

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**TERAPIA GÊNICA:
CONTRIBUIÇÃO PARA UMA
ABORDAGEM FARMACOLÓGICA**

Antônio Carlos Burlamaque Neto

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, fevereiro de 2005.

Ao meu Pai, Marco Antônio Burlamaque,
que me ensinou em qual sentido deve apontar meu caminho,
e à minha Mãe, Heloísa Verschoore Burlamaque,
incansável provedora das melhores condições para cada passo meu.

“Sem amor, sem resistência,
ninguém sabe do que é capaz”.

Lobão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani, por sua prontidão e pelas oportunidades concedidas.

À Dr^a. Ursula Matte, pela orientação, amizade e liberdade criativa.

À acadêmica de Farmácia Gabriella Rejane dos Santos, pela extrema e qualificada dedicação.

À Prof^a. Dr^a Maria Luiza Saraiva Pereira, à Prof^a. Dr^a Teresa Dalla Costa, à Prof^a. Dr^a Elizabeth Cirne Lima e à Dr^a Maira Burim, pela colaboração.

A todos integrantes do Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial àqueles que contribuíram diretamente: Ana Helena Paz, Ana Ilda Ayala Lugo, Cristina Kath, Guilherme Baldo, Maria Cristina Bernardinelli, Matias Melendez, Matheus Barbosa Vieira, Paula Terraciano e Raquel Cristina Balestrin.

Ao pessoal do Centro de Pesquisas – HCPA – UFRGS, do Serviço de Genética Médica – HCPA – UFRGS e do Departamento de Bioquímica – ICBS – UFRGS, pela disponibilização da estrutura e dos serviços necessários.

À Angela Sitta, por tudo.

Aos amigos Alexandre Altino Tavares, Carla Streit, Luis Carlos Sant'Anna da Silva, Ângela Fachel, Leonardo Augusto Karam Teixeira, Rodrigo Macedo, Rodrigo Vargas, Helen Pedroni, Gilda Neves e Charley Christian Staats, pela enriquecedora participação.

A todos com quem tive o privilégio de conviver.

SUMÁRIO

	Pg.
Resumo	I
<i>Abstract</i>	III
Introdução	01
Terapia Gênica	01
Vetores	04
Lipossomos	07
Farmacologia	12
Farmacocinética	14
Farmacodinâmica	20
Integração entre terapia gênica e farmacologia	23
Referências Bibliográficas	26
Artigo 1: <i>Gene therapy and drug therapy – a yet poorly Explored relationship</i>	29
Artigo 2: <i>Detection of GFP by fluorescence Spectrophotometry</i>	38
Discussão	53
Conclusões	58

RESUMO

A transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo de conferir um benefício terapêutico ao corrigir uma anormalidade ou proporcionar às células uma nova função constitui a essência da terapia gênica. Seu princípio baseia-se no entendimento de que algumas doenças são causadas por defeitos em um ou mais genes, levando à produção descontrolada ou à supressão de uma proteína essencial para o funcionamento das células. Doenças monogênicas (como os erros inatos do metabolismo), câncer, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas e doenças adquiridas (infecciosas, por exemplo) são alvos da terapia gênica.

Na terapia gênica, o agente terapêutico em questão é o material genético de interesse. Tanto os elementos regulatórios quanto o gene de interesse são clonados em um plasmídeo de expressão, que é, então, utilizado para a construção de vetores de transferência virais e não virais. Bicamadas lipídicas microscópicas denominadas lipossomos são vetores não virais comumente utilizados. Este trabalho teve como objetivo iniciar uma adaptação das abordagens da farmacologia ao estudo de vetores não virais em terapia gênica e padronizar a detecção da *green fluorescent protein* (GFP) por espectrofotometria de fluorescência, determinando o tempo de expressão máxima dessa proteína em cultura de células HepG2 e obtendo-se, assim, um método quantitativo para avaliação da eficiência de transfecção de vetores e parâmetros de tempo para futura detecção da GFP *in vivo*.

É possível traçar paralelos entre a farmacoterapia e a terapia gênica. A comparação entre as composições de formulações farmacêuticas e de vetores de transferência leva-nos a pensar que o gene de interesse corresponderia à pró-droga,

enquanto a proteína expressa equivaleria à droga, uma vez que se constitui no componente terapeuticamente ativo. Os demais elementos presentes nos plasmídios, como os promotores e sítios de poliadenilação, corresponderiam aos excipientes e o vetor de transferência como um todo equivaleria à formulação farmacêutica.

A detecção da GFP expressa por células HepG2 transfectadas pelo plasmídio *pTracer* associado a *LipofectamineTM2000* mostrou-se semi-quantitativamente possível por espectrofotometria de fluorescência. O tempo de expressão máxima desta proteína neste estudo foi 48 horas, sendo este também o tempo máximo de análise. É necessário, portanto, que os tempos de análise da expressão protéica sejam expandidos. A adaptação de abordagens farmacológicas pode contribuir para o aprimoramento técnico necessário para que a terapia gênica torne-se uma forma de tratamento amplamente difundida.

ABSTRACT

Transference of genetic material to an individual's cells aiming a therapeutic benefit by correcting an abnormality or providing a new cellular function is the essence of gene therapy. Its principle is based on the knowledge that some diseases are caused by defects in one or more genes, leading to uncontrolled production or suppression of a protein that is essential to cell functions. Monogenic disease (such as inborn errors of metabolism), cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, and acquired diseases (infectious, for example) are all gene therapy targets.

In gene therapy, the therapeutic agent at issue is the genetic material of interest. Regulatory elements and gene of interest are cloned into expression plasmids, which are used for construction of viral and non viral transference vectors. Microscopic lipid double layers called liposomes are commonly used non viral vectors. This study aimed to establish pharmacological approaches to the study of gene therapy non viral vectors. Additionally to set up the detection of green fluorescent protein (GFP) by fluorescence spectrophotometry, determining the time of maximum expression of this protein in HepG2 cell cultures therefore obtaining a quantitative method for analysis of vectors transfection efficiency and time parameters for future GFP detection *in vivo*.

It is possible to correlate drug therapy and gene therapy. Comparison between composition of a pharmaceutical dosage form and that of a transference vector allows one to think that the gene of interest corresponds to a pro-drug, while the expressed protein is equivalent to the drug, since it is the therapeutically active component. Other elements in plasmids, such as promoters and poliadenilation sites, would correspond to

excipients and the transference vector as a whole would be equivalent to the pharmaceutical dosage form.

Detection of GFP expressed by HepG2 cells that were transfected by *pTracer* plasmid associated to *LipofectamineTM2000* was semi-quantitatively possible through fluorescence spectrophotometry. Maximum expression time of this protein in this study was 48 hours, which was also the maximum time of analysis. It is therefore necessary to expand protein expression analysis times. Adaptation of pharmacological approaches may contribute to technical improvement needed in order to transform gene therapy into a widely used form of treatment.

INTRODUÇÃO

Terapia Gênica

Baseado no conceito “um gene, uma enzima” e aproveitando as descobertas então recentes dos mecanismos moleculares de expressão gênica, French Anderson teorizou a terapia gênica pela primeira vez em 1967 (Matte & Giugliani, 2004). A terapia gênica constitui-se na transferência de material genético para dentro das células de um indivíduo com o objetivo de conferir um benefício terapêutico ao corrigir uma anormalidade existente ou proporcionar às células uma nova função (Lemoine, 1999). Seu princípio baseia-se no entendimento de que algumas doenças são causadas por defeitos em um ou mais genes, levando à produção descontrolada ou à supressão de uma proteína essencial para o funcionamento das células (Anderson, 2000). Mais de 20 anos depois, a idéia de Anderson tornou-se realidade quando ele, Steven Rosemberg e Michael Blaese a realizaram como tratamento para uma doença genética do sistema imune, a deficiência de Adenosina Deaminase (ADA) (Matte & Giugliani, 2004).

Inicialmente, a terapia gênica tinha seu foco principal nas doenças monogênicas, tais quais os erros inatos do metabolismo. Recentemente, contudo, um leque mais abrangente de enfermidades, como câncer, doenças cardiovasculares, desordens neurodegenerativas e doenças adquiridas (infecciosas, por exemplo), tornou-se alvo da terapia gênica (Lemoine, 1999). Até 2004, estiveram em andamento no mundo todo 987 testes clínicos de terapia gênica. A maioria dos protocolos dirige-se ao câncer, enquanto que doenças monogênicas, cardiovasculares, infecciosas e outros protocolos correspondem

aos demais testes clínicos em proporções aproximadamente iguais entre si, conforme mostrado na figura 1(www.wiley.co.uk/genmed/clinical).

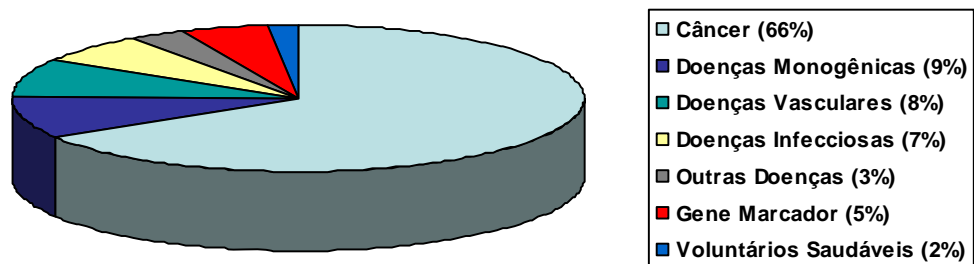


Figura 1. Distribuição dos testes clínicos de terapia gênica em relação às suas indicações. Fonte: www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Diferentes estratégias terapêuticas são disponibilizadas pela administração de material genético. A compensação de genes defeituosos ou ausentes, o aumento ou a redução das funções de genes presentes, a aquisição de sensibilidade a uma pró-droga normalmente inerte e a interferência no ciclo de vida de agentes infecciosos são mecanismos aplicáveis de acordo com as exigências de cada tratamento. O objetivo maior da terapia gênica é a melhora do quadro clínico através de uma única administração de um gene terapêutico apropriado (Lemoine, 1999). Contudo, esta possibilidade de administração dificilmente se tornará realidade. Mesmo assim, a viabilização de administrações em número reduzido separadas por longos períodos tem potencial de disponibilizar tratamentos melhores do que os convencionais para diversas doenças.

Atualmente, é eticamente aceita somente a terapia gênica em células somáticas, que constitui-se na inserção de genes em células diplóides. Esta abordagem não acarreta a

passagem do material genético para a progênie e necessita da utilização de vetores virais ou não virais para a transferência gênica. A administração do material genético pode ser dividida em três categorias (Lemoine, 1999), sumarizadas na figura 2.

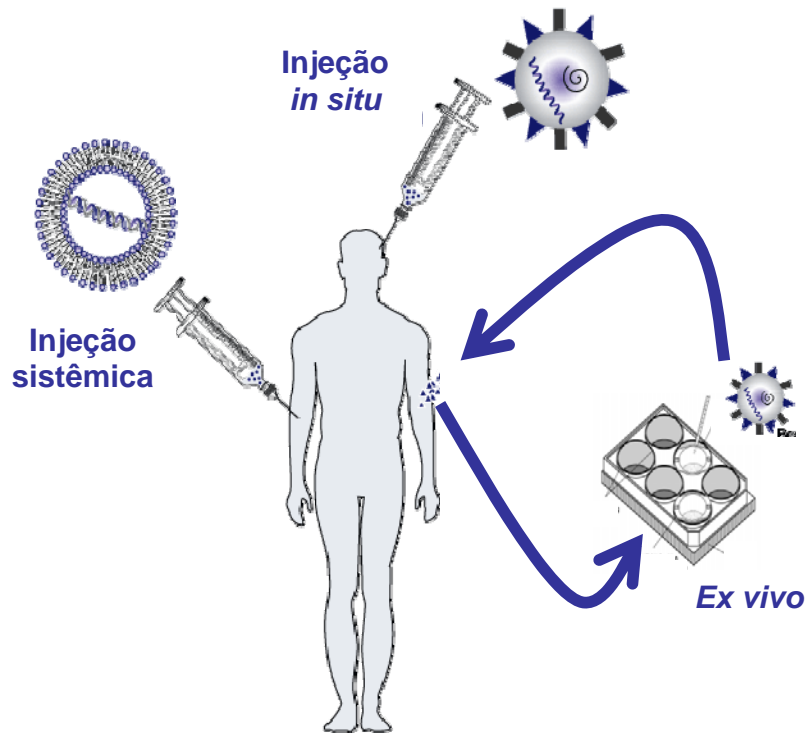


Figura 2: categorias de administração de material genético.

A administração *ex vivo* requer a retirada de células de um organismo para cultivo e manipulação *in vitro*, seguidos por subsequente reimplantação destas células no organismo. Seus principais atrativos são a ausência de resposta imunológica ao vetor e a maior eficiência de entrega deste. No entanto, é um método que exige mais etapas, apenas alguns quadros clínicos são passíveis de tratamento desta forma (é inapropriada para tratar tecidos do sistema nervoso central, por exemplo) e, até hoje, somente uma pequena porcentagem

das células reimplantadas permanecem viáveis (Lemoine, 1999; Villanova & Consiglieri, 1999).

A administração *in vivo* é dividida em *in situ* e sistêmica. A primeira constitui-se na administração do vetor diretamente no tecido alvo e é a de maior interesse clínico, tendo em vista a atual baixa eficiência dos vetores de direcionarem-se apenas a alvos específicos. Contudo, esta metodologia não é apropriada para certos tipos de tecidos, como o ósseo, por exemplo (Lemoine, 1999; Villanova & Consiglieri, 1999).

Por fim, a administração sistêmica é a estratégia com o maior potencial de uso. Todavia, o direcionamento do gene ao tecido correto ainda é insuficiente para que esta técnica tenha maior sucesso. Alguns vetores são prontamente removidos pelo fígado ou apresentam tropismo por tecidos particulares. Esta característica pode ser tanto uma vantagem quanto uma desvantagem (Lemoine, 1999; Villanova & Consiglieri, 1999).

Vetores

Avanços no desenvolvimento de vetores prometem aprimorar seu direcionamento e eficiência. A incorporação de polímeros, anticorpos, substratos enzimáticos e ácidos nucléicos que proporcionam funções especiais pode aumentar o tempo de circulação dos vetores, possibilitando sua chegada a vasos sanguíneos de menor aporte, direcioná-los a tecidos específicos ou, ainda, controlar a liberação do agente terapêutico. Alguns artifícios já foram testados com sucesso, como a incorporação de polietilenoglicol (PEG) a lipossomos catiônicos, que os protege da opsonização por proteínas plasmáticas. O PEG é degradado pela fosfolipase A₂ secretada, assim liberando uma quantidade maior do agente

terapêutico em tecidos inflamados ou cancerosos (Pardridge, 2003; Davidsen et al, 2003; van Zanten et al, 2004).

É importante não confundir vetor de clonagem com vetor de transferência. Os plasmídios são amplamente utilizados como vetores de clonagem, sendo bem adaptados para receberem material genético com variação de tamanho desde poucas centenas até 9000 pares de bases nitrogenadas. São moléculas de DNA circular, de fita dupla e extracromossômico que possui capacidade de replicação autônoma. Na natureza, ocorrem em bactérias e em alguns organismos eucarióticos unicelulares, sendo também manipulados pelo ser humano. Frequentemente, transportam genes que conferem resistência a antibióticos, que são utilizados para distinguir entre as células hospedeiras que receberam ou não o vetor de clonagem. Plasmídios desenvolvidos para serem utilizados tanto em células procarióticas como eucarióticas são chamados *shuttle vectors* (Zaha et al, 1996). Os vetores de transferência, por sua vez, atuam como veículos na administração e entrega do material genético de interesse e são classificados em vetores virais e não virais.

Os vetores virais são compostos por vírus geneticamente modificados no sentido de conferir-lhes replicação incompetente, limitando a partícula viral a apenas um ciclo de infecção como medida de segurança. Atualmente, há cinco grupos principais de vetores virais usados, cujas vantagens e desvantagens estão apresentadas no quadro abaixo. Cabe ressaltar que as características consideradas vantajosas ou não dependem fundamentalmente das doenças a serem tratadas. Por exemplo, protocolos para o tratamento de câncer apresentam exigências distintas quanto às características de integração dos vetores em relação ao tratamento de doenças genético-metabólicas (Strayer et al, 1998; Yi et al, 2005; Kolokoltsov et al, 2005; Hsu et al, 2005; Park et al, 2005).

QUADRO I – Características dos principais vetores virais.

VETOR VIRAL	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Vetores retrovirais	Relativamente não patogênicos; Infectam uma grande variedade de células; Integram-se ao genoma do hospedeiro.	Só infectam células em divisão; Podem causar mutagênese insercional.
Vetores lentivirais	Integram-se ao genoma do hospedeiro; Infectam células que não estão em divisão.	Relacionados a doenças graves (HIV e HTLV1); Podem causar mutagênese insercional.
Vetores adenovirais	São os vetores de DNA mais utilizados; Produzem grande número de partículas puras; Infectam diversos tecidos.	Não se integram ao genoma; São imunogênicos.
Vetores virais adeno-associados	Não têm efeitos patogênicos conhecidos; Demonstram alta afinidade pelos tecidos; Expressão estável; Causam resposta imune quase insignificante.	São vetores difíceis de serem produzidos.
Vetores virais de herpes simplex	Maior capacidade de inserto; Tropismo pelo sistema nervoso central.	Pouco utilizados.

Os vetores não virais são alternativas para as estratégias anteriores. Existem duas classes principais de vetores não virais: DNA nu e estruturas químicas de encapsulação de genes. Pesquisas revelaram que plasmídios nus podem entrar nas células e expressar seu material genético, apesar da baixa eficiência e do mecanismo desconhecido de integração celular. As estruturas químicas de encapsulação de agentes terapêuticos, como lipossomos, lipoplexos, polímeros biodegradáveis, microesferas, nanocápsulas e outros, têm a capacidade de associar-se com ácidos nucleicos. Esta associação possibilita a liberação mais prolongada do que o uso de DNA nu e a redução da toxicidade em relação ao uso de vetores virais. A adição de outras moléculas, como polietilenoglicol ou anticorpos, pode auxiliar no direcionamento e controle da liberação do material genético (Pardridge, 2003; Davidsen et al, 2003; van Zanten et al, 2004).

Lipossomos

Os lipossomos, vetores utilizados neste estudo, são vesículas microscópicas formadas espontaneamente quando lipídios, geralmente fosfolipídios, são colocados em meio aquoso (Vemuri & Rhodes, 1994). Organizam-se em bicamadas concêntricas cujo diâmetro pode variar de algumas dezenas de nanômetros a dezenas de micrômetros e que circundam parte do meio aquoso no qual foram dispersos. Os fosfolipídios são moléculas anfífilas, possuem cabeça polar e cauda apolar. Quando a cauda apolar é formada por uma única cadeia de hidrocarbonetos, os fosfolipídios formam micelas, enquanto que duas cadeias de hidrocarbonetos formam bicamadas quando as cabeças polares são grandes (por exemplo, fosfatidilcolina) e fase hexagonal reversa tipo 2 (FHRT₂) quando as cabeças polares são pequenas. Estes podem fazer parte da composição dos lipossomos, desde que o fosfolipídio dominante seja formador de bicamadas, que são mais estáveis que as micelas em função da interação molecular mais forte proporcionada pelas cadeias hidrocarbonadas duplas. O tamanho da cabeça polar também influencia no formato da estrutura devido à solvatação de maneira diretamente proporcional (Perrie et al, 2001).

A temperatura de fusão (T_m) das bicamadas estabelece o ponto de transição entre as fases líquida e geleificada. No estado líquido cristalino, as membranas lipossomais são menos estáveis, mais permeáveis e apresentam maior tendência de interação com macromoléculas desestabilizadoras. A T_m é determinada pela concentração e pela composição química dos fosfolipídios, pela presença de impurezas e pela natureza do material terapêutico associado. Quanto maior a cadeia hidrocarbonada e o grau de saturação, maior a T_m, que também sofre influência da natureza da cabeça polar. A adição

de colesterol à membrana é outro fator que modifica a fluidez, reduzindo a de lipídios insaturados e aumentando a dos saturados. Lipossomos com T_m superior a 37°C apresentam baixa permeabilidade em condições fisiológicas. A permeabilidade pode ser otimizada para aplicações específicas como, por exemplo, a liberação do agente terapêutico em tecidos inflamados por lipossomos cuja T_m é aproximadamente 38°C (Biltonen & Lichtenberg, 1993; Tyrrel et al, 1976).

A carga superficial é outra propriedade físico-química de extrema relevância na utilização de lipossomos. As vesículas neutras tendem a ser menos estáveis que as carregadas devido à agregação entre elas e sua interação fraquíssima com as células pode acarretar a liberação do conteúdo no espaço extracelular. Entretanto, lipossomos pequenos e neutros são aqueles com maior permanência no sangue. A incorporação de lipídios carregados na bicamada aumenta o volume do compartimento aquoso em função do afastamento causado pela repulsão de cargas. A eficiência de associação entre lipossomo e material terapêutico permanece em torno de 100%, independente da composição da bicamada (Sharma & Sharma, 1997).

Ainda é bastante limitado o conhecimento dos parâmetros que afetam o comportamento dos lipossomos *in vivo*. Apesar de apresentarem analogia constitucional às células humanas (pela bicamada fosfolipídica), os lipossomos podem ser rapidamente removidos da circulação por células do sistema retículo endotelial. As vesículas são prontamente fagocitadas por monócitos e macrófagos no fígado, no baço, na medula óssea e nos pulmões após administração intravenosa (Sharma & Sharma, 1997). Assim, o agente terapêutico associado pode não atingir tecidos que não fazem parte do sistema retículo endotelial, limitando seu uso, ao passo que o acúmulo das vesículas neste sistema pode

deprimi-lo ou causar certo grau de toxicidade (Allen & Chonn, 1987; Allen et al, 1989). Desta forma, a liberação prolongada, apontada como potencial característica vantajosa dos lipossomos, não estaria ocorrendo. Como o tamanho e as propriedades de superfície também modificam a distribuição do conteúdo, pode-se reduzir o diâmetro das vesículas, adequar a carga superficial, ajustar sua composição, utilizar fosfolípídeos resistentes a fosfolipases ou bloquear o sistema retículo endotelial para garantir a liberação prolongada. Lipossomos pequenos podem passar por regiões com permeabilidade capilar aumentada ou por endotélios fenestrados, enquanto que lipossomos grandes dificilmente atravessam a barreira endotelial (Chonn & Cullis, 1995; Ellen et al, 1982; Hwang et al, 1987).

O grau de permeabilidade das vesículas a elementos do plasma é outro fator determinante da meia-vida plasmática. Demonstrou-se que componentes plasmáticos, como a lipoproteína de alta densidade (HDL), induzem a formação de poros na membrana lipídica de tamanho inversamente proporcional à quantidade de colesterol na formulação e diretamente proporcional à perda do conteúdo. Da mesma forma, a incorporação de gangliosídeos às membranas diminui a lise, aumentando a meia-vida de circulação, assim como o acréscimo de derivados de polietilenoglicol e outros polímeros. Ao atingirem às células-alvo, as possíveis interações são intercâmbio molecular entre as membranas lipossomal e celular, adsorção das vesículas à superfície celular, fusão de membranas e endocitose ou fagocitose (Bonté & Juliano, 1986; Wasan et al, 1994; Wasan et al, 1994).

São diversas as etapas existentes entre a administração de um vetor de transfecção e a transfecção propriamente dita. Primeiro, o vetor deve chegar até a célula-alvo, o que pode ser comprometido pela presença de proteínas circulantes e de proteínas da matriz extracelular, obstáculos com o potencial de interferir na estabilidade dos sistemas

terapêuticos e na sua difusão a um tecido. Uma vez dentro da célula-alvo, sucedem-se etapas intracelulares como a liberação do sistema no citoplasma, o transporte até o núcleo, a dissociação do DNA, sua passagem por poros da carioteca e os eventos necessários para culminar na expressão da proteína de interesse. Até agora, os lipossomos catiônicos vêm sendo vistos como os mais promissores. A formação de complexos entre plasmídeos e vetores é um processo difícil de controlar. As cargas opostas de plasmídios, que são aniônicos, e lipídios catiônicos atraem-se eletrostaticamente, reduzindo a repulsão interna da membrana e resultando em estabilização do sistema. A carga final é calculada para ser positiva, o que permite a fixação do sistema aos proteoglicanos de heparan sulfato presentes na superfície de células aderentes e que conduzem à endocitose. Vetores constituídos por lipopoliâminas são dotados de capacidade residual de tamponamento, uma vez que suas aminas ainda podem receber prótons, o que ocorre dentro dos endossomos devido ao pH levemente ácido. Assim, a atividade das ATPases endossomais é retardada, preservando o sistema, e acarretando em um compensador influxo endossomal de prótons, seguido de influxo de cloreto por equilíbrio de cargas e de água por osmose, resultando no rompimento do endossomo e na liberação do sistema no citoplasma. Os mecanismos de ação das etapas subsequentes são pouco elucidados (Cohen-Haguenauer, 2001).

Entretanto, os complexos formados por DNA e lipídios catiônicos ainda apresentam diversos problemas. A instabilidade frente à agregação ocorre em concentrações salinas fisiológicas e na presença de componentes de fluidos corporais como as proteínas séricas. A provável polidispersão é outra característica prejudicial no mesmo sentido. Sem a adição de outros componentes, não há especificidade celular e a entrada nas células é lenta. Uma vez dentro das células, tendem a se agregar dentro dos endossomos,

formando macropartículas que dificultam a dissociação dos ácidos nucléicos, que, mesmo quando livres, não chegam ao núcleo com facilidade (Lemoine, 1999). Apesar da baixa eficiência *in vivo*, há diversos relatos de transfecções realizadas com lipossomos catiônicos que obtiveram bons resultados *in vitro*. A *LipofectamineTM2000*, produto desenvolvido pela companhia Invitrogen e utilizado no presente estudo, por exemplo, apresenta eficiência de transfecção comprovada em diversas linhagens celulares (www.invitrogen.com).

Existem diversas formas de se classificar os lipossomos, seja com base no número de bicamadas sobrepostas, tamanho das vesículas ou métodos de preparo. As diferentes classificações e o tamanho aproximado dos lipossomos estão relacionados no quadro 2.

QUADRO II – Nomenclatura e tamanho aproximado de vários tipos de lipossomas (Villanova & Consiglieri, 1999).

CLASSIFICAÇÃO	TIPOS DE VESÍCULAS	TAMANHO APROXIMADO (µm)
Pelo tamanho	Vesículas unilamelares pequenas (SUV) Vesículas unilamelares grandes (LUV)	0,025 – 0,05 0,1
Pela lamelaridade	Vesículas multilamelares (MLV) Vesículas unilamelares (ULV)	0,05 – 10 0,025 – 0,1
Pelo método	Vesículas obtidas por evaporação em fase reversa (REV) Vesículas obtidas por French press (FPV) Vesículas obtidas por injeção de éter (EIV)	0,5 0,05 0,02

Os lipossomos podem, ainda, ser divididos quanto à composição lipossomal e aos mecanismos de liberação intracelular do agente terapêutico. Os lipossomos convencionais são constituídos por fosfolípidos neutros ou aniônicos e colesterol e tem curta meia-vida, pois são capturados por células do sistema retículo endotelial. Lipossomos sensíveis a pH e sujeitos à endocitose fundem com a membrana celular e liberam seu conteúdo no

citoplasma em valores de pH ácido. Lipossomos catiônicos são estruturalmente instáveis e tóxicos em altas doses. Imunolipossomas sofrem endocitose mediada por receptores e ligam-se a células específicas, podendo liberar seu conteúdo no meio extracelular próximo ao tecido alvo, de onde o fármaco difunde-se pela membrana para produzir seu efeito. Por fim, lipossomos de longa circulação apresentam camada superficial hidrofílica que proporciona meia-vida de circulação longa (Puisieux, 1993; Lasic, 1998).

A euforia inicial sobre as aplicações rápidas da terapia gênica foi gradualmente substituída por cautela e pela constatação de que o seu desenvolvimento efetivo é tecnicamente muito mais exigente do que originalmente antecipado. É preciso aprimorar os vetores de transferência e os métodos de transferência gênica hoje existentes de maneira a aumentar a eficiência da transferência e dos níveis de expressão gênica, além de diminuir a imunogenicidade (Steele, 2000). Outro aspecto importante, porém ainda pouco estudado, são os parâmetros farmacológicos dos métodos de transferência utilizados (Honigman et al, 2001).

Farmacologia

Nas terapias convencionais, os agentes terapêuticos mais empregados são os fármacos. O fármaco é a molécula responsável pela principal atividade de uma formulação quando em um sistema biológico, ou seja, é o princípio ativo. Os demais agentes são chamados de adjuvantes, que são componentes não terapêuticos como diluentes, agentes estabilizantes, conservantes e flavorizantes. O conjunto formado por fármacos e adjuvantes é denominado formulação farmacêutica (Remington, 2000). De acordo com a via de

administração, as formulações são preparadas em formas farmacêuticas apropriadas como comprimidos, cápsulas, injetáveis, pomadas e outros, facilitando a administração dos fármacos. Os princípios ativos devem ser liberados das formas farmacêuticas nas quantidades apropriadas e de modo que o início e a duração de suas ações sejam os desejados (Ansel et al, 2000).

Após a descoberta de um novo fármaco e a caracterização de suas propriedades físicas e químicas, é necessário que se obtenha uma grande quantidade de informações farmacológicas. Deve-se determinar o mecanismo de ação do princípio ativo sobre o sistema biológico, assim como a concentração mínima de efeito e a concentração mínima de toxicidade para estabelecimento da janela terapêutica. A velocidade de absorção da substância, seu padrão de distribuição e sua concentração no organismo, o local e a duração de sua ação também devem ser entendidos. Além disso, é preciso conhecer a degradação metabólica do fármaco e a atividade de todos os seus metabólitos, bem como o modo e a velocidade de sua eliminação ou excreção (Ansel et al, 2000).

A farmacologia é a ciência que estuda os fármacos, que, por sua vez, são definidos como qualquer agente químico que afeta os processos da vida. O conhecimento da história, das propriedades físico-químicas, da composição, dos efeitos bioquímicos e fisiológicos, dos mecanismos de ação, absorção, distribuição, biotransformação e excreção e dos usos terapêuticos e afins dos fármacos formam o abrangente leque da farmacologia. A relação entre a dose administrada de uma droga e os eventos exercidos e desencadeados por esta em um organismo é descrita por duas áreas básicas da farmacologia: a farmacocinética e a farmacodinâmica (Goodman-Gilman, 2003). A relação entre a fase biofarmacêutica e essas duas áreas está esquematizada na figura 3.

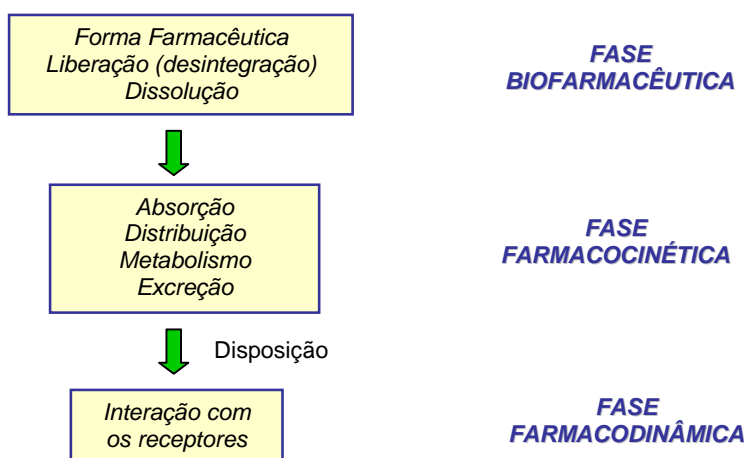


Figura 3: Fases da farmacoterapia.

Farmacocinética

A farmacocinética é o estudo cronológico do fármaco e seus metabólitos em um organismo. Para produzir seus efeitos característicos, é necessário que os fármacos estejam em concentrações adequadas nos seus locais de ação. As concentrações atingidas não são apenas uma função da quantidade da droga administrada, mas também da taxa de sua absorção, das características da sua distribuição, da sua interação a outras moléculas, da localização dos tecidos que se deseja atingir e das suas biotransformação e excreção (Goodman-Gilman, 2003).

O objetivo da farmacocinética é determinar o modo mais apropriado de tratar um paciente, indicando a dose a ser administrada, o intervalo de doses que deve ser utilizado, a melhor via de administração e a forma farmacêutica mais apropriada. Desta forma, também torna-se possível a determinação de posologias para grupos especiais, como crianças, idosos, gestantes e fetos, obesos e indivíduos de determinadas raças, sexos e hábitos, tais

quais o alcoolismo e o tabagismo. A farmacocinética faz uso de modelos matemáticos compartimentais e não-compartimentais que descrevem a relação entre concentração dos fármacos e tempo nos diferentes tecidos e é aplicada no monitoramento de fármacos, na individualização de terapias, no tratamento de intoxicações, no acerto de doses para hemodiálise, na correlação entre farmacocinética e farmacodinâmica, nos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência e na farmácia clínica (Gibaldi & Perrier, 1982).

As vias de administração são classificadas quanto ao efeito como locais ou sistêmicas e dividem-se entre administração através de pele e mucosas (oral, peroral, enteral, sublingual, bucal, retal, vaginal, intranasal, conjuntival, auricular, pulmonar, pericutânea e transdérmica) e administração por injeção (intravenosa, intrarterial, intracardiaca, intramuscular, intracutânea, subcutânea, intrarticular e intratecal). A via intravenosa é uma das mais importantes, permite administração rápida e infusão contínua e gera resposta clínica rápida uma vez que os fármacos não têm que ser absorvidos. Por outro lado, pode causar dor, aumenta o risco de efeitos colaterais e exige administração lenta e fármacos solúveis. Já a via oral é muito conveniente e econômica, sendo geralmente a mais segura. Contudo, requer a colaboração do paciente e é potencialmente incorreta e errática para fármacos pouco solúveis, absorvidos lentamente, instáveis ou intensamente metabolizados pelo fígado e/ou intestino delgado. Os critérios para a escolha da via de administração são o acesso ao sítio de ação, os tempos de início e duração do efeito desejado, as condições do paciente e sua aceitação e a biodisponibilidade proporcionada pela via. Entre a administração de um fármaco e sua absorção, compreende-se a fase biofarmacêutica, a qual engloba a desintegração da forma farmacêutica e a dissolução do fármaco no local de administração (Gibaldi & Perrier, 1982).

Entende-se por parâmetros cinéticos a absorção, a distribuição, a metabolização e a excreção do agente terapêutico, todos envolvendo a passagem através de membranas plasmáticas. Assim, são importantes propriedades de um fármaco seu tamanho, o formato da molécula, a solubilidade no local de absorção, o grau de ionização e a lipossolubilidade relativa das formas ionizada e não-ionizada. As membranas plasmáticas são constituídas por proteínas inseridas em uma camada dupla de fosfolipídios anfóteros, cujas cadeias de hidrocarbonetos orientadas para dentro formam uma fase hidrofóbica contínua. A fluidez e a flexibilidade, a resistência elétrica e a semi-permeabilidade são conferidas às membranas plasmáticas pela movimentação lateral dos fosfolipídios. As proteínas, por sua vez, atuam como receptores que desencadeiam vias de sinalização elétricas ou químicas, servindo como alvos seletivos para as ações dos fármacos, que atravessam as membranas por processos passivos ou mecanismos ativos (Goodman-Gilman, 2003).

O principal processo passivo de passagem pelas membranas é o de difusão, que segue o gradiente de concentração de um fármaco em função da sua solubilidade na bicamada lipídica. Fármacos não-eletrolíticos livres atingem um estado de equilíbrio que se caracteriza por concentrações iguais dos dois lados da membrana. O equilíbrio de compostos iônicos depende das diferenças de pH através da membrana, dada a influência sobre o estado de ionização da molécula e o gradiente eletroquímico do íon. Em relação ao transporte ativo, a seletividade, a inibição competitiva, a necessidade de energia, a saturabilidade e o gradiente eletroquímico são os principais fatores presentes (Goodman-Gilman, 2003).

O início da fase farmacocinética dá-se com o processo de absorção (quando da administração por vias que dispõem o fármaco em locais onde este necessita ser absorvido),

que considera a quantidade de um fármaco que deixa seu local de administração e o grau em que isto ocorre. A razão entre a quantidade de um fármaco que atinge a corrente circulatória após absorção quando administrado por uma via de administração qualquer e a quantidade de um fármaco disponibilizada na corrente circulatória por administração intravenosa para doses iguais denomina-se biodisponibilidade. Este parâmetro é utilizado para indicar o quanto de um fármaco atinge seu local de ação. A escolha da via de administração de um medicamento deve considerar fatores anatômicos, fisiológicos e patológicos, além de fatores específicos que modificam a absorção, pois todos podem influenciar na biodisponibilidade (Gibaldi & Perrier, 1982).

A absorção de fármacos administrados por via oral é afetada por fatores que interferem na velocidade de esvaziamento gástrico, por exemplo. Alimentos gordurosos, muito frios ou muito quentes diminuem a velocidade de esvaziamento do estômago, enquanto que pH gástrico elevado, jejum e ingestão de líquidos a aumentam. Manter-se em pé ou em movimento, assim como estados psicológicos de excitação também aumentam a velocidade de esvaziamento gástrico. A interação com outros fármacos pode causar qualquer dos dois efeitos. Para aumentar a velocidade de absorção, pode-se diminuir o tamanho das partículas, usar um sal do fármaco, assim como as formas amorfas e anidras, ou ainda controlar o pH das formulações farmacêuticas (Gibaldi & Perrier, 1982).

Após absorção ou administração intravenosa, os fármacos podem distribuir-se para os líquidos intersticial e celular. Órgãos bem perfundidos recebem grande parte de um fármaco nos primeiros minutos, enquanto que a oferta a tecidos menos irrigados é mais lenta, podendo ser necessário de vários minutos a horas para que seja atingido o estado de equilíbrio estável. Uma segunda fase de distribuição é ditada pela lipofilia do fármaco, já

que fármacos lipofílicos transitam com mais facilidade através das membranas plasmáticas. A distribuição também é afetada pela ligação dos fármacos a proteínas plasmáticas, em especial à albumina para fármacos ácidos e a glicoproteína α_1 -ácida para fármacos básicos, e a eritrócitos, o que dificulta o acesso às células (Gibaldi & Perrier, 1982). A distribuição dá noção da afinidade do fármaco pelos tecidos e pelas proteínas plasmáticas. O volume de distribuição é a razão entre a dose e a concentração sistêmica de um fármaco. É a medida de extensão da distribuição, não sendo, no entanto, uma medida fisiológica. Quanto maior o volume de distribuição, menos concentrado está o fármaco no sangue (Gibaldi & Perrier, 1982).

A metabolização consiste no tratamento bioquímico dado ao fármaco pelo organismo com o objetivo de formar compostos polares, facilitando a conjugação e a excreção. A biotransformação do agente terapêutico pode passar por reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise) e fase II (conjugação). O metabolismo dos fármacos pode ser afetado pelas diferenças entre espécies e indivíduos, pela idade, ritmo biológico e gravidez e pelo estado nutricional, fatores ambientais, anomalias genéticas e fatores patológicos. Um fármaco ativo pode ser biotransformado em um metabólito ativo, inativo ou em um intermediário reativo; um fármaco inativo pode ser biotransformado em um metabólito ativo. O fenômeno de indução enzimática tem duas possíveis proveniências: a auto-indução ocorre quando a própria presença do fármaco induz seu metabolismo enzimático, a indução externa é causada pela presença de outra molécula que aumenta a metabolização do fármaco. Em face disto, faz-se necessário um ajuste de dose. De forma oposta, a inibição enzimática também interfere na metabolização dos agentes. O efeito de

primeira passagem caracteriza-se pela metabolização do fármaco antes da sua chegada à corrente circulatória e é evitado pela administração intravenosa (Gibaldi & Perrier, 1982).

A excreção é a eliminação do agente terapêutico. Sua principal via é a renal, também ocorrendo pelas vias biliar, intestinal, pulmonar, salivar e sudorípara. Os mecanismos envolvidos na via renal são a filtração glomerular, a secreção tubular ativa e a reabsorção tubular. Na via biliar, ocorre transporte ativo, difusão passiva e pinocitose, enquanto que na via fecal, difusão passiva e secreção biliar. A difusão passiva é o mecanismo das demais vias. Nos rins, as cápsulas de Bowman fazem a filtração de moléculas pequenas, no túbulo proximal ocorre a secreção ativa de eletrólitos fracos e no túbulo distal se dá o transporte passivo de fármacos lipofílicos; em ambos os tubos há reabsorção de água. A filtração glomerular excreta moléculas de baixo peso molecular, ou seja, somente fármacos livres. Sua capacidade de depuração é de 110 a 130 mililitros por minuto, sendo a maior parte da água reabsorvida e os fatores que a afetam são o fluxo urinário e a ligação dos fármacos a proteínas plasmáticas. A secreção tubular constitui-se no transporte ativo de fármacos, principalmente os ácidos fracos. Está sujeita à competição por moléculas diferentes e sua capacidade de depuração é de cerca de 650 mililitros por minuto, também caracterizada por reabsorção da maior parte da água. A reabsorção tubular é um processo passivo, fármacos lipofílicos e/ou não-ionizados podem ser reabsorvidos no túbulo distal. O pH da urina influencia na taxa de reabsorção do fármaco, pois altera seu grau de ionização. Fármacos ácidos são mais reabsorvidos quando a urina está ácida, fármacos alcalinos, quando a urina está alcalina (Gibaldi & Perrier, 1982).

O *clearance*, ou depuração, é a capacidade do organismo de eliminar o fármaco, ao passo que o tempo de meia-vida dita quanto tempo leva para a concentração inicial do

fármaco na corrente circulatória ser reduzida à metade. Quanto maior a meia-vida, menor o *clearance*. Esses parâmetros estão relacionados à dose, via de administração, forma farmacêutica e às características próprias do fármaco administrado (Gibaldi e Perrier, 1982).

Farmacodinâmica

A farmacodinâmica é o estudo dos mecanismos de ação dos fármacos e dos seus efeitos bioquímicos e fisiológicos. O delineamento das relações químicas e/ou físicas entre os fármacos e seus alvos endógenos permite a caracterização do leque de atuação e de toda a seqüência de ações de cada fármaco. Desta forma, obtêm-se informações fundamentais para a compreensão da regulação bioquímica e fisiológica em resposta aos fármacos, proporcionando as bases para o uso terapêutico lógico e o desenvolvimento de agentes melhores (Goodman-Gilman, 2003). A ação de grande parte dos fármacos ocorre através da ligação a receptores endógenos.

Receptor é o termo utilizado para designar o componente do organismo com o qual os agentes interagem, sendo assim caracterizados seus mecanismos de ação. Qualquer macromolécula do organismo pode ser um receptor, o que traz a compreensão de que os fármacos não criam efeitos e sim modulam funções e de que um fármaco é potencialmente capaz de alterar a taxa em que uma função orgânica se processa. Duas funções são apontadas para os receptores, a ligação ao agente e a propagação da mensagem, cada uma vinculada a pelo menos um domínio estrutural. Um receptor atua diretamente no seu alvo celular, a proteína efetora, ou ativa moléculas intermediárias, os transdutores, formando, em qualquer um dos casos, o sistema receptor-efetor, também denominado via de transdução de sinal. A proteína efetora pode continuar propagando o sinal através de um segundo

mensageiro. Os receptores fisiológicos atuam de maneira catalítica, funcionando como amplificadores de sinais bioquímicos (Goodman-Gilman, 2003).

A maioria dos receptores são proteínas. As principais famílias de receptores são a das proteínas cinases, a dos receptores com outras atividades enzimáticas, a dos canais iônicos, a dos receptores acoplados a proteína g e a dos fatores de transcrição. Todos os tipos de interação (iônicas, covalentes, de van der Waals e pontes de hidrogênio) estão envolvidos na relação fármaco-receptor, sendo determinantes da duração e da reversibilidade. Diversos fármacos, porém, não interagem com macromoléculas. Alguns atuam por mecanismos químicos mais clássicos, interferindo em equilíbrios ácido-base e osmolaridade, por exemplo. Outros são análogos estruturais de substâncias químicas biológicas, propriedade denominada de mecanismo de incorporação forjada (Goodman-Gilman, 2003).

Os receptores não só participam da regulação das funções fisiológicas e bioquímicas como também estão sujeitos a controles reguladores e homeostáticos. O fenômeno de dessensibilização ocorre quando a oferta do agente estimula a redução da sensibilidade ou do número de receptores, resultando em uma resposta endógena menor a uma dose igual. A dessensibilização homóloga afeta apenas as respostas desencadeadas pelo receptor estimulado, enquanto que a heteróloga age em vários receptores ou em uma via comum a muitos receptores (Goodman-Gilman, 2003). Tolerância é a necessidade de se aumentar a dose para obter o mesmo efeito. A sensibilização de receptores ocorre na baixa oferta do agente, o organismo pode aumentar a sensibilidade ou o número de receptores (Gibaldi e Perrier, 1982).

Agonistas são agentes que interagem com receptores simulando os efeitos de compostos reguladores endógenos. Moléculas que, ao invés de simularem, impedem a ligação de outros compostos assim inibindo sua ação são chamados de antagonistas. Uma classificação mais complexa, baseada na relação entre as formas ativa e inativa dos receptores, divide o comportamento dos agentes em agonistas, agonistas parciais, antagonistas competitivos e antagonistas negativos. De acordo com os postulados da quantificação das interações fármaco-receptor, os receptores encontram-se em um equilíbrio entre suas formas ativa e inativa. Um agonista é capaz de amplamente deslocar este equilíbrio para uma maior concentração de receptores ativos. Um deslocamento no mesmo sentido, porém não tão intenso quantitativamente, é gerado pelos agonistas parciais. Os antagonistas competitivos ligam-se igualmente às duas formas, enquanto que os antagonistas negativos deslocam o equilíbrio no sentido de aumentar a concentração de receptores inativos, sendo, assim, também denominados de agonistas inversos. Antagonistas competitivos caracterizam-se por ligação reversível ao receptor, aumentando-se a concentração do agonista, volta-se a atingir o efeito máximo. Antagonistas não competitivos ligam-se aos receptores irreversivelmente, impedindo que se alcance o efeito máximo de um agonista independentemente das concentrações. A estrutura química de um fármaco determina a afinidade por seu receptor e sua atividade intrínseca (Goodman-Gilman, 2003).

Apesar de os dados obtidos por parâmetros farmacológicos auxiliarem a prever o comportamento de um fármaco, existem variações na resposta individual. Estas devem-se à influência de fatores genéticos que atuam nas diferentes fases da farmacoterapia. A farmacogenômica constitui-se na análise genética utilizada para prever a resposta, a eficácia

e a toxicidade dos fármacos (Roses, 2004). O estudo de alelos variantes possibilita a identificação de polimorfismos em genes que codificam proteínas envolvidas nos processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção dos fármacos, assim como nos seus receptores e mediadores de resposta. A farmacogenômica visa possibilitar a individualização da farmacoterapia (Liggett, 2004).

Integração entre terapia gênica e farmacologia

A análise conjunta das informações relativas à concentração dos fármacos nos tecidos em função do tempo, fornecidos pela farmacocinética, e dos dados referentes ao efeito dos agentes em relação à sua concentração, disponibilizados pela farmacodinâmica, constitui a modelagem farmacocinética-farmacodinâmica. Concretiza-se, assim, a descrição matemática da relação efeito farmacológico versus tempo em função da variação das concentrações do fármaco no local de ação após administração de determinada dose. Esta modelagem permite analisar dados de farmacocinética e farmacodinâmica de modo integrado, permitindo a interpolação de dados; comparar racionalmente as propriedades farmacológicas de diversos fármacos da mesma classe terapêutica; compreender as variabilidades cinética e dinâmica, podendo, assim, determinar-se a variabilidade clínica; prever concentrações e efeitos para posologias ainda não estudadas; extrapolar outras situações como, por exemplo, prever perfis de efeito por tempo após dose múltipla baseando-se em dados de dose simples (Venitz et al, 2000).

Uma vez que os vetores de clonagem são os agentes terapêuticos em terapia gênica, pode-se considerá-los equivalentes às formulações farmacêuticas, assim traçando paralelos

que culminam na possibilidade de adaptar as abordagens de farmacologia ao estudo da terapia gênica. O material genético de interesse corresponderia ao pró-fármaco e a proteína expressa, ao fármaco, uma vez que esta é a substância ativa terapeuticamente. Os demais elementos presentes nos plasmídios, como os promotores e sítios de poliadenilação, seriam equivalentes aos adjuvantes, pois também fazem parte do preparo do produto.

A atividade do gene é dependente da seqüência promotora, que regula a sua taxa de transcrição. Por isso, o promotor do gene de interesse está intimamente relacionado à biodisponibilidade da proteína expressa. Os promotores podem apresentar especificidade em relação aos tecidos e a outras proteínas regulatórias. Promotores que não apresentam especificidade promovem a expressão do gene de interesse em qualquer tecido alcançado pelo vetor de transferência em qualquer situação. A especificidade dos promotores se faz necessária de acordo com a situação. Por exemplo, um promotor somente específico para o tecido hepático atuaria em hepatócitos em geral, ao passo que promotores específicos apenas para tumores atuariam em células cancerosas de qualquer tecido. Já um promotor específico para o tecido hepático e para células de tumor, promoveria a expressão do gene de interesse somente em hepatócitos cancerosos (Chyung et al, 2003).

A relação entre a dose do material genético de interesse e as concentrações tanto do vetor de transferência quanto da proteína expressa nos tecidos proporciona informações da farmacocinética deste agente terapêutico. Dados relacionando um efeito mensurável da proteína expressa com a sua concentração permitem a compreensão da farmacodinâmica envolvida. Assim, modelagens matemáticas de farmacocinética-farmacodinâmica também podem ser obtidas para terapia gênica, contribuindo para o alcance de tratamentos racionais.

Pretende-se, nesse estudo, iniciar uma adaptação das abordagens da farmacologia ao estudo de vetores não virais em terapia gênica. Para isso, optou-se pelo uso de lipossomos catiônicos como método não viral de transferência gênica, em específico, *LipofectamineTM2000* da Invitrogen. O material genético de interesse empregado codifica uma proteína marcadora de fácil detecção, a GFP (*Green Fluorescent Protein*). A expressão deste gene ocorre sob a ação de um promotor de citomegalovírus, que, teoricamente, possibilita sua expressão em diferentes tecidos. Estes elementos fazem parte de um plasmídeo comercial denominado *pTracer* (Invitrogen). O sistema *pTracer/LipofectamineTM2000* foi estudado em células aderentes derivadas de hepatoblastoma (linhagem HepG2) em cultura.

O presente estudo tem como objetivos padronizar a detecção de GFP por fluorimetria e determinar o tempo de expressão máxima dessa proteína em cultura de células HepG2, obtendo-se, assim, um método quantitativo para avaliação da eficiência de transfecção de vetores e parâmetros de tempo para futura detecção da GFP *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, T. M.; Chonn, A. (1987) Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial-system. *FEBS lett* 223:42-6.
- Allen, T. M.; Hansen, C.; Rutledge, J. (1989) Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticoendothelial and other tissues. *Biochem. Biophys Acta* 981:27-35.
- Anderson, F. (2000) The best of times, the worst of times. *Science* 288:679-629.
- Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen Jr, L. V.; (ed.) **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo, Editorial Premier, 2000.
- Biltonen, R. L.; Lichtenberg, D. (1993) The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chem. Phys. Lipids* 64: 129-42.
- Bonté, F.; Juliano, R. L. (1986) Interactions of Lipossomes with serum proteins. *Chem. Phys. Lipids* 40:359-72.
- Chonn, A.; Cullis, P.R. (1995) Recent advances in liposomal drug-delivery systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708.
- Chyung, Y.H.; Peng, P.D., Kay, M.A. (2003) system for simultaneous tissue-specific and disease-specific regulation of therapeutic gene expression. *Human Gene Therapy.* 14:1255-1264.
- Cohen-Haguenaer, O. **La Thérapie Génique**. Paris, Editions Médicales Internationales, 2001.
- Davidson, J.; Jorgensen K.; Andresen, T. L.; Mouritsen, O.G. (2003) Secreted phospholipase A2 as a new enzymatic trigger mechanism for localized liposomal drug release and absorption in diseased tissue. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609:95-101.
- Ellens, H.; Mayhew, E.; Rustum, Y. M. (1982) Reversible depression of the reticoendothelial system by liposomes. *Biochem. Biophys Acta* 714:479-85.
- Gibaldi, M.; Perrier, D. **Pharmacokinetics**, 2^a ed., New York, Denker, 1982.
- Goodman-Gilman, A.; Limbird, L.E.; Hardmann, J. (2003) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Ed McGraw-Hill Interame. 1671 pp.
- Honigman, A.; Zeira, E.; Ohana, P.; Abramovitz, R.; Tavor, R.; Bar, I.; Zilberman, Y.; Rabinovsky, R.; Gazit, D.; Joseph, A.; Panet, A.; Shai, E.; Palmon, A.; Laster, M.; Galun, E. (2001) Imaging transgene expression in live animals. *Mol Ther* 4:239-249.
- Hsu, C.; Boysen, M.; Gritton, L.D.; Frosst, P.D.; Nemerow G.R.; Von Seggern, D.J. (2005)

- Hwang, K. J.; Padki, M.M.; Chow, D. D.; Essein, H. E.; Lai, J. Y.; Beaumier, P.L. (1987) Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues. *Biochem. Biophys Acta* 901:99-96.
- In vitro dendritic cell infection by pseudotyped adenoviral vectors does not correlate with their in vivo immunogenicity. *Virology* 5;332(1):1-7.
- Kolokoltsov, A.A.; Weaver, S.C.; Davey, R.A. (2005) Efficient functional pseudotyping of oncoretroviral and lentiviral vectors by Venezuelan equine encephalitis virus envelope proteins. *J Virol.* 79(2):756-63.
- Lasic, D. (1988) The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* 256:1-11
- Lemoine, N.R. (ed.) **Understanding gene therapy**. London, Bios Scientific Publishers, 1999.
- Liggett, B.T. (2004) Genetically modified mouse models for pharmacogenomic research. *Nature Rev. Genet.* 4: 937-947
- Matte, U.; Giugliani, R. Terapia Gênica – Aspectos Técnicos in: Binsfeld, P. C.. Biossegurança em Biotecnologia . 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. v. 1. 309p.
- Pardridge, WM. (2003) Gene targeting in vivo with pegylated immunoliposomes. *Methods Enzymol* 373:507-28.
- Park, Y.M.; Woo, S.; Lee, G.T.; Ko, J.Y.; Lee, Y.; Zhao, Z.S.; Kim, H.J.; Ahn, C.W.; Cha, B.S.; Kim, K.S.; Park, C.W.; Lee H.C. (2005) Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *J Gene Med.* Jan 13; [Epub ahead of print]
- Perrie, Y.; Frederik, P. M.; Gregoriadis, G. (2001) Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. *Vaccine* 19:3301-10.
- Puisieux, P.F. (1983) Les liposomes *Ann. Pharm. Fr.* 41:3-13.
- Remington, J.P.; **The Science and Practice of Pharmacy**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
- Roses, D.A. (2004) Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nature Rev. Genet.* 5:645-56.
- Sharma A.; Sharma, U.S. (1997) Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154:123-40.
- Steele, F. (2000) Gene Therapy on the RAC. *Mol Ther* 1:1-2.

- Strayer, D.S. (1998) Viral vectors for gene therapy: Past, present and future. *Drug News Perspect.* 11(5):277-86.
- Tyrrel, D. A.; Heath, T. D.; Colley, C. M.; Ryman, B. E. (1976) News aspects of liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 457:259-302.
- Van Zanten, J.; Doornbos-Van der Meer, B.; Audouy, S.; Kok, R.J.; de Leij, L. (2004) A nonviral carrier for targeted gene delivery to tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 11(2):156-64.
- Vemuri, S.; Rhodes, C. T. (1994) Separation of liposomes by a gel filtration chromatographic technique: a preliminary evaluation. *Pharm. Acta. Helv.* 69:107-13.
- Venitz, J.; Derendorf, H.; Lesko, L.J.; Chaikin, P.; Colburn, W.; Lee, P.; Miller, R.; Powell, R.; Rhodes, G.; Stanski, D. (2000) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Drug Research and Development. *Journal of Clinical Pharmacology* 40-12:1399-418.
- Villanova, J. C. O.; Consiglieri, V. O. (1999) Lipossomos como transportadores de fármacos. Partel. Aplicações farmacêuticas, composição, propriedades e farmacocinética – revisão. *Lecta* 17(2):69-85.
- Wasan, K.M.; Morton, R.E.; Rosenblum, M.G.; Lopez-Berestein, G. (1994) Decreased toxicity of liposomal anphotericin B due to association of anphotericin B with high density lipoproteins: role of lipid transfer protein. *J. Pharmac. Sci.* 83(7):1006-10.
- Wasan, K.M.; Rosenblum, M.G.; Cheung, L.; Lopez-Berestein, G. (1994) Influence of lipoprotein on renal citotoxicity and antifungal activity of anphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(2):223-7.
- www.invitrogen.com
- www.wiley.co.uk/genetherapy.
- Yi, Y.; Hahm, S.H.; Lee, K.H. (2005) Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. *Curr. Gene Ther.* 5(1):25-35.
- Zaha A et al. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre, Mercado Aberto, 1996.

Gene therapy and drug therapy – a yet poorly explored relationship

AC Burlamaque-Neto^{1,2}, T Dalla Costa³, U Matte¹, R Giugliani^{1,2}.

1- Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2- Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Básicas da Saúde: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Correspondence to:

Antônio Carlos Burlamaque Neto

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Centro de Pesquisas, 1º andar, Centro de Terapia Gênica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre – RS – Brasil CEP 90035-903

Tel: 51 2101-8838 Fax: 51 2101-8010

antonioburlamaque@hotmail.com

Running title: Gene therapy versus drug therapy

Key words: gene therapy, drug therapy, transference vector, pharmaceutical dosage form, pharmacology

ABSTRACT

Drugs are the therapeutic agents in conventional pharmacological therapies. Medicines are composed by drugs, molecules that exert the therapeutic activity, and excipients. Combinations between drugs and excipients are called pharmaceutical dosage forms. Gene therapy has been developed as a new therapeutic approach. Its principle is based on the transference of genetic material to an individual's cell aiming a therapeutic benefit by correcting an abnormality. Therefore, the therapeutic agent at issue is the genetic material of interest, which has to be introduced into vectors. Other components of transference vectors are promoters and poliadenilation sites (gene expression elements). It is possible to correlate these types of therapies, specially pharmaceutical dosage forms and transference vectors. Drugs can be compared to genes of interest since both are the therapeutic active components. Excipients and gene expression elements are analogous because they are used as adjuvants to aid in product preparation. Finally, transference vectors would correspond to pharmaceutical dosage forms in the sense that both are the final products. Comparison between gene therapy and drug therapy can bring many contributions to the technical development that is still necessary for gene therapy to become a widely available form of treatment.

In conventional pharmacological therapies, the therapeutic agents are drugs. A drug is a molecule responsible for the main activity of a given medication in a biological system, that is, the active substance. Other agents are called excipients, non therapeutic components such as diluents, suspensor agents, thickening agents, coatings, desintegrants, stabilizers, preservatives, coloring agents and sweeteners. Combination between drugs and excipients is called pharmaceutical dosage form (Remington, 2000). According to the administration route, pharmaceutical dosage forms are appropriately prepared as tablets, capsules, injectables, suppositories, ointments, aerosols or others, facilitating the administration of drugs. Drugs must be released from pharmaceutical dosage forms in appropriate amounts and rate to assure desirable beginning and duration of pharmacological action (Ansel et al, 2000).

After the discovery of a new drug and the characterization of its physical and chemical properties, a large amount of pharmacological information must be obtained. The mechanism of drug action and appropriate dosage must be determined, as well as its minimal effective concentration and minimal toxic concentration, in order to establish the therapeutic window. The rate of drug absorption, pattern of distribution and levels in different tissues, site and duration of action also require careful investigation. Moreover, it is necessary to elucidate the metabolic degradation of the drug and the activity of all its metabolites, just as the pathway and the rate of clearance (Goodman-Gilman, 2003).

Pharmacokinetics studies provide information regarding concentration of drugs at different tissues as a function of time while data about the effect caused by a drug in relation to its concentration at the site of action becomes available through pharmacodynamics studies. Combined analysis of pharmacokinetics and

pharmacodynamics offers mathematical models that can describe the relationship between pharmacological effect throughout time in relation to concentration at the site of action. Such models allow rational comparison of related drugs, prediction of clinical variability as a consequence of pharmacological variability, and prediction of concentration and effect of yet not studied variables such as dosages and administration routes (Venitz et al, 2000).

Gene therapy was first accomplished in humans in 1990 by French Anderson, Steven Rosemberg, and Michael Blaese as treatment for an immune genetic disease – deficiency of Adenosine Deaminase (ADA). Transference of genetic material to an individual's cells aiming a therapeutic benefit by correcting an abnormality is the essence of gene therapy. Its principle is based on the knowledge that some diseases are caused by defects in one or more genes, leading to uncontrolled production or suppression of a protein that is essential to cell functions (Anderson, 2000). Monogenic disease (such as inborn errors of metabolism), cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders, and acquired diseases (infectious, for example) are all gene therapy targets (Lemoine, 1999).

In gene therapy, the therapeutic agent at issue is the genetic material of interest. In order to administrate and deliver such agent, it has to be introduced into vectors. The construction of a vector initiates by obtaining cDNA from the gene of interest, which could be the therapeutic gene itself or a marker gene, depending on the assay. The gene of interest needs to be placed close to elements that can regulate its expression, such as promoters and poliadenilation sites. Regulatory elements and the gene of interest are cloned into an expression plasmid, which is then used for the construction of viral and non-viral transference vectors (Cohen-Haguenaer, 2003).

It is possible to correlate drug therapy and gene therapy, specially pharmaceutical dosage forms and vectors, as shown on Table 1. Vectors cannot be directly compared to drugs since their therapeutic activity does not depend exclusively on the presence of the vector at the target tissue but also on gene expression. However, while the final effect of a medication could be influenced by excipients, vectors are influenced by promoters and both drugs and vectors can be affected by immunological response. If one tries to correlate the composition of a pharmaceutical dosage form and that of a transference vector, one could think that the gene of interest would correspond to the pro-drug and the expressed protein to the drug, since it constitutes the therapeutic active component. Other structures in plasmids, such as promoters and poliadenilation sites, would be equivalent to excipients for pharmaceutical dosage forms because both components are used as adjuvants to aid in product preparation. As a consequence, a transference vector as a whole would correspond to a pharmaceutical dosage form.

The relationship between vector dosage and concentrations of both vectors and expressed protein at tissues as a function of time provides pharmacokinetics information of the therapeutic agent. Data relating a measurable effect of the expressed protein to its concentration allows comprehension of the pharmacodynamics involved. Thus, pharmacokinetics-pharmacodynamics mathematical models can also be obtained for gene therapy, contributing to reaching rational procedures.

The initial euphoria about rapid applications of gene therapy was gradually substituted by cautiousness and evidence that its effective development is technically much more demanding than originally predicted. It is necessary to refine expression vectors and gene transference methods available today in order to increase transference efficiency and levels of gene expression, in addition to reduce immunogenicity (Steele, 2000). Another important issue, although yet poorly studied, is the pharmacological

disposal parameters of transference methods in organisms (Honigman et al, 2001). Since most of the studies use the intravenous route, absorption is assumed to be 100%. Because components of nucleic acids are not aliens to organism, they are metabolized and recycled instead of eliminated like most drugs and its metabolites. Most published articles, therefore, evaluate only the biodistribution of the vector at issue (Ishiwata et al, 2000; Pan et al, 2002). Comparison between gene therapy and drug therapy can bring many contributions to the technical development that is still necessary for gene therapy to become a widely available form of treatment.

REFERENCES

- Anderson F. (2000) The best of times, the worst of times. *Science* 288:679-629.
- Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen Jr, L. V.; (ed.) **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. São Paulo, Editorial Premier, 2000.
- Goodman-Gilman, A.; Limbird, L.E.; Hardmann, J. (2003) *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Ed McGraw-Hill Interame. 1671 pp.
- Venitz J.; Derendorf H.; Lesko L.J.; Chaikin P.; Colburn W.; Lee P.; Miller R.; Powell R.; Rhodes G.; Stanski D. (2000) Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Drug Research and Development. *Journal of Clinical Pharmacology* 40-12:1399-418.
- Cohen-Haguenaer, O.; **La Thérapie Génique**. Paris, Editions Médicales Internationales, 2001.
- Honigman A, Zeira E, Ohana P, Abramovitz R, Tavor R, Bar I, Zilberman Y, Rabinovsky R, Gazit D, Joseph A, Panet A, Shai E, Palmon A, Laster M, Galun E. (2001) Imaging transgene expression in live animals. *Molecular Therapy* 4:239-249.
- Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, Kikuchi H, Kitagawa T. (2000) Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *Journal of Controlled Release* 69:139-148.
- Lemoine, N.R.; (ed.) **Understanding gene therapy**. London, Bios Scientific Publishers, 1999.
- Pan D, Gunther R, Duan W, Wendell S, Kaemmerer W, Kafri T, Verma I, Whitley C. (2002) Biodistribution and Toxicity Studies of VSVG-Pseudotyped Lentiviral Vector after Intravenous Administration in Mice with the Observation of in Vivo Transduction of Bone Marrow. *Molecular Therapy* 6:19-29.
- Remington, J.P.; **The Science and Practice of Pharmacy**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
- Steele F. (2000) Gene Therapy on the RAC. *Molecular Therapy* 1:1-2.

LEGEND

Table 1. Comparison between drug therapy and gene therapy.

	Drug therapy	Gene therapy
	Pro-drug	Gene of interest (therapeutic gene, marker gene, etc)
Therapeutic active components	Drugs (analgesics, antibiotics, etc)	Expressed protein
Other components	Excipients (diluent, preservatives, etc)	Gene expression elements (promoters, poliadenilization site, etc)
Final product	Pharmaceutical dosage forms (tablets, injectables, capsules, etc)	Transference vectors (retroviral, adenoviral, liposomal, etc)

Detection of GFP by fluorescence spectrophotometry

AC Burlamaque-Neto ^{1,2}, GR dos Santos ¹, M Burin ³, U Matte ¹, R Giugliani ^{1,2,3}.

1- Centro de Terapia Gênica, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2- Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Básicas da Saúde: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3- Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Correspondence to:

Antônio Carlos Burlamaque Neto

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Centro de Pesquisas, 1º andar, Centro de Terapia Gênica

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre – RS – Brasil CEP 90035-903

Tel: 51 2101-8838 Fax: 51 2101-8010

antonioburlamaque@hotmail.com

Running title: Fluorescence spectrophotometry for GFP

Key words: gene therapy, transference vector, GFP, fluorescence spectrophotometry

ABSTRACT

Gene therapy has become a field of intense research. Transferring of genetic material allows different therapeutic approaches and requires its introduction into viral and non viral vectors such as liposomes. Physiological events after vector administration, however, interfere on the final rates of gene expression. Since genetic material is disposed as the actual therapeutic agent, comprehension of pharmacological parameters such as gene product availability is necessary. Different protocols can be used for studying the efficacy of gene transfer and expression. Fluorescence spectrophotometry allows analysis of entire tissues, including all cell types and wave lengths. We present here semi-quantitative detection of green fluorescent protein (GFP) by fluorescence spectrofotometry after transfection of HepG2 cells using liposomes. It was possible to differentiate transfected and non-transfected cells, as well to compare levels of fluorescence according to time. It shows the feasibility of using spectrophotometry fluorescence for detecting GFP expression in a semi-quantitative way. This may be a useful tool for screening the efficacy of transfection systems, comparing vectors, promoters, and administration routes. It also has the advantage to be uniform for different cell types, which allows the analysis of whole tissues.

INTRODUCTION

The observation that introducing genetic material to an individual's cells could achieve therapeutic benefits by correcting abnormalities or providing new cellular functions has made gene therapy become a field of intense research. Up to 2004, 987 gene therapy clinical trials addressing a large variety of indications have been on course (www.wiley.co.uk/genetherapy). Transferring of genetic material allows different therapeutic approaches, such as compensation of defective or absent genes, increase or reduction in the expression of present genes, sensitization to normally inert pro-drugs and others according to treatment needs (Lemoine, 1999).

Administration and delivery of genetic material requires its introduction into viral or non viral vectors. Microscopic lipid double layers called liposomes are commonly used non viral vectors, specially those containing cationic lipids. Nucleic acids are able to associate to cationic liposomes in and outside lipid vesicles (Chen et al, 2004). Liposomes are used to protect nucleic acids from physiological events such as enzymatic attack and to deliver genetic material to cells (Sharma & Sharma, 1997).

There are several steps between administration of vectors and transfection of genetic material. First, vectors must reach target cells, which can be prevented by plasmatic and extra-cellular matrix proteins. Inside cells, vectors must be released into cytoplasm and transported up to the nucleus; genetic material must be dissociated from vector and cross nuclear membrane. Information on parameters that affect the behavior of vectors *in vivo* is still limited (Cohen-Haguenaer, 2001).

Gene therapy disposes genetic material as the actual therapeutic agent. Comprehension of pharmacological parameters of such agents is necessary in order to establish rational therapeutics (Honigman et al., 2001). It is therefore important to identify the efficacy of transfection systems, which requires analyzing different vectors, promoters, and administration routes in order to determine the bioavailability of gene products at specific target tissues. *In vitro* and *in vivo* assays have been attempting to establish precise protocols. Although a sensitive and specific method for transcriptional products analysis, quantitative PCR does not evaluate translation products (Lee et al, 2004). Immunological methods such as western blot and immune precipitation are adequate to detect proteins by antibody binding. Enzymes can also be measured by activity assays while other products, like structural proteins, cannot be determined directly, demanding previous steps. Fluorescence tagging allows identification of these proteins by the same methods used for fluorescent gene markers. Flow cytometry has been shown to appropriately distinguish between transfected and non transfected cells (Teixeira et al, 2001; Soboleski et al, 2005; Thomas et al, 2005), but it requires singular standardization for every cell type, imposing difficulties when different tissues or tissues with varied cell types need to be analyzed. Fluorescent microscopy, on the other hand, is limited by the large number of slides needed in order to analyze an entire tissue and by difficulties on quantification (Teixeira et al, 2001).

Fluorescence spectrophotometry may be an alternative, since it allows determination of every cell type at any wave length. Another advantage is the possibility of analyzing entire tissues. We present here a protocol for detecting GFP expressed after transfection to HepG2 cells in culture using a fluorescence spectrophotometer.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and culture

HepG2 cells were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, RJ, Brazil-BCRJ). Cells were seeded at a density of approximately 2×10^5 cells per well in 6-well plates (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) in 2 mL of RPMI medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) with 10% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil).

Determination of cellular basal fluorescence

Cells were treated with trypsin for plate detachment, centrifuged at 4°C and 2000 rpm (89 g) for 10 min in order to remove medium, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged again under the same conditions to wash medium residues. Cell concentration (counted on Neubauer chamber) was adjusted to 10^7 cells per mL and subsequent 10-fold dilutions were executed in order to obtain 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 cells per mL suspensions. Fluorescence of each suspension was determined in a F-2000 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), as well as fluorescence of medium with 10% calf serum and PBS solution. Equipment was programmed with GFP's excitation (395 nm) and emission (507 nm) wave lengths.

Transfection procedure

The commercially available pTracer plasmid (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA) contains the GFP-ZeocinTM resistance gene fusion under the control of the human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter, presenting also the ampicillin resistance

gene. Another plasmid, pREP9 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA), was used as fluorescence negative control. Cells were transfected using LipofectamineTM2000 (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 4 µg of plasmid was suspended in 250 µL of RPMI medium, 10 µL of LipofectamineTM2000 (1 mg per mL) was mixed with 240 µL and incubated at room temperature for 5 min. Plasmid and lipid suspensions were mixed, incubated at room temperature for 20 min and added to cells diluted to a total volume of 2 mL per well. After 5 hours, transfection medium was replaced by 2 mL of RPMI medium with 10% fetal calf serum, time started to be counted from this point. Cells were also treated the same manner with LipofectamineTM2000 alone, plasmids alone and nothing but RPMI medium as controls. Different treatments were analyzed in triplicates.

Fluorescence spectrophotometry

After removal of transfection medium, cells were treated with trypsin for plate detachment at times 0, 12, 24, and 48 h, centrifuged at 4°C and 2000 rpm for 10 min in order to remove medium, resuspended in PBS and centrifuged again under the same conditions to wash medium residues. Neubauer chambers were used to count cells and concentration was adjusted to 10⁵ cells per mL. Fluorescence of suspensions was determined in a F-2000 Fluorescence Spectrofotometer (Hitachi). Fluorescence of suspensions containing cells treated with plasmid/LipofectamineTM2000 was also determined by setting the equipment to read the difference between them and cell suspensions treated with LipofectamineTM2000 alone. Equipment was programmed with GFP's excitation (395 nm) and emission (507 nm) wave lengths.

Statistical analysis

Data were compared using ANOVA and Student's T Test for independent samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Fluorescence analysis of medium with 10% calf serum at GFP's excitation and emission wave lengths presented very high values (data not shown). After medium removal, cell pellets were washed with PBS and a second centrifugation step was introduced in order to remove medium residues. Cell suspensions demonstrated basal fluorescence values (fig. 1) similar to PBS (average of 0,202 units of fluorescence, n=9) from concentration of 10^1 to 10^5 cells per mL. Higher concentrations showed considerably higher values of fluorescence and were visually turbid, probably altering equipment's light beam pathway. All of the results below were obtained after diluting cell concentration to 10^5 cells per mL in order to avoid interference of higher concentrations.

Fluorescence of cell suspensions treated with LipofectamineTM2000 alone showed varied results (table 1). Therefore, we decided to obtain fluorescence values of cell suspensions treated with pTracer/ LipofectamineTM2000 not only directly, but also by setting the equipment to read the difference between them and cell suspensions treated with LipofectamineTM2000 alone (table 1), that way crediting the obtained values to GFP. Highest fluorescence value was obtained at 48 hours after removal of transfection medium. Further analysis is necessary to determine when fluorescence value obtained by this method goes down to approximately zero, which would indicate the end of GFP expression by treated cells.

Cells treated with pTracer/ LipofectamineTM2000 showed, in general, higher fluorescence then those treated with naked pTracer after the same period of time (figure 2). At time 0 h, cells treated with pTracer alone were not statistically more fluorescent then those treated with pTracer/ LipofectamineTM2000 ($0,4 > P > 0,2$). At time 12 h, on the other

hand, cells treated with pTracer/ LipofectamineTM2000 were statistically more fluorescent than those treated with pTracer alone ($0,05 > P > 0,02$). These results confirm expectations of better transfection efficacy of DNA associated to liposomes when compared to naked DNA (Perrie et al, 2001).

Cells treated with pTracer and pRep9 alone presented similar results (table 1). Highest fluorescence variation between such treatments was found at time 0 h, but no statistical difference was determined ($0,4 > P > 0,2$). All values obtained for both treatments were also similar to those determined for PBS (data not shown), confirming that plasmid DNA should not cause higher fluorescence than that observed for pure cell suspensions. This also indicates that pTracer alone has low expression efficiency, probably due to low transfection rates, as shown above.

These experiments show the feasibility of using spectrophotometry fluorescence for detecting GFP expression in a semi-quantitative way. It may be a useful tool for screening the efficacy of transfection systems, comparing vectors, promoters, and administration routes. It also has the advantage to be uniform for different cell types, which allows the analysis of whole tissues.

REFERENCES

- Allen, T. M.; Hansen, C.; Rutledge, J. (1989) Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticoendothelial and other tissues. *Biochem. Biophys Acta* 981:27-35.
- Chen, T.; Palmer, L.R. Fenske, D.B.; Lam, A.M.; Wong, K.F.; Cullis, P.R. (2004) Distal cationic poly(ethylene glycol) lipid conjugates in large unilamellar vesicles prepared by extrusion enhance liposomal cellular uptake. *J Liposome Res.* 14(3-4):155-73.
- Cohen-Haguenuer, O. **La Thérapie Génique.** Paris, Editions Médicales Internationales, 2001.
- Honigman A, Zeira E, Ohana P, Abramovitz R, Tavor R, Bar I, Zilberman Y, Rabinovsky R, Gazit D, Joseph A, Panet A, Shai E, Palmon A, Laster M, Galun E. (2001) Imaging transgene expression in live animals. *Molecular Therapy* 4:239-249.
- Lee, J.; Hargest, R.; Wasan, H.; Phillips, R.; K. (2004) Liposome-mediated adenomatous polyposis coli gene therapy: a novel anti-adenoma strategy in multiple intestinal neoplasia mouse model. *Dis Colon Rectum.* 47(12):2105-13.
- Lemoine, N.R. (ed.) **Understanding gene therapy.** London, Bios Scientific Publishers, 1999.
- Perrie, Y.; Frederik, P. M.; Gregoriadis, G. (2001) Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. *Vaccine* 19:3301-10.
- Sharma A.; Sharma, U.S. (1997) Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154:123-40.
- Soboleski, M.R.; Oaks, J.; Halford, W.P. (2005) Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J.* [Epub ahead of print]
- Teixeira, L.A.K.; Fricke, C. H.; Bonorino, B. C.; Bogo, M. R.; Nardi, N. B. (2001) An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. *Journal of Biotechnology* 88:159-65.

Thomas, N.; Kenrick, M.; Giesler, T.; Kiser, G.; Tinkler, H.; Stubbs, S. (2005) Characterization and gene expression profiling of a stable cell line expressing a cell cycle GFP sensor. *Cell Cycle* 29;4(1) [Epub ahead of print]

Vemuri, S.; Rhodes, C. T. (1994) Separation of liposomes by a gel filtration chromatographic technique: a preliminary evaluation. *Pharm. Acta. Helv.* 69:107-13.

www.wiley.co.uk/genetherapy.

Xu, W.M.; Zhang, S.Z.; Qiu, W.M.; He, G.P.; Liu, Y.Q.; Ma, Y.X.; Sun, Y. (2004) Construction of recombinant ZNF230/GFP fused plasmids and their expression and cellular localization. *Yi Chuan.* 26(4):451-4.

LEGENDS

Figure 1: Cellular basal fluorescence. Units of fluorescence (y-axis) attributed to number of cell per mL (x-axis). N= 3

Figure 2: Fluorescence variation of differently treated cells over time. Units of fluorescence (y-axis) of differently treated cells over time (x-axis). N = 3

Table 1: Fluorescence of differently treated cells over time. N=3

* Equip diff – equipment set to read fluorescence difference between cells suspensions treated with plasmid/LipofectamineTM2000 and LipofectamineTM2000 alone.

Figure 1

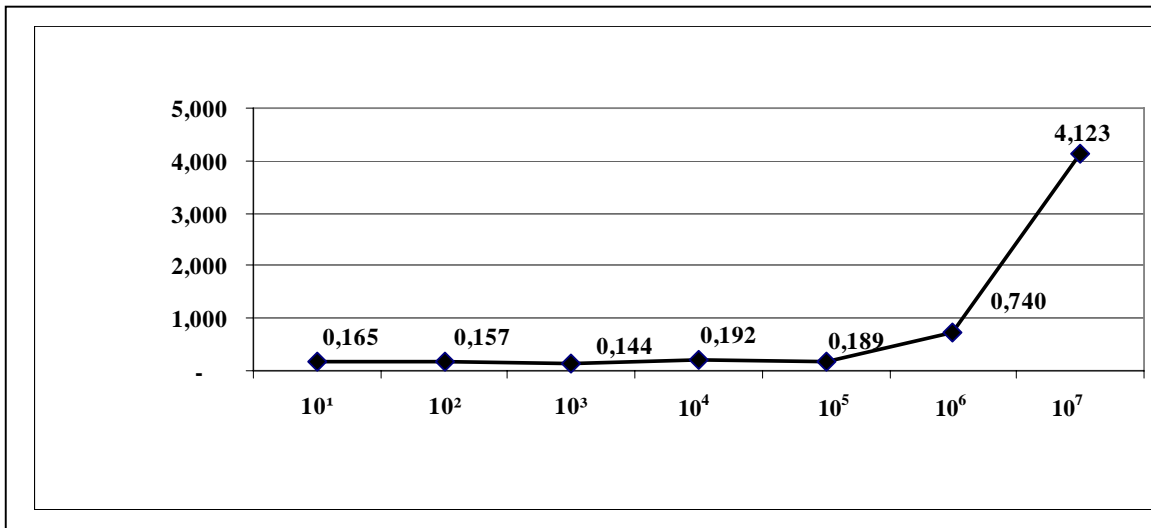


Figure 2

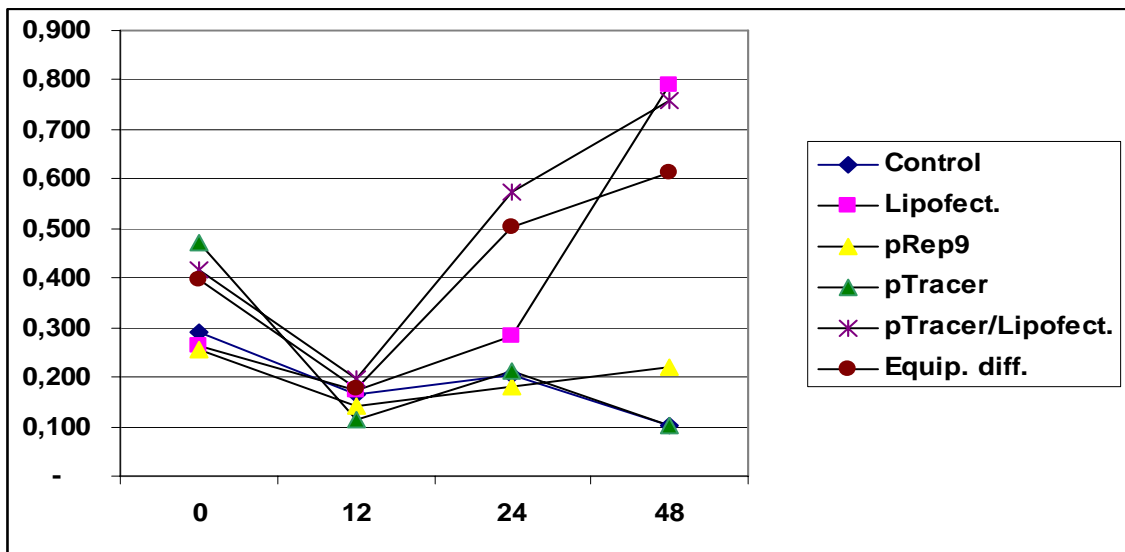


Table 1

Time	Control	Lipofect.	pRep9	pTracer	pTracer/Lipofect.	Equip. diff.*
0	0,290	0,262	0,254	0,473	0,416	0,398
12	0,167	0,173	0,143	0,115	0,196	0,178
24	0,206	0,282	0,179	0,211	0,575	0,505
48	0,102	0,790	0,220	0,103	0,758	0,612

DISCUSSÃO

A terapia gênica foi originalmente teorizada em 1967 por French Anderson, mas somente em 1990 foi realizada pela primeira vez, pelo próprio Anderson, em um ser humano (Matte & Giugliani, 2004). Nos anos seguintes, uma contagiante euforia sobre suas possíveis aplicações fez com que fossem elaboradas as primeiras centenas de ensaios clínicos. O motivo para tal entusiasmo era simples: a maioria das doenças contém algum componente genético, tornando-as, assim, passíveis de serem tratadas ou até curadas por terapia gênica. Contudo, logo se viu que quase nada funcionava e até hoje a terapia gênica não é uma forma de tratamento amplamente difundida (Anderson, 2000).

A morte de um participante em um protocolo de terapia gênica, provavelmente devido à reação imunológica causada por uma alta dose de vetor, fez com que a agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) adotasse critérios ainda mais rigorosos para a aprovação de protocolos. A relação risco-benefício de um protocolo de terapia gênica deve ser muito favorável: a doença em questão deve apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade, não possuir terapias convencionais adequadas, afetar tecidos acessíveis, seu mecanismo fisiopatológico deve ser o responsável pela escolha da estratégia de tratamento e devem ser previamente levantados aspectos referentes à existência de imunidade ao vetor ou à proteína expressa pelo gene terapêutico (Steele, 2000).

As informações sobre os parâmetros que afetam os vetores ainda são muito limitadas, mesmo *in vitro*, onde podem ser mais facilmente estudadas. *In vivo*, há diversas etapas entre a administração de um vetor e a transfecção propriamente dita, das quais os mecanismos são pouco elucidados. Isso faz com que a eficiência de

transfecção, fator indispensável para a terapia racional, ainda não possa ser prevista (Cohen-Haguenauer, 2001). Desta forma, parece lógico pensar que a execução de protocolos clínicos exige prévio aprimoramento técnico dos vetores de transferência gênica. As análises de diferentes vetores, promotores e vias de administração são necessárias para determinar a biodisponibilidade dos produtos gênicos e elucidar os parâmetros farmacológicos do material genético terapêutico e seus veículos (Honigman et al., 2001). A ausência destas informações explica porque ainda não há produtos comercializáveis para terapia gênica aprovados pelo FDA (www.fda.gov).

O presente estudo cumpre o objetivo de iniciar uma adaptação das abordagens da farmacologia à terapia gênica ao buscar a disponibilização de um método de detecção para um produto gênico. A obtenção do material genético de interesse, sua associação a vetores de transferência, a administração deste sistema às células-alvo e a determinação da proteína expressa constituem as etapas do processo de transfecção *in vitro*.

A GFP é uma proteína marcadora, não apresentando função terapêutica. É amplamente utilizada devido à possibilidade de detecção distinta na cor verde em pico de emissão a 507 nm após excitação a 395 e 478 nm. No plasmídeo comercial *pTracer* (Invitrogen), o gene que a codifica encontra-se sob controle do promotor de Citomegalovírus, o que possibilita, teoricamente, sua expressão em qualquer tecido. A expressão da GFP em células HepG2 foi qualitativamente observada por nós através de microscopia de fluorescência.

O lipossomo comercial *LipofectamineTM2000* (Invitrogen) apresenta, de acordo com seu fabricante, eficiência de transfecção comprovada em cultura de diferentes tipos celulares (www.invitrogen.com). Não há relatos, contudo, de sua utilização em células

HepG2, assim como não há relatos, até o momento, da detecção de GFP nesta linhagem celular.

A técnica de espectrofotometria de fluorescência é amplamente utilizada para a detecção de compostos endógenos em materiais biológicos. Sua inclusão em protocolos de determinação de produtos gênicos pode vir a se expandir, uma vez que possibilita a análise de qualquer tipo celular em qualquer comprimento de onda. Além disso, pode-se analisar a totalidade dos tecidos de forma prática mediante homogenizados e o equipamento é de simples manuseio. No caso da identificação da GFP em células HepG2, a espectrofotometria de fluorescência foi capaz de fornecer resultados semi-quantitativos, permitindo a avaliação da eficiência de transfecção de *pTracer* nu e do sistema *pTracer/ LipofectamineTM2000*. O obstáculo imposto pela *LipofectamineTM2000* também emitir fluorescência a 507 nm foi superado com o artifício de zerar o equipamento utilizando-se suspensões celulares tratadas somente com a *LipofectamineTM2000*. Meio de cultura e concentrações celulares maiores que 10^5 células por mL também mostraram-se emissores de fluorescência neste comprimento de onda, o que nos levou a adaptar os procedimentos no sentido de eliminar os resíduos de meio de cultura e ajustar a concentração celular. A utilização do comprimento de onda de 478 nm para excitação da GFP ao invés de 395 nm pode evitar interferentes, sendo uma perspectiva futura. Os ensaios por espectrofotometria de fluorescência para detecção de produtos gênicos após transfecção devem ser expandidos para que esta técnica venha a ser objetivamente empregada como método de triagem em terapia gênica.

A otimização da transfecção de um sistema como o complexo *pTracer/ LipofectamineTM2000* deve ser feita para cada tipo celular e em cada laboratório, levando em conta as variáveis densidade celular, presença de soro no meio de

transfecção, tempo de suspensão da *LipofectamineTM2000*, tempo de complexação entre *pTracer* e *LipofectamineTM2000*, razão *pTracer/ LipofectamineTM2000*, quantidade do complexo *pTracer/ LipofectamineTM2000* (dose) e tempo de transfecção (www.invitrogen.com). A eficiência de transfecção resulta do ajuste destas variáveis, sendo uma perspectiva deste trabalho otimizar-las para utilização deste complexo em células HepG2 e em outras células no Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A determinação do tempo de expressão máxima da GFP *in vitro* servirá como parâmetro para sua posterior análise *in vivo*.

Dessa forma, pretende-se futuramente, determinar a expressão de GFP em órgãos de camundongos (fígado, rim, pulmão e cérebro) inicialmente em tempos próximos ao tempo de expressão máxima *in vitro*, aumentando o espectro temporal. Além disso, os dados de fluorescência, ou seja, o efeito (farmacodinâmica) serão analisados matematicamente e será determinada a concentração de DNA plasmidial nos mesmos órgãos e em sangue em diferentes tempos (farmacocinética). Finalmente, a relação dose-efeito em função do tempo (farmacocinética – farmacodinâmica) será analisada matematicamente para elaboração de modelos matemáticos preditivos que descrevam o comportamento do DNA plasmidial e da GFP *in vivo*. Esta metodologia será disponibilizada para outros projetos e poderá ser aplicada em outros sistemas de transfecção que expressam proteínas terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson, F. (2000) The best of times, the worst of times. *Science* 288:679-629.

Cohen-Haguenauer, O. **La Thérapie Génique.** Paris, Editions Médicales Internationales, 2001.

Honigman, A.; Zeira, E.; Ohana, P.; Abramovitz, R.; Tavor, R.; Bar, I.; Zilberman, Y.; Rabinovsky, R.; Gazit, D.; Joseph, A.; Panet, A.; Shai, E.; Palmon, A.; Laster, M.; Galun, E. (2001) Imaging transgene expression in live animals. *Mol Ther* 4:239-249.

Matte, U.; Giugliani, R. Terapia Gênica – Aspectos Técnicos in: Binsfeld, P. C.. *Biossegurança em Biotecnologia* . 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. v. 1. 309p.

Steele, F. (2000) Gene Therapy on the RAC. *Mol Ther* 1:1-2.

www.fda.gov

www.invitrogen.com

CONCLUSÕES

O primeiro passo para se iniciar uma adaptação das abordagens farmacológicas à terapia gênica é a comparação teórica entre ambas. No intuito de servir como guia para atividades experimentais práticas, a primeira parte do presente estudo cumpre o objetivo de proporcionar uma visão do gene de interesse como agente terapêutico.

A abordagem experimental proposta para que se estudar os parâmetros farmacológicos da terapia gênica foi a utilização da espectrofotometria de fluorescência. Foi possível estabelecer um método semi-quantitativo para determinar os níveis de expressão de GFP em células HepG2 e sua variação em função do tempo. O pico da expressão ocorreu em 48 horas, que foi o período máximo analisado.