



ARTIGO DE REVISÃO

Transferência de gene como tratamento das doenças metabólicas hereditárias interessando o fígado

Gene transfer as treatment for metabolic inherited liver diseases

José Luiz de Godoy*

Resumo

Objetivo: Estudar a transferência de gene para uma futura aplicação clínica no tratamento das doenças metabólicas hereditárias interessando o fígado.

Métodos: Revisão bibliográfica sobre o tema.

Resultados e Conclusões: A transferência de gene no fígado poderia representar uma alternativa ao transplante hepático para tratar certas doenças metabólicas interessando o fígado. Vários vetores foram descritos para realizar a transferência de gene, notadamente os vetores retrovirais cuja integração ao DNA cromossômico permitiria uma expressão estável a longo termo do transgene. A integração do vetor retroviral no genoma das células só é possível durante a mitose. Como consequência, estes vetores devem ser administrados durante e regeneração hepática induzida, por exemplo, por uma hepatectomia parcial. Um outro obstáculo que deve ser superado corresponde ao risco de disseminação extra-hepática destes vetores, em particular ao nível das células germinativas, correndo-se o risco de modificar o patrimônio genético constitucional da descendência.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(2): 101-108: transferência de gene, regeneração hepática, retrovírus, doença metabólica, terapia gênica.

Abstract

Objective: To study gene transfer looking for its future clinical application in the treatment of metabolic inherited liver diseases.

Methods: Bibliographic review about the subject.

Results and Conclusions: Gene transfer into the liver would be an alternative to liver transplantation to treat some inherited metabolic diseases. Various vectors have been employed for gene transfer, including retrovirus vectors, whose integration into the chromosomal DNA would allow stable long term expression of the transgene. The integration of retrovirus vectors into the genome of the target cell is only possible during mitosis. Therefore, these vectors must be delivered during hepatic regeneration induced by partial hepatectomy, for example. Another obstacle to be overcome is the extra hepatic dissemination of retrovirus, in particular to the germinal cells, due to the risk of changing the genetic heritage of the progeniture.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(2): 101-108: gene transfer, hepatic regeneration, retrovirus, metabolic disease, gene therapy.

GLOSSÁRIO

Alogênico (alotransplante): transplante entre entidades da mesma espécie, porém geneticamente diferentes.

Autólogo: autotransplante.

ffu/ml: *focus forming units/ml*.

Mutação: designa qualquer mudança em uma seqüência de DNA. Provírus: genoma retroviral integrado sob a forma de um DNA fita dupla ao DNA de uma célula.

Recombinante: sintético.

Tradução: síntese de proteína a partir de um RNA mensageiro.

Transcrição: síntese de RNA por uma RNA polimerase a partir de uma matriz de DNA.

Transdução: transferência de material genético de uma célula a outra por intermédio de um vírus.

Vírião: genoma retroviral sob a forma de dois RNA fita simples, não integrado.

Xenogênico (xenotransplante): transplante entre espécies diferentes.

Introdução

A identificação e a clonagem de genes diretamente responsáveis ou implicados no aparecimento de doenças hereditárias e/ou adquiridas permitiu novas perspectivas terapêuticas utilizando a transferência intracelular de um gene de interesse¹.

O objetivo da transferência de gene é introduzir um gene estranho cuja expressão permitirá (*i*) restaurar uma função que faltava desde o nascimento devido a uma mutação do gene ou a uma perturbação, na sua transcrição ou na sua tradução, ou permitir à célula adquirir uma nova função

* Docteur ès Sciences, Université Paris V (René Descartes), Paris, França. Cirurgião Pediatra da Disciplina de Cirurgia Pediátrica do Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR.

metabólica; (ii) obter, por intermédio da proteína secretada correspondente, a morte da célula tumoral alvo, por exemplo, fazendo-a adquirir um gene cuja expressão seria tóxica para ela^{2,3}.

A utilização do fígado como órgão alvo para transferência de gene pode ser visada por três razões: (i) ele é o sítio de numerosas sínteses protéicas e conseqüentemente de anomalias ou deficiências enzimáticas potencialmente curáveis por transferência gênica; (ii) a cultura celular possibilita estudar *in vitro* a transferência de gene no hepatócito; e (iii) a cirurgia hepática permite, com um risco limitado, planejarem-se procedimentos cirúrgicos que facilitem a transferência de gene no fígado, no homem⁴. Antes de uma aplicação clínica humana, a transferência de gene deve provar sua eficácia e sua inocuidade nos modelos experimentais.

Doenças metabólicas hereditárias interessando o fígado

Várias doenças metabólicas hereditárias interessando o fígado são atualmente indicação de transplante hepático (Tabela 1). A substituição do fígado doente permite restaurar a atividade enzimática normal e curar a doença metabólica^{5,6}.

Doenças metabólicas por lesão direta do fígado

Entre as doenças metabólicas, existe um primeiro grupo em que a anomalia enzimática acarreta precocemente uma

hepatopatia grave, evoluindo para cirrose ou risco de carcinoma hepático. Nessas doenças metabólicas por lesão direta do fígado, no estágio de cirrose, somente o transplante hepático parece atualmente viável. O transplante hepático permite ao mesmo tempo restaurar a atividade enzimática ausente e substituir o fígado cuja lesão domina a sintomatologia⁷. Efetivamente, não parece razoável esperar um efeito terapêutico importante, pela simples transferência de um gene, na presença de lesões constituídas de cirrose. Somente um diagnóstico muito precoce da doença poderia permitir uma eficiência de tal tratamento, como demonstrado por Overturf e col.⁸ Essa equipe trabalhou com o camundongo, cujo gene codificando para a enzima fumaril-acetoacetato hidrolase foi invalidado. Esse camundongo é o modelo animal da tirosinemia hereditária de tipo I no homem. Essa doença revela-se nos lactentes por insuficiência hepatocelular aguda, rapidamente mortal nos primeiros meses de vida, ou por cirrose freqüentemente associada a raquitismo no segundo semestre de vida e expõe a um risco elevado de carcinoma hepatocelular. Utilizando esse camundongo, Overturf e col. demonstraram a vantagem seletiva *in vivo* de hepatócitos expressando a enzima fumaril-acetoacetato hidrolase (hepatócitos normais) em relação aos hepatócitos deficientes nessa enzima (hepatócitos mutantes) na correção do fenótipo. A ausência de atividade enzimática normal acarreta um acúmulo de metabólitos tóxicos para os hepatócitos, o que predispõe a um estímulo permanente de regeneração hepatocitária. Nesse processo,

Tabela 1 - Indicação de transplante hepático por doenças metabólicas hereditárias interessando o fígado

Doenças metabólicas por lesão direta do fígado	
Doença	Proteína deficiente
Déficit em a-antitripsina	a-antitripsina
Tirosinemia hereditária	fumaril aceto-acetato hidrolase
Doença de Wilson	ceruloplasmina
Galactosemia	galactose-1-fosfato-uridil transferase
Glicogenose tipo I	glicose-6-fosfatase
Glicogenose tipo IV	a 1,4 glicam-6-glicosil transferase
Protoporfiria	porfobilinogeno desaminase
Mucoviscidose	CFTR
Doenças metabólicas expondo a complicações extra-hepáticas graves	
Doença	Proteína deficiente
Hiperoxalúria tipo I	alanina-glioxilato-amino-transferase peroxisomal
Hipercolesterolemia familiar	receptor do LDL-colesterol
Crigler-Najjar tipo I	bilirubina-uridina-difosfato-glicuronil transferase
Hemofilia A	fator VIII
Hemofilia B	fator IX
Déficit em proteína C	proteína C
Doenças do ciclo da uréia	ornitina transcarbamilase arginosuccinato sintetase

Adaptado de Bernard e col.⁷, Esquivel e col.⁵, Panis e col.⁴ e Sherlock e Dooley⁶

os hepatócitos normais possuem uma vantagem seletiva em relação aos hepatócitos mutantes. Após transplante no baço do camundongo, os hepatócitos normais foram capazes de repopular mais de 80% de um fígado mutante. O número mínimo de hepatócitos normais necessários para repopular mais de 50% do fígado mutante foi 1.000 hepatócitos. Nesse mesmo trabalho, Overturf e col. também demonstraram que os hepatócitos mutantes transduzidos *in situ* por vetores retrovirais contendo o gene da fumaril-acetoacetato hidrolase humana tinham uma vantagem seletiva em relação aos hepatócitos mutantes não transduzidos. Dois meses após a injeção de vetores retrovirais na veia porta, a seleção *in vivo* havia acarretado uma repopulação de mais de 90% do fígado com expressão da enzima normal⁸.

O princípio da seleção *in vivo* nesse modelo era baseado em (i) vantagem de crescimento dos hepatócitos normais em relação aos hepatócitos mutantes deficientes para a enzima, (ii) regeneração hepática permanente ligada à acumulação de metabólitos tóxicos para os hepatócitos mutantes (iii) enquanto que eles não o são para os hepatócitos normais.

Mais recentemente, essa mesma equipe também demonstrou que os hepatócitos mutantes isolados do fígado do camundongo deficitário em fumaril-acetoacetato hidrolase podiam ser transduzidos em cultura celular por vetores retrovirais contendo o gene dessa enzima. Após reimplante no baço, os hepatócitos transduzidos tinham uma vantagem seletiva em relação aos hepatócitos mutantes, sendo capazes de repopular mais de 85% do fígado⁹.

O princípio de repopulação do fígado por vantagem seletiva pode ser aplicável a outros modelos animais de doenças metabólicas e, ao menos em teoria, eventualmente ao homem, para o tratamento das doenças metabólicas letais por lesão direta do fígado.

Doenças metabólicas expondo a complicações extra-hepáticas

Um segundo grupo é caracterizado por manifestações extra-hepáticas graves, ameaçando por vezes o prognóstico vital, porém sem manifestações hepáticas associadas (Tabela 1). Nesse segundo grupo de doenças metabólicas, devido a um déficit monogênico, cuja base molecular é bem conhecida e uma correção, mesmo que parcial do déficit enzimático, poderia melhorar a expressão fenotípica da doença, a transferência de um gene no fígado poderia representar uma alternativa terapêutica, em particular ao transplante hepático, para tratar geneticamente as manifestações clínicas dessas doenças metabólicas^{2,10-12}. Com efeito, para a maior parte dos defeitos enzimáticos, as manifestações clínicas sobrevêm somente quando a atividade enzimática está reduzida, porque 5 a 25% de uma atividade enzimática normal freqüentemente protege das manifestações clínicas¹³. Um exemplo é representado pela hemofilia B a qual resulta de um déficit em fator IX da coagulação. Os indivíduos com menos de 1% de atividade

normal de fator IX possuem um risco importante de hemorragia espontânea, aqueles com 1 a 10% possuem um risco fraco ou moderado e aqueles com 10 a 20% podem não ter nenhuma manifestação clínica da doença¹³.

Estratégia da transferência de gene

Dois procedimentos teóricos podem ser visados para a correção de um defeito genético por transferência somática de um gene: a substituição gênica (ou reparação *in situ*) e o aumento gênico (ou transplante ectópico).

A substituição gênica

Trata-se de uma correção do genótipo através de uma reparação específica da anomalia gênica. Ela consiste em retirar de maneira seletiva o gene mutado e substituí-lo por um gene normal. Esse conceito é ideal porque a correção intervém *in situ*, o gene reparado permanece no seu ambiente genômico natural, estando submetido a seus mecanismos normais de regulação. Por enquanto, trata-se de um objetivo tecnicamente inatingível, porque os meios para reparar uma lesão específica, em um determinado gene, não são ainda conhecidos¹⁴.

O transplante ectópico

O objetivo do transplante ectópico é a correção do fenótipo através da inserção de uma versão normal do gene em um sítio aleatório do genoma. Essa operação consiste em adicionar um gene funcional deixando no lugar o gene mutado. O gene "transplantado" pode em alguns casos não ser integrado e permanecer sob forma episomal. Esse procedimento, até o presente momento, é o único a ter eficácia comprovada e relativa inocuidade no animal de experimentação. Sua utilização foi autorizada no ser humano em protocolos de terapia gênica.

Transferência germinativa de gene versus transferência somática de gene

Transferência germinativa de gene: se a correção é efetuada em uma célula germinativa ou em uma célula do embrião precoce, ela é transmitida à descendência. A transferência germinativa de gene é inaplicável ao ser humano por razões técnicas e sobretudo éticas: ela implicaria em uma mudança do patrimônio genético constitucional da humanidade. Por outro lado, ela constitui um modelo experimental útil, permitindo criar animais transgênicos, os quais expressam um gene que normalmente não existe na raça animal em questão.

Transferência somática de gene: se a correção é efetuada em células somáticas, ela aporta uma correção fenotípica a um grupo determinado de células, sem afetar o patrimônio genético constitucional do indivíduo. A transferência somática de gene aplicada ao ser humano levanta *a priori* os mesmos problemas éticos que aqueles do transplante de órgãos ou de tecidos.

Elementos da transferência do gene

Existem três elementos essenciais para realizar a transferência de um gene: o gene, o vetor e a célula alvo.

O gene a ser transferido

O gene a ser transferido deve ser conhecido, seqüenciado e clonado para poder ser utilizado. Ele é utilizado sob forma de construção viral contendo o gene a ser transferido e/ou um gene auxiliar (ou gene de seleção), o que confere uma vantagem seletiva. Distinguem-se os genes marcadores e os genes de interesse terapêutico.

Os genes marcadores são genes naturalmente ausentes na célula alvo. Eles permitem revelar a exequibilidade e a realidade da transferência gênica, assim como apreciar a duração e a intensidade da expressão do transgene na célula alvo. Por exemplo, o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* (lac Z), acompanhado ou não de um sinal de localização nuclear (*nuclear localization signal* – nls lac Z) é muito utilizado nas construções virais. A sua atividade é revelada por uma reação histoquímica utilizando o substrato X-Gal, o qual dá uma coloração azul intenso nas células expressando o transgene¹⁵. O gene codificando para a GFP (*green fluorescent protein*) é igualmente muito utilizado. A fluorescência espontânea de seu produto de expressão pode ser detectada, medida e seguida em células vivas sem adição de substrato.

Os genes de interesse terapêutico, cuja utilização teria diretamente um objetivo terapêutico, são aqueles codificando para uma proteína, um hormônio ou uma enzima cuja síntese anormal ou ausente é responsável por uma doença conhecida (por exemplo: o gene codificando para o fator IX da coagulação, sua mutação é a origem da hemofilia B)¹⁶.

O vetor

A transferência de gene se efetua com a ajuda de um vetor, o qual serve de veículo do transgene. A introdução do gene sob a forma de DNA nú na circulação sistêmica, ou mesmo diretamente no órgão alvo, é pouco eficaz, devido a uma degradação rápida do ácido nucléico¹⁷.

A célula alvo: o hepatócito

Terceiro elemento da transferência de um gene, a célula alvo a qual permite a transcrição do transgene e sua expressão. O aporte de um transgene no hepatócito pode ser planejado segundo dois métodos diferentes: método *in vitro-in vivo* e método *in vivo*.

Métodos de transferência de gene

O método in vitro-in vivo

Nesse método, os hepatócitos são obtidos através da dissociação de uma peça de hepatectomia parcial ou do fígado de um outro animal doador. Os hepatócitos são em seguida modificados geneticamente, imediatamente ou após uma etapa de cultura celular. Enfim, esses hepatócitos

geneticamente modificados são introduzidos em seu animal doador, ou em um outro animal. No primeiro caso, trata-se de um transplante autólogo de hepatócitos (ou autotransplante). No segundo caso trata-se de um transplante alogênico ou ainda xenogênico. A modificação genética dos hepatócitos em cultura pode ser realizada através de meios físicos ou graças à utilização de vetores retrovirais¹⁸. Uma vez geneticamente modificados, os hepatócitos devem ser reimplantados em número suficiente e em um local onde o seu crescimento será satisfatório. A adaptação das interações celulares, a existência de uma matriz extra-celular favorável ao crescimento e a necessidade de fatores hepatotróficos de origem portal são argumentos a favor do fígado como sítio de implante definitivo desses hepatócitos geneticamente modificados. O implante dos hepatócitos no fígado é realizado através de um cateter colocado na veia porta (ou em uma tributária) ou através de injeção intra-esplênica, que é seguida de migração desses hepatócitos para o fígado. A exequibilidade desse método já foi demonstrada com sucesso por Chowdhury e col.¹⁹ utilizando o coelho Watanabe, modelo animal da hipercolesterolemia familiar no homem (déficit genético em receptor do LDL-colesterol). Porém os resultados decepcionantes de um ensaio clínico piloto de transferência gênica realizado em cinco doentes portadores de hipercolesterolemia familiar homozigota - expressão do transgene em um número limitado de hepatócitos - mostram que a eficácia da correção fenotípica da hipercolesterolemia familiar pelo método *in vitro-in vivo* deve ser ainda melhorada^{20,21}.

O limite principal desse método para uma aplicação clínica humana é o número de hepatócitos reinjetados. Este limite poderia ser superado com a ajuda de um banco de hepatócitos alogênicos²². A taxa de transferência de gene através de vetores retrovirais em hepatócitos fetais é elevada (90%) e a criopreservação, mesmo a longo termo (8 meses), possui pouco efeito sobre a viabilidade e a transdução desses hepatócitos pelos vetores retrovirais. Após descongelamento, a viabilidade dos hepatócitos fetais é elevada (75 a 85%) assim como a capacidade de transdução que é idêntica àquela obtida antes da congelamento²². Por outro lado, tendo por finalidade otimizar o método *in vitro-in vivo*, o aporte de uma vantagem seletiva aos hepatócitos modificados geneticamente poderia aumentar a sua capacidade de repopulação do fígado em relação aos hepatócitos nativos^{20,23}. Apesar de um autotransplante de hepatócitos, esse método não impede em teoria uma imunização do receptor contra a proteína estranha produzida pelo hepatócito geneticamente modificado.

O método in vivo

O método *in vivo* objetiva uma maior eficiência em relação à técnica precedente em termos do número de hepatócitos transgenizados. Trata-se da injeção do vetor contendo o transgene diretamente no parênquima hepático, na via biliar, na veia porta ou na artéria hepática^{16,24-26}. A injeção portal é atualmente a via mais utilizada.

Quando se utilizam vetores retrovirais *in vivo*, há que se considerar que (i) a transferência de gene deve ser realizada durante a regeneração hepática, induzida mais freqüente por uma hepatectomia parcial; (ii) a disseminação extra-hepática de retrovírus pode ocasionar uma contaminação da linha germinativa. Para evitar ou diminuir tal disseminação, a abordagem cirúrgica do fígado poderia permitir sua retirada, sua modificação genética *ex vivo* com vetores retrovirais perfundidos em um aparelho de fígado isolado-perfundido, seguido de auto-transplante hepático ortotópico desse fígado geneticamente modificado²⁷. Ou ainda, para evitar as etapas de perfusão *ex vivo* em um aparelho de fígado isolado-perfundido e também o transplante hepático ortotópico, o método de perfusão *in vivo-in situ* permite a sua exclusão vascular temporária da circulação esplâncnica e sistêmica durante a injeção de vetores retrovirais, evitando-se qualquer disseminação extra-hepática desses vetores²⁸.

Os vetores

Diferentes tipos de vetores foram descritos, separados em vetores não virais e vetores virais.

Vetores não virais

Entre os vetores não virais permitindo a transfecção de hepatócitos *in vivo* ou *in vitro*, existe os métodos físico-químicos como a precipitação fosfocálcica²⁹, o dextran³⁰, o bombardeio de partículas³¹, assim como os liposomas³². A eficácia dos vetores não virais, apesar da tendência a melhorar, permanece inferior à dos vetores virais.

Vetores virais

Diferentes vírus foram descritos para a transferência de um gene nos hepatócitos. Citemos os vetores derivados do vírus adenovírus-associado (AAV), os vetores derivados de lentivírus, notadamente do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou ainda os baculovírus³³. Esses vetores virais oferecem o interesse de poderem transduzir as células independentemente da fase do ciclo celular da célula hospedeira. Entretanto, dois tipos de vírus foram particularmente estudados nestes últimos anos: os vetores adenovirais e os vetores retrovirais.

Os vetores adenovirais

Atualmente, 10% dos protocolos clínicos utilizam vetores adenovirais³⁴. As vantagens dos vetores adenovirais são as seguintes: (i) a obtenção de títulos elevados de partículas virais, da ordem de 10^{12} ffu/ml; (ii) a possibilidade de transduzir as células independentemente da fase do ciclo celular da célula alvo³⁵; (iii) o seu tropismo hepático com uma eficiência de transdução hepatocitária atingindo 95-100% após injeção sistêmica³⁶ ou injeção através do trato biliar²⁶; (iv) a utilização de adenovírus como vacina oral de vírus vivo atenuado no exército americano há mais

de 20 anos sem inconvenientes é testemunho de sua inocuidade, em especial no que se relacione com um possível risco carcinogênico³⁷; (v) as seqüências de DNA incorporados podem ser tão longas como aquelas introduzidas nos vetores retrovirais.

Os inconvenientes dos vetores adenovirais são os seguintes: (i) a expressão do transgene é transitória, relativamente breve; (ii) o caráter episomal do adenovírus é em parte responsável por essa expressão transitória; (iii) a transdução tissular quando de uma injeção sistêmica não é específica, um grande número de tipos celulares expressam os receptores do adenovírus e assim é difícil transduzir certos órgãos sem transduzir parcialmente outros; (iv) as reações citotóxicas diretas desencadeadas pela injeção *in vivo* de adenovírus representam atualmente o inconveniente mais importante deste tipo de vetor e limitam consideravelmente as possibilidades de sua utilização. A transdução do fígado por via intra-venosa ou via biliar é extremamente eficaz, pois 95-100% dos hepatócitos são transduzidos^{26,36}. Entretanto, a expressão do transgene diminui consideravelmente uma semana após a injeção e, ao final de 3 a 4 semanas, os hepatócitos não expressam mais o transgene. De fato, uma reação imunológica celular é desencadeada, destruindo os hepatócitos modificados geneticamente, o que origina uma hepatite grave e uma repopulação do fígado por hepatócitos não transduzidos^{38,39}. Parece que o vetor adenoviral induz uma reação citotóxica direta devido a expressão de proteínas virais. Entretanto, a eliminação de células transduzidas seria conseqüência de uma imunidade celular e também humoral dirigida contra a proteína codificada pelo transgene⁴⁰. Enfim, uma reação humoral específica dirigida contra as proteínas do capsídeo torna ineficaz toda readministração do vetor adenoviral *in vivo*.

Os vetores retrovirais

Atualmente, 60% dos protocolos clínicos de terapia gênica utilizam vetores retrovirais³⁴. Os vetores retrovirais derivados do vírus tipo C da leucemia murina de Moloney são os mais utilizados⁴¹. Os vetores retrovirais defectivos (não contendo a informação genética necessária a realização de um ciclo infeccioso) são produzidos por células de encapsulação. Os genes virais *gag*, *pol* e *env* foram deletados totalmente. O DNA eliminado é substituído por um transgene marcador ou de interesse terapêutico eventualmente associado a um gene de seleção, por exemplo, o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli* e o gene de resistência a puromicina, respectivamente. A capacidade de clonagem nesses vetores é de aproximadamente 8kb⁴¹.

As vantagens dos vetores retrovirais são as seguintes: (i) eles possuem a propriedade de integrar o seu genoma ao genoma da célula alvo, o que permite visar uma expressão estável a longo termo do transgene, mesmo que a célula transduzida se divida^{42,43}; este último ponto é todo favorável para utilizar o vetor retroviral para tratar uma doença metabólica em uma criança; (ii) sendo defectivos, eles podem infectar somente uma célula alvo; (iii) uma vez

integrado ao DNA genômico, os vetores retrovirais defeituosos não possuem a capacidade de produzir partículas virais dentro dessas células, o ciclo retroviral parando na etapa de integração do provírus; e (iv) ausência relativa de reação imunológica após injeção direta do retrovírus recombinante ou após transplante de células autólogas transduzidas *in vitro*.

Os inconvenientes dos vetores retrovirais são os seguintes: (i) obtenção de títulos mais fracos de partículas retrovirais (10^8 ffu/ml) em relação aos vetores adenovirais – efetivamente, a eficiência da transdução está ligada à relação número de partículas infecciosas/número de células alvo a transduzir, como foi recentemente demonstrado por Kitten e col.⁴⁴ e De Godoy e col.⁴⁵; (ii) uma integração não específica do vetor retroviral ao genoma da célula alvo pode eventualmente se fazer em um gene supressor de tumor ou em um sítio suscetível de ativar um oncogene⁴⁶; (iii) a transferência de gene com vetores retrovirais deve ser realizada em células que estão ativamente duplicando o seu DNA⁴⁷, a etapa limitante da transdução é a passagem do complexo retroviral DNA-proteína do citoplasma ao núcleo da célula alvo – é a desintegração da membrana nuclear durante a mitose que torna possível a passagem do complexo retroviral DNA-proteína no núcleo e a sua integração ao genoma da célula hospedeira sob a forma de um provírus⁴⁸. Isso é uma real limitação para a transdução direta *in vivo* porque poucos tecidos ou tipos celulares estão em divisão ativa em condições fisiológicas, incluindo-se os hepatócitos em um fígado normal.

Para superar esse obstáculo, a transdução *in vivo* dos hepatócitos se faz durante a regeneração hepática, induzida previamente por uma hepatectomia parcial por exemplo.

Regeneração hepática

O fígado é um órgão extremamente complexo, possui mais de 5.000 funções, recebe duas vascularizações sanguíneas distintas e contém vários tipos celulares. A capacidade de regeneração do fígado permanece ainda mal explicada do ponto de vista do determinismo ontogênico. Ela parece ainda mais singular visto que todas as funções hepáticas essenciais à homeostasia são mantidas durante o seu desenvolvimento⁴⁹⁻⁵¹ e visto que em condições *ex vivo*, durante a fase S do ciclo celular do hepatócito no sistema de fígado de rato isolado-perfundido em normotermia, ela se desenvolve de maneira similar – em termos de *timing*, de quantidade e de duração de síntese de DNA e também em termos de distribuição lobular – à regeneração hepática *in vivo*, após hepatectomia parcial²⁷.

O fígado adulto normal é um órgão que possui uma atividade replicativa mínima. O hepatócito adulto é uma célula quiescente em um fígado normal, com uma duração de vida de 200 a 400 dias⁵². Em um fígado normal existe 0,2 a 0,5% de hepatócitos em fase de síntese de DNA⁵³, ou seja, uma mitose para 20.000 hepatócitos⁵⁴.

O fígado, entretanto, é um órgão que pode, quase que imediatamente, iniciar o processo de regeneração em resposta a uma perda celular causada por lesão tóxica, física ou infecciosa. O modelo experimental mais utilizado para estudar a regeneração hepática no rato é a hepatectomia parcial de 2/3 descrita em 1931 por Higgins e Anderson⁵⁵. Após uma hepatectomia parcial, os lobos ressecados não crescem de novo, mas constata-se uma hiperplasia dos lobos residuais para restabelecer a massa celular hepática ideal em relação ao peso corpóreo. As células que proliferam são os hepatócitos, células epiteliais biliares, células endoteliais, células de Kupffer e células de Ito. Segundo a cinética de síntese de DNA por essas diferentes células, elas também poderiam ser transduzidas por vetores retrovirais. Como exemplo, citemos a célula epitelial biliar que poderia ser transduzida com vetores retrovirais contendo o gene *cfr* em pacientes portadores de mucoviscidose. Aproximadamente, 7 a 10 dias após uma hepatectomia parcial no rato, o fígado recuperou sua massa normal⁵⁶.

A regeneração hepática induzida por uma hepatectomia parcial possui um início preciso, não existe nenhuma lesão para os lobos residuais e a cinética de síntese de DNA pelos hepatócitos já foi longamente estudada. O pico da fase S do ciclo celular do hepatócito situa-se 24 horas após a hepatectomia parcial, momento em que 35% dos hepatócitos estão sintetizando seu DNA⁵⁷⁻⁵⁹. Vinte e quatro horas após o pico da fase S do ciclo celular do hepatócito, acontece a duplicação do DNA da célula biliar. Como somente 2/3 da massa hepática são ressecados, a restauração do número original de hepatócitos é, em teoria, obtido com 1,66 ciclos celulares por hepatócito residual⁵¹.

Por outro lado, em um fígado deficitário, a hepatectomia parcial poderá ser um real limite para a transferência de gene. A ressecção da massa hepática poderá desequilibrar a homeostasia precariamente mantida por esse fígado deficitário. A exploração das propriedades mitogênicas dos fatores de crescimento no fígado poderia oferecer uma alternativa para induzir a proliferação celular hepática *in vivo*, sem ter que recorrer à realização de uma hepatectomia parcial prévia. Assim, esse método poderia ser utilizado para melhorar a transferência de gene *in vivo* no fígado por vetores retrovirais.

Fatores de crescimento e transferência de gene

Os fatores de crescimento mitogênicos são definidos como substâncias capazes de induzir a síntese de DNA e a mitose dos hepatócitos em um meio de cultura celular desprovido de soro. Várias substâncias foram descritas possuindo esta característica: EGF (*epidermal growth factor*)⁶⁰, TGF- α (*transforming growth factor- α*)^{51,56}, KGF (*keratinocyte growth factor*)⁶¹ e sobretudo o HGF (*hepatocyte growth factor*)⁶². O HGF é o mais potente mitógeno conhecido para o fígado^{56,62-64}. Ele não acarreta nenhum risco carcinogênico, como relatado para TGF- α ⁶⁵ e KGF⁶⁶.

Recentemente, uma taxa de transdução hepatocitária de 30% foi obtida com perfusão contínua de HGF recombinante simultaneamente com perfusão de vetores retrovirais através de cateter colocado na veia porta de camundongo^{67,68}.

Conclusão

A introdução de um gene na célula alvo – hepatócito – é somente o primeiro passo na transferência somática de um gene. Após sua introdução, outros obstáculos devem ainda ser superados. O gene transferido deverá persistir durante toda a vida da célula modificada geneticamente. Em seguida ele deverá ser transmitido ao genoma das células que serão originadas por divisão celular posterior. Assim, na perspectiva de uma aplicação clínica para tratar uma doença metabólica hereditária interessando o fígado de uma criança, será necessário a obtenção de uma expressão estável do transgene a longo termo, em nível suficiente.

Agradecimento

Ao Professor Nelson Augusto Rosário Filho, pela valiosa contribuição na revisão do original.

Referências bibliográficas

- De Godoy JL. Régénération hépatique et transfert de gènes. Thèse de Doctorat. Université Paris V (René Descartes), Paris, França, 1999.
- Ledley F. Clinical application of somatic gene therapy in inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 1990;13:597-616.
- Mulligan R. The basic science of gene therapy. *Science* 1993;260:926-32.
- Panis Y, Rad A, Boyer O, Houssin D, Salzman J, Klatzmann D. Gene therapy for liver tumors. *Surg Onc Clin North Am* 1996; 5:461-73.
- Esquivel C, Marino I, Fioravanti V, Van Thiel D. Liver transplantation for metabolic disease of the liver. *Liver transplantation. Gastroent Clin North Am* 1988;17:167-74.
- Sherlock S, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 10^a ed. London: Blackwell Science; 1997.
- Bernard O, Fischer A, Grünfeld J. La transplantation d'organe comme traitement des maladies métaboliques héréditaires. *Med Sciences* 1988;7:406-12.
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou C, Finegold M, et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected *in vivo* in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nature Genet* 1996;12:266-73.
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Manning K, Ou C, Finegold M, Grompe M. *Ex vivo* hepatic gene therapy of mouse model of hereditary tyrosinemia type I. *Hum Gene Ther* 1998;9:295-304.
- Davern II T, Scharschmidt B. Gene therapy for liver disease. *Dig Dis* 1998;16:23-37.
- Horwich A. Inherited hepatic enzyme defects as candidates for liver-directed gene therapy. *Curr Top Micro Immunol* 1991;168:185-202.
- Ledley F. Hepatic gene therapy: present and future. *Hepatology* 1993;18:1263-73.
- Kay M, Woo S. Gene therapy for metabolic disorders. *TIG* 1994;10:253-57.
- Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989;244:1275-81.
- Ferry N, Duplessis O, Houssin D, Danos O, Heard J. Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8377-81.
- Kay M, Rothenberg S, Landen C, Bellinger D, Leland F, Toman C, et al. *In vivo* gene therapy by hemophilia B: sustained partial correction in factor IX-deficient dogs. *Science* 1993;262:117-19.
- Forbes S, Hodgson H. Review article: gene therapy in gastroenterology and hepatology. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11:823-36.
- Kay M, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder K, et al. Expression of human α 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:89-93.
- Chowdhury J, Grossman M, Gupta S, Chowdhury N, Baker J, JR, Wilson J. Long-term improvement of hypercholesterolemia after *ex vivo* therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 1991;254:1802-05.
- Grossman M, Rader D, Muller D, Kolansky D, Kozarsky K, Clark III B, et al. A pilot study of *ex vivo* gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995; 1:1148-54.
- Raper S, Grossman M, Rader D, Thoene J, Clark III B, Kolansky D, et al. Safety and feasibility of liver directed *ex vivo* gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg* 1996;223:116-26.
- Andreoletti M, Pagès J, Mahieu D, Loux N, Farge D, Sacquin P, et al. Preclinical studies for cell transplantation: isolation of primate fetal hepatocytes, their cryopreservation, and efficient retroviral transduction. *Hum Gene Ther* 1997;8:267-274.
- Mignon A, Guidotti J, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, et al. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nature Med* 1998; 4:1185-88.
- Kay M, Li Q, Liu T, Leland F, Toman C, Finegold M, et al. Hepatic gene therapy: persistent expression of human α 1-antitrypsin in mice after direct gene delivery *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1992;3:641-47.
- Roos W, Fallaux F, Marinelli A, Lazaris-Karatzas, Alting von Geusau B, van der Eb M, et al. Isolated-organ perfusion for local gene delivery: efficient adenovirus-mediated gene transfer into the liver. *Gene Ther* 1997;4:55-62.
- Yang Y, Raper S, Cohn J, Engelhardt J, Wilson J. An approach for treating the hepatobiliary disease of cystic fibrosis by somatic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4601-05.
- De Godoy JL, Fabre M, Cherruau B, McIntyre M, Soubrane O, Houssin D, et al. Hepatic regeneration in the isolated perfused rat liver followed by liver transplantation. *Hepatology* 1998;27: 697-702.
- De Godoy JL, Malafosse R, Fabre M, Mitchell C, Mehtali M, Houssin D, et al. A preclinical model of retroviral hepatocyte gene transfer: the *in vivo-in situ* perfused rat liver. *J Exp Med* 1999 (submetido).
- Dubensky T, Campbell B, Villarreal L. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7529-33.
- Gopal T. Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and co-transfection of suspension cell cultures. *Mol Cell Biol* 1985;5:1188-90.
- Yang N, Burkholder J, Roberts B, Martinelli B, Mac Cabe D. *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9568-72.

32. Versland M, Wu C, Wu G. Strategies for gene therapy in the liver. *Sem Liver Dis* 1992; 12:332-9.
33. Ferry N, Heard J. Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:1975-81.
34. Anderson W. Human gene therapy. *Nature* 1998;392:25-30.
35. Li Q, Kay M, Finegold M, Stratford-Perricaudet L, Woo S. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:403-9.
36. Vrancken Peeters M, Patijn G, Lieber A, Meuse L, Kay M. Adenovirus-mediated hepatic gene transfer in mice: comparison of intravascular and biliary administration. *Hum Gene Ther* 1996;7:1693-99.
37. Kaplan J, Delpech M. La thérapie génique. In Kaplan J, Delpech M, eds. *Biologie moléculaire et médecine*. Paris: Flammarion; 1995. p. 509-25.
38. Yang Y, Ertl H, Wilson J. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigen destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1994;1:433-42.
39. Yang Y, Nunes F, Berenski K, Furth E, Gonczol E, Wilson J. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4407-11.
40. Michou A, Santoro L, Christ M, Julliard V, Pavirani A, Mehtali M. Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther* 1997;4:473-82.
41. Vile R, Russell S. Retroviruses as vectors. *Br Med Bull* 1995;51:12-30.
42. Grossman M, Wilson J. Retroviruses: delivery vehicle to the liver. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:110-14.
43. Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988;240:1427-35.
44. Kitten O, Cosset F, Ferry N. Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1997;8:1491-94.
45. De Godoy JL, Malafosse R, Fabre M, Mehtali M, Houssin D, Soubrane O. *In vivo* hepatocyte retroviral-mediated gene transfer through the rat biliary tract. *Hum Gene Ther* 1999;10:249-57.
46. Coffin J. Retroviridae: the viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D, Howley P, eds. *Fields Virology*, Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 1767-1847.
47. Miller D, Adam M, Miller A. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1990;10:4239-42.
48. Roe T, Reynolds T, Yu G, Brown P. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 1993; 12:2099-18.
49. Columbano A, Shinozuka H. Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J* 1996; 10:1118-28.
50. LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroent* 1994; 89:S86-S96.
51. Michalopoulos G, DeFrances M. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
52. MacDonald R. "Lifespan" of liver cells. *Arch Intern Med* 1961;107:335-43.
53. Jezequel A, Paolucci F, Benedetti A, Mancini R, Orlandi F. Enumeration of S-phase cells in normal rat liver by immunohistochemistry using bromodeoxyuridine-antibromodeoxyuridine system. *Dig Dis Sci* 1991;36:482-84.
54. Steer C. Liver regeneration. *FASEB J* 1995;9:1396-1400.
55. Higgins G, Anderson R. Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931;12:186-212.
56. Michalopoulos G. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* 1990; 4:176-87.
57. Fabrikant J. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* 1968; 36:551-65.
58. Grisham J. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3*. *Cancer Res* 1962;22:842-49.
59. Rabes H, Wirsching R, Tuzcek H, Iseler G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet* 1976;9:517-32.
60. Noguchi S, Ohba S, Oka T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Endocrinol* 1991;128:425-31.
61. Bosch A, McCray Jr P, Chang S, Ulich T, Simonet W, Jolly D, et al. Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances *in vivo* retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes. *J Clin Invest* 1996;98:2683-87.
62. Lindroos P, Zarnegar R, Michalopoulos G. Hepatocyte growth factor (Hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991;13:743-50.
63. Michalopoulos G, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1992;15:149-55.
64. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989;342:440-43.
65. Jhappan C, Stahle C, Harkins R, Fausto N, Smith G, Merlino G. TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 1990;61:1137-46.
66. Kitsberg D, Leder P. Keratinocyte growth factor induces mammary and prostatic hyperplasia and mammary adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* 1996;13:2507-15.
67. Patijn G, Lieber A, Schowalter D, Schwall R, Kay M. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation *in vivo* and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology* 1998;28:707-16.
68. Patijn G, Lieber A, Meuse L, Winther B, Kay M. High-efficiency retrovirus-mediated gene transfer into the livers of mice. *Hum Gene Ther* 1998;9:1449-56.

Endereço para correspondência:

Dr. José Luiz de Godoy
 Disc. de Cirurgia Pediátrica – Hospital de Clínicas – UFPR
 Rua General Carneiro, 181 – 13º andar
 80060-900 - Curitiba-PR
 Telefone: (41) 360.1870 - Fax: (41) 264.5872
 E-mail: jlgodoy@hc.ufpr.br