para o tratamento com drogas. (Abonour., 2000; Cmejlova et al., 2003).

A ausência da seleção positiva é associada com o silenciamento do LTR, associado à expressão do MoMuLV. Este silenciamento pode estar relacionado com elementos localizados na sequência viral ou interagindo com a célula hospedeira, incluindo remodelamento da cromatina ou metilação do LTR.

Alterações na região controladora negativa, enhancers e PBS's podem favorecer uma estabilidade da expressão mediada pelo LTR em células-tronco hematopoiéticas. Por exemplo, o uso do vetor MND, desenvolvido no laboratório de Donald Kohn, reduziu a incidência de metilação e expressão persistente do transgene.(Challita e Konh, 1994); Challita et al., 1995, Halene et al.,1999, Robbins et al.,1998.

No caso do vetor pCLPGeGFP do presente trabalho, não foram feitas alterações no PBS, uma medida que poderíamos pensar em adotar futuramente em novos ensaios.

Com os ensaios realizados com PCR em tempo real, pudemos confirmar os valores de eGFP obtidos em citometria de fluxo. Por exemplo em ensaios de citometria de fluxo onde observamos 3% de células positivas para eGFP obtemos valores na curva padrão para o real time, por exemplo, de 0,03 cópias por célula, valores estes, consistentes, em todos os ensaios realizados com as amostras de DNA genômico coletadas de animais recipientes primários, secundários e terciários. Esta observação indica que cada célula eGFP-positiva provavelmente continha somente um provírus.

Acreditamos que o nível de expressão oferecido pelo vetor pCL não foi significativamente diferente em comparação com o vetor pCLPG. Comparando o nível de expressão dos ensaios de transplante seriados pudemos concluir que os resultados de análises de citometria de fluxo foram condizentes com os dados de PCR em tempo real e que a diferença de expressão observada reflete o número de cópias por células observadas. Junto, os ensaios de citometria de fluxo e PCR em tempo real indicam que as células transduzidas tinham somente uma cópia de provírus, sendo igual no caso de pCLeGFP ou pCLPGeGFP. Deste modo, não há uma diferença significativa entre os níveis de expressão de pCLeGFP e pCLPGeGFP.

Para os demais tecidos, especialmente sangue periférico, não conseguimos detectar expressão de eGFP por citometria de fluxo e a

detecção de provírus por PCR em tempo real esta em andamento neste momento. Entretanto, ensaios preliminares indicam uma quantidade especialmente baixa de provírus nestes tecidos. Já em células de timo e baço, há o fator de diluição destas com células estromais, células não derivadas da linhagem hematopoiética o que dificulta a análise de expressão de eGFP e detecção de provrus. Porém, o tratamento com 5-asacitidina revelou a presença de células portadoras dos vírus nestes tecidos.

Para explorar a possibilidade que a expressão viral foi silenciada por metilação, temos ensaios previstos para tentar observar expressão após tratamento com 5-asacitidina *in vivo*. Neste momento, os grupos de animais transplantados no experimento principal (“longo prazo” seguindo figura17) ainda não foram avaliados. Imaginamos que 3 animais em cada grupo (G1, G2 e G3) podem ser tratados com 5-asacitidina e sacrificados no dia seguinte. A expressão viral poderá ser comparada entre estes animais tratados e os animais restantes, não tratados com droga. Para comprovar a reversão de metilação, seqüenciamento após tratamento com bisulfato poderá ser realizada.

Para a análise de quimerismo, procuramos a presença do cromossomo Y nos animais fêmeas recipientes de transplante do doador macho. Pudemos observar, em média 95-98% de quimerismo, ou seja, quase a totalidade de células observadas nos animais recipientes eram provenientes dos animais doadores primários.

Pela análise hematológica realizada, observamos a ausência de anemia no grupo G0, mas um ligeiro aumento no número de linfócitos ao longo do tempo. Em comparação, todos os grupos G1, G2 e G3 demonstraram anemia hipocrômica microcítica que foi especialmente evidente no transplante primário. A anemia teve a tendência à normalização após o segundo e terceiro transplante seriado. Os grupos G1, G2 e G3 também demonstraram uma ligeira aumento no numero de linfócitos ao longo do tempo, de maneira consistente com o grupo G0. Também, os grupos G1, G2 e G3 demonstraram um aumento no número de neutrófilos que foi mantido mesmo depois dos transplantes seriados, uma mudança não observada no grupo G0. O aumento de neutrófilos poderia ser uma

resposta do organismo ao processo de transplante, mas este ponto teria que ser estudado com mais detalhes.

A presença de anemia nos transplantes primários se deve, em toda probabilidade, ao processo de manipulação, cultivação e transdução das CMO. Mesmo o grupo G1, cuja CMO não foi transduzida, foi sujeito às mesmas etapas de manipulação, incluindo exposição à Retronectina e polibreno. Acreditamos que a introdução do vírus em si não causou uma reação adversa dado que as análises hematológicas dos grupos G2 e G3 foram parecidas com as do grupo G1. Porém, o processamento das células poderia ter ocasionado alterações, como a anemia. É interessante notar que, o quadro de anemia diminuiu após o segundo e terceiro transplante. Nestes casos, as CMO foram processadas somente com cultivo na presença de citocinas, mas não foi exposto a Retronectina, polibreno ou vírus. Talvez as CMO foram menos danificadas com o simples re-transplante em comparação com o procedimento de transdução seguido por transplante, assim permitindo que a anemia não fosse mantida.

Mostramos que a expressão do vetor pCLPG poderia ser induzida por p53 em células hematopoiéticas utilizando K562 como modelo. A expressão de pCLPG na medula óssea dos animais transplantados com CMO transduzida com este vetor foi observada, implicando que o p53 endógeno foi empregado para dirigir a expressão do vetor pCLPG. Para provar este conceito diretamente, a utilização de animais deficientes de p53 (knockouts) seria útil. Neste caso, esperaríamos observar que o nível de expressão de pCLPG varia de acordo com a presença de p53 endógeno homozigoto (+/+), hemizigoto (-/+) ou nocauteado (-/-).

Perspectivas para o uso de pCLPG

A continuação do desenvolvimento do vetor pCLPG para futuras aplicações esta sendo avaliado. Pelo menos dois pontos precisam ser considerados. Primeiro, o fato que o vetor pCLPG sofreu silenciamento fora do compartimento da medula óssea indica que o arranjo do promotor ainda não está adequado para fornecer expressão sustentada. Segundo, o uso de retrovírus recombinante derivado do MoMuLV está diminuindo e o uso de vetores alternativos, como o lentivírus, esta aumentando atualmente.

O silenciamento do vetor pCLPG podia ser relacionado com metilação. Como descrito anteriormente, esta possibilidade será avaliada diretamente. Se for o caso que ocorra metilação do LTR, poderíamos alterar o vetor pCLPG para ser menos suscetível à metilação. Para isto, uma possibilidade inclui a alteração do PBS, retirando o PBS nativo e inserindo no seu lugar o PBS do *d1587rev*, um retrovírus endógeno murino. Esta substituição foi demonstrada afim de evitar metilação em vetores retrovirais (Challita et al., 1995).

Porém, a utilização de vetores derivados do MoMuLV sugere que o perfil de integração do provírus no genoma da célula transduzida terá a preferência para regiões CpG ricas, especialmente aquelas próximas à promotores gênicos. Neste caso, mesmo modificando o vetor pCLPG para evitar metilação, este vetor ainda seria apta de provocar a expressão de genes vizinhos do local de integração. A tendência atual no campo de terapia gênica no sistema hematopoiético, especialmente para doenças como SCID, é de evitar o uso de vetores derivados do MoMuLV. Quando o vetor pCLPG foi montado no ano 2000, ainda não havia sido publicado nenhum caso de efeito adverso com a utilização do vetor retroviral. Atualmente, temos mais conhecimento do perfil de integração dos vetores derivados de MoMuLV e suas conseqüências. Devido ao risco de transformação celular, como visto nos casos de X-SCID, o uso clínico destes vetores seria limitado.

A utilização de vetores lentivirais poderia contribuir para reduzir a probabilidade de ocorrer conseqüências não desejadas devido à mutagênese insercional. Atualmente existem 18 protocolos clínicos em andamento que utilizam vetores lentivirais, a maioria sendo para terapia gênica da AIDS e para aplicações no sistema hematopoiético (Levine *et al.*, 2006; Wiley *et al.*, 2008). Os dados da literatura indicam que vetores lentivirais devem ser mais seguros do que os vetores retrovirais devido ao seu perfil de integração e o uso de promotores internos. Diferente do MoMuLV, os vetores lentivirais tem uma tendência de integrar em genes, sim, mas não tão perto do promotor. A maior distância entre o provírus e o promotor gênico diminui a probabilidade de ativar um gene endógeno por causa de presença do provírus (Wu et al., 2003). Também, vetores típicos

lentivirais possuem LTRs “SIN” (self-inactivating), faltantes da região U3 (Baum et al.,2004). Assim os vetores lentivirais não carregam o enhancer nativo do vírus e sim utilizam um promotor heterólogo interno.

Com este projeto, respondemos a pergunta se o vetor pCLPG oferece expressão sustentada *in vivo*. Nós observamos sua expressão somente na CMO dos animais recipientes de transplante, porém não observamos expressão do vetor pCLPG (e nem do vetor pCL) no sangue periférico. Este fato limitaria a utilidade do vetor pCLPG no tratamento de doenças hematopoéticas. Entretanto, o benefício principal deste projeto foi na implementação do modelo de transplante seriado de CMO transduzida.

Tendo a capacidade de realizar transplante de CMO, temos agora a oportunidade de explorar aspectos de terapia genica no sistema hematopoiético, além dos vetores pCL e pCLPG. A aplicação de vetores lentivirais esta sendo estudada em nosso laboratório atualmente. A experiência que foi adquirida com este projeto seria de grande utilidade para futuros alunos do nosso laboratório.

6.Referências Bibliográficas

Abonour R, Williams DA, Einhorn L, Hall K. M, Chen J., Coffman J. Traycoff, C. M., Bank, A., Kato, I., Ward, M., *et al.*, . Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells.[see comment]. *Nature Med.*2000; 6: 652-658.

Aiuti A, Cassani B, Andolfi G, Mirolo M, Biasco L, Recchia A, Urbinati F, Valacca C, Scaramuzza S, Aker, M, *et al.*, Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest.*2007; 117: 2233-2240.

Andersson G, Denaro M, Johnson K, Morgan P, Sullivan A, Houser S, Patience C, White-Scharf ME, and Down J. D. Engraftment of retroviral EGFP-transduced bone marrow in mice prevents rejection of EGFP-transgenic skin grafts. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy.*2003; 8: 385-391.

Bajgelman MC, Costanzi-Strauss E, and Strauss, B E. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *J Biotechnol.* 2003; 103.

Bajgelman MC and Strauss BE. The DU145 human prostate carcinoma cell line harbors a temperature-sensitive allele of p53. *Prostate.*2006; 66:1455-1462.

Baum C, Dullmann J, Li, Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, and von Kalle, C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood.*2003; 101: 2099-2114.

Blaese RM, Culver KW, Chang L, Anderson, WF, Mullen C, Nienhuis A, Carter C, Dunbar C, Leitman S, and Berger M. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992. *Human Gene Therapy.*1993; 4: 521-527.

Blaese R M, Culver KW, Miller AD, Carter C S, Fleisher T, Clerici M, Shearer G., Chang, L, Chiang Y, and Tolstoshev P. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science.*1995; 270: 475-480.

Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M. and Yee J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 8033-8037.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile, G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P., Selz F., Hue C, Certain S, Casanova, J L, *et al.*,. Gene therapy

of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science.2000; 288: 669-672.

Challita PM, and Kohn D. B. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A.1994; 91: 2567-2571.

Challita P M, Skelton D, el-Khoueiry, A, Yu, X J, Weinberg K, and Kohn, D. B. Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. J Virol.1995; 69: 748-755.

Coffin JM., Hughes SH and Varmus, HE. Retroviruses (Plainsview, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).1997.

Cmejlova J, Hildinger M, Cmejla R, Fuchs O, Kalabova D, Baum C and Jelinek, J. Impact of splice-site mutations of the human MDR1 cDNA on its stability and expression following retroviral gene transfer. Gene Ther. 2003; 10: 1061-1065.

Deichmann A, Hacein-Bey-Abina S., Schmidt M, Garrigue A, Brugman M. H., Hu, J., Glimm H, Gyapay G, Prum B., Fraser, C. C., *et al.*,. Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. J Clin Invest.2007; 117: 2225-2232.

Friedmann T. Gene therapy's new era: A balance of unequivocal benefit and unequivocal harm. Molecular Therapy. 2003; 8: 5-7.

Gaspar H B., Bjorkegren E, Parsley K, Gilmour KC, King D, Sinclair J, Zhang F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L. D., *et al.*,. Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. Mol Ther. 2006; 14: 505-513.

Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier, F., Bouneaud C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., *et al.*,. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. N Engl J Med.2002; 346: 1185-1193.

Halene S, Wang L, Cooper R M., Bockstoe, D. C., Robbins, P. B., and Kohn D B. Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector. Blood. 1999; 94: 3349-3357.

Johnson P, Gray D, Mowat M and Benchimol, S. Expression of wild-type p53 is not compatible with continued growth of p53-negative tumor cells. Mol Cell Biol. 1991; 11: 1-11.

Kohn DB. Gene therapy for childhood immunological diseases. Bone Marrow Transplant. 2008; 41: 199-205.

Kustikova OS, Wahlers A, Kuhlcke K, Stahle B, Zander AR, Baum C and Fehse, B. Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. Blood. 2003; 102: 3934-3937.

Levine B. L., L. M. Humeau, et al. "Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector." Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(46): 17372-7.

Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A, Frank, O *et al.*, Murine leukemia induced by retroviral gene marking. Science. 2002; 296: 497.

Miller DG, Trobridge GD, Petek LM, Jacobs MA, Kaul R and Russell DW. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. J Virol. 2005; 79: 11434-11442.

Mortellaro A, Hernandez RJ, Guerrini MM, Carlucci F, Tabucchi A, Ponzoni M, Sanvito F, Doglioni C, Di Serio C, Biasco L., *et al.*, Ex vivo gene therapy with lentiviral vectors rescues adenosine deaminase (ADA)-deficient mice and corrects their immune and metabolic defects. Blood. 2006; 108:2979-2988.

Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long, Z, Carter CS, Garabedian EK, Alleyne M, Brown M, *et al.*, Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. Blood. 2003; 101: 2563-2569.

Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, and Verma IM. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. Journal of Virology. 1996; 70: 5701-5705.

Ory DS, Neugeboren BA, and Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996; 93:11400-11406.

Pike-Overzet K, van der Burg M, Wagemaker G, van Dongen, JJ, and Staal, FJ. New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy. Mol Ther. 2007; 15: 1910-1916.

Robbins PB, Skelton DC, Yu XJ., Halene S, Leonard EH, and Kohn, D. B. Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine

hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 10182-10187.

Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, Butylkova Y, Heydarkhan-Hagvall S, Gekas C, Zhang R, Goldhaber JL, Mikkola HK, Plath K, and MacLellan WR. Reprogrammed Mouse Fibroblasts Differentiate into Cells of the Cardiovascular and Hematopoietic Lineages. Stem Cells. 2008

Schwarzwaelder K, Howe SJ, Schmidt M, Brugman MH, Deichmann A, Glimm H, Schmidt S, Prinz C, Wissler M, King DJ, *et al.*, Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. J Clin Invest. 2007; 117: 2241-2249.

Strauss B. Transcriptional control strategies in gene therapy vectors. In cent Development in Gene Therapy, J. Xiang, ed. (Kerala, India, Transword Research Network). 2007; pp. 23-52.

Strauss BE, Bajgelman MC and Costanzi-Strauss E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. Cancer Gene Ther. 2005; 12: 935-946.

Strauss BE, Costanzi-Strauss E. pCLPG: a p53-driven retroviral system. Virology. 2004; 321: 165-172.

Strauss BE, Costanzi-Strauss E. Combating oncogene activation associated with retrovirus-mediated gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. Braz J Med Biol Res. 2007; 40: 601-613.

Wiley JS. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide - provided by the Journal of Gene Medicine. Disponível em <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>. Acesso em 25/Jul/2007.

Wu X, Li Y, Crise B, and Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. Science. 2003; 300: 1749-1751.

Zhong L, Zhao W, Wu, J., Maina N, Han Z, and Srivastava A. Adeno-associated virus-mediated gene transfer in hematopoietic stem/ progenitor cells as a therapeutic tool. Curr Gene Ther. 2006; 6: 683-698.

Referências Internet:

<http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi
<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
<http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3> www.cgi

Anexos

Figuras 1 A, B e C. Análises hematológicas dos grupos G0 após 2 meses, 4 meses e 6 meses de transplante.

Exames hematológicos de animais do grupo G0 após 2 meses recipiente primário

	Ref. padrão	G0.1	G0.2	G0.3	G0.4	G0.5
RDCx 10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.89	8.90	8.80	9.69	8.64
Hematócrito %	38.7±6.0	44	44	40	42	41
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	14.0	14.7	13.6	14.1	13.1
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	41.82	49.43	45.45	43.34	47.45
Concentração média hemoglobina fl%	34 ±3.9	31.81	33.40	34.00	33.57	31.95
Concentração média hemoglobina corp. %	17 ±2.4	13.30	16.51	15.45	14.55	15.16
Glób. brancos 10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	5.6	5.4	3.7	4.0	3.4
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	0	01	01	02	0
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	00	00	01	02
Linfócitos %	46 ±15	63	57	54	50	59
Neutrófilos %	50 ±24.9	27	38	44	51	49

Exames hematológicos de animais do grupo G0 após 4 meses recipiente secundário

	Ref. Padrão	G0.1	G0.2	G0.3	G0.4	G0.5
RDCx 10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.18	8.56	7.17	8.57	8.79
Hematócrito %	38.7±6.0	37	41	41	37	43
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.3	13.6	13.6	12.3	14.3
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	42.10	36.16	35.98	41.62	36.51
Concentração média hemoglobina fl%	34 ±3.9	33.24	33.17	33.17	33.24	33.25
Concentração média hemoglobina corp. % (CHCM)	17 ±2.4	17.15	15.88	14.81	14.35	16.26
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.5	6.3	5.0	5.4	5.1
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	0	0	0	0	0
Monócitos %	2.4 ±1.5	02	03	01	01	02
Linfócitos %	46 ±15	74	69	68	66	67
Neutrófilos %	50 ±24.9	41	48	41	49	47

Exames hematológicos de animais do grupo G0 após 6 meses recipiente terciário

	Ref. padrão	G0.1	G0.2	G0.3	G0.4	G0.5
RDCx 10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	7.64	7.77	7.84	7.81	7.88
Hematócrito%	38.7±6.0	33	36	36	35	34
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.41	12.96	13.12	12.98	13.16
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	54.05	52.93	59.49	58.77	59.45
Concentração média hemoglobina fl%	34 ±3.9	30.75	30.13	30.15	28.82	31.22
Concentração média hemoglobina corp.%(CHCM)	17 ±2.4	20.12	20.25	24.20	21.17	22.30
WBCx 10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.6	6.3	6.4	6.3	6.8
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	01	0	02	0	01
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	02	01	02	02
Linfócitos%	46 ±15	68	65	69	69	72
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	43	45	42	46

Figuras 2 A, B e C. Análises hematológicas dos grupos G1 após 2 meses, 4 meses e 6 meses de transplante.

Exames hematológicos de animais do grupo G1 após 2 meses recipiente primário

	Ref. Padrão	GO	G1.1	G1.2	G1.3	G1.4	G1.5
RDCx 10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.89	8.99	11.15	9.66	9.36	10.51
Hematócrito%	38.7±6.0	44	31	35	30	31	33
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	14	11	10.5	11.3	10.1	11
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	41.82	33.96	32.89	35.66	35.32	35.81
Concentração média hemoglobina fl%	34 ±3.9	31.81	12.84	12.47	13.15	12.96	11.40
Concentração média hemoglobina corp.%(CHCM)	17 ±2.4	13.30	31.65	31.98	29.70	29.88	31.82
WBCx 10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	5.6	5	4.5	5.0	03	5.8
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	0	06	05	04	04	074
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	05	02	04	01	03
Linfócitos%	46 ±15	63	52	56	49	55	56
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	34	39	41	44	35

Exames hematológicos de animais do grupo G1 após 4 meses recipiente secundário

	Ref. padrão	GO	G1.1	G1.2	G1.3	G1.4	G1.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.18	6.43	6.25	6.55	6.89	6.87
Hematócrito%	38.7±6.0	37	42	37	42	36	39
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.3	11	10.5	11.3	10.1	11
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	42.10	62.72	59.20	64.12	58.63	59.33
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	33.24	18.04	17.17	18.59	17.00	17.22
Concentração média hemoglobina corp. % (CHCM)	17 ±2.4	17.15	34.48	33.10	35.16	32.89	32.88
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.5	3.0	3.5	4.4	3.7	3.5
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	0	03	02	04	02	03
Monócitos %	2.4 ±1.5	02	05	02	04	01	02
Linfócitos%	46 ±15	74	67	66	56	61	61
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	18	17	24	21	20

Exames hematológicos de animais do grupo G1 após 6 meses recipiente terciário

	Ref. padrão	G0.1	G1.1	G1.2	G1.3	G1.4	G1.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	7.64	7.69	7.78	8.71	8.74	8.65
Hematócrito%	38.7±6.0	33	37	46	52	50	47
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.41	12.50	12.89	12.96	13.02	12.99
Vol globular médio. % (VGM)	50.5 ±5.7	54.05	53.78	58.96	57.95	58.66	59.62
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	30.75	31.86	31.96	22.86	25.65	25.31
Concentração média hemoglobina corp. % (CHCM)	17 ±2.4	20.12	20.58	33.22	34.66	34.78	35.12
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.6	4.5	4.3	4.8	4.3	4.6
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	01	02	02	03	02	02
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	01	03	04	03	04
Linfócitos%	46 ±15	68	70	69	73	72	69
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	27	26	22	25	27

Figuras 3 A, B e C. Análises hematológicas dos grupos G2 após 2 meses, 4 meses e 6 meses de transplante.

Exames hematológicos de animais do grupo G2 após 2 meses recipiente primário

	Ref. padrão	G0.1	G2.1	G2.2	G2.3	G2.4	G2.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.89	11.40	8.92	8.57	9.56	9.33
Hematócrito%	38.7±6.0	44	30	30	35	32	34
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	14	14.3	10.0	10.3	10.4	11
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	41.82	36.84	33.63	35.00	33.96	36.61
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	31.81	12.54	11.21	12.35	12.46	13.65
Concentração média hemoglobina corp.% (CHCM)	17 ±2.4	13.30	28.81	28.84	31.85	30.21	29.66
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	5.6	5.1	3.1	4.1	4.5	5.8
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	0	02	04	04	05	075
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	01	00	01	01	03
Linfócitos%	46 ±15	63	61	64	69	59	68
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	34	39	41	34	36

Exames hematológicos de animais do grupo G2 após 4 meses recipiente secundário

	Ref. padrão	G0	G1.1	G1.2	G1.3	G1.4	G1.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.18	7.02	7.01	6.42	6.69	6.21
Hematócrito%	38.7±6.0	37	36	41	44	43	37
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.3	10.44	12.47	11.89	11.31	10.73
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	42.10	59.80	67.43	67.18	65.02	65.36
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	33.24	17.42	16.72	20.15	17.10	16.58
Concentração média hemoglobina corp.% (CHCM)	17 ±2.4	17.15	34.48	35.01	36.12	34.81	34.60
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.5	4.5	3.5	3.2	4.0	3.4
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	0	01	00	00	01	01
Monócitos %	2.4 ±1.5	02	02	00	00	01	00
Linfócitos%	46 ±15	74	88	87	90	92	91
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	18	20	22	19	16

Exames hematológicos de animais do grupo G2 após 6 meses recipiente terciário

	Ref. padrão	G0.1	G2.1	G2.2	G2.3	G2.4	G2.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	7.64	7.74	8.22	8.79	8.74	8.71
Hematócrito%	38.7±6.0	33	33	47	50	51	49
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.41	12.41	12.96	13.18	13.09	12.98
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±5.7	54.05	54.05	61.98	62.22	62.75	63.15
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	30.75	30.75	19.73	19.85	18.92	20.32
Concentração média hemoglobina corp. % (CHCM)	17 ±2.4	20.12	30.12	37.21	37.33	36.98	37.15
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.6	6.6	4.3	3.9	4.2	4.7
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	01	01	02	03	02	03
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	01	05	04	03	05
Linfócitos%	46 ±15	68	70	71	72	70	72
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	28	31	34	33	30

Figuras 4 A, B e C. Análises hematológicas dos grupos G3 após 2 meses, 4 meses e 6 meses de transplante.

Exames hematológicos de animais do grupo G3 após 2 meses recipiente primário

	Ref. padrão	G0.1	G3.1	G3.2	G3.3	G3.4	G3.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.89	9.40	8.75	11.93	10.05	10.65
Hematócrito %	38.7±6.0	44	36	34	33	37	35
Hemoglobina g/dl	15.5±4.9	14	12.3	8.0	8.94	12.6	10.1
Vol globular médio % (VGM)	50.5±5.7	41.82	38.29	38.66	38.57	31.09	34.82
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	31.81	13.0	9.14	10.56	10.04	10.22
Concentração média hemoglobina corp.% (CHCM)	17 ±2.4	13.30	29.26	23.52	23.55	29.36	28.85
WBCx10 ³ /mm ³	6.6±1.6	5.6	5.3	7.1	6.5	6.9	5.4
Eosinófilos %	1.1±1.4	0	06	09	09	08	06
Monócitos %	2.4±1.5	01	03	06	03	03	04
Linfócitos%	46 ±15	63	53	42	41	57	51
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	42	44	51	50	50

Exames hematológicos de animais do grupo G3 após 4 meses recipiente secundário

	Ref. padrão	G0	G1.1	G1.2	G1.3	G1.4	G1.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	9.18	6.02	6.08	6.42	5.69	6.21
Hematócrito%	38.7±6.0	37	36	41	44	43	37
Hemoglobina g/dl	15.5±4.9	12.3	10.44	12.47	11.89	11.31	10.73
Vol globular médio % (VGM)	50.5±5.7	42.10	59.80	67.43	67.18	65.02	65.36
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	33.24	17.47	19.55	19.42	18.85	18.10
Concentração média hemoglobina corp.% (CHCM)	17 ±2.4	17.15	34.48	35.01	36.12	34.81	34.60
WBCx10 ³ /mm ³	6.6±1.6	6.5	4.5	3.5	3.2	4.0	3.4
Eosinófilos %	1.1±1.4	0	01	00	00	01	01
Monócitos %	2.4±1.5	02	02	00	00	01	00
Linfócitos%	46 ±15	74	88	87	90	92	86
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	15	16	15	18	17

Exames hematológicos de animais do grupo G3 após 6 meses recipiente terciário

	Ref. padrão	G0.1	G3.1	G3.2	G3.3	G3.4	G3.5
RDCx10 ⁶ /mm ³	7.8±0.9	7.64	7.46	8.71	8.79	8.74	8.71
Hematócrito%	38.7±6.0	33	36	47	50	51	49
Hemoglobina g/dl	15.5 ±4.9	12.41	12.30	12.96	13.18	13.09	12.98
Vol globular médio % (VGM)	50.5 ±6.7	54.05	54.01	61.98	62.22	62.75	63.15
Concentração média hemoglobina fl% (HCM)	34 ±3.9	30.75	20.75	19.73	19.85	18.92	20.32
Concentração média hemoglobina corp.% (CHCM)	17 ±2.4	20.12	37.22	37.21	37.33	36.98	37.15
WBCx10 ³ /mm ³	6.6 ±1.6	6.6	6.6	4.3	3.9	4.2	4.7
Eosinófilos %	1.1 ±1.4	01	01	02	03	02	03
Monócitos %	2.4 ±1.5	01	04	05	04	03	05
Linfócitos%	46 ±15	68	69	68	72	69	72
Neutrófilos%	50 ±24.9	41	28	31	24	33	36