

Manipulação da expressão gênica para o entendimento e tratamento de doenças cardiovasculares

Elisardo C. Vasquez*, Silvana S. Meyrelles**

Resumo

O recente anúncio do sucesso do projeto Genoma Humano constitui-se num grande estímulo para os estudos que visam utilizar a transferência de genes com fins terapêuticos clínicos. Devido ao crescente acúmulo de conhecimento sobre técnicas de biologia molecular e de como manipular a expressão dos genes, os pesquisadores também desenvolveram estratégias para a transferência de genes, com as quais esperamos que num futuro próximo possamos corrigir, prevenir e tratar as doenças do ser humano. Os sistemas de transferência de genes baseiam-se no uso de diferentes vetores virais transformados em replicantes-deficientes (tais como o adenovírus, o vírus adeno-associado, o retrovírus e o

vírus herpes simples) e vetores não-virais (tais como oligonucleotídeos antisense, DNA de plasmídeo e lipossomos), os quais vêm sendo estudados durante os últimos dez anos em fisiologia e testados na clínica. Atualmente também estão disponíveis muitos animais transgênicos, aos quais um gene específico foi adicionado (ratos e camundongos) ou retirado (camundongos *knock-out*). Esses animais podem ser usados como modelos de estudo para as diferentes fisiopatologias do ser humano, tais como: insuficiência cardíaca, hipertensão arterial e aterosclerose. Além disso, a estratégia de transferência de genes através de vetores adenovirais pode ser associada com a tecnologia de animais transgênicos para estudar a eficácia da terapia gênica no tratamento de diversas doenças genéticas.

Palavras-chave: Transferência de genes; Vetores virais; Animais transgênicos.

Recebido: 17/10/00 – Aceito: 23/04/00

Rev Bras Hipertens 8: 96-104, 2001

Manipulação da expressão gênica e terapia gênica

A terapia gênica somática consiste na manipulação ou correção da ex-

pressão gênica em células-alvo ou transferência de genes para células com finalidade terapêutica. O primeiro uso da terapia gênica em seres humanos foi iniciado, em 1990, numa garota com imunodeficiência letal causada pela deficiência da adenosina

deaminase, a qual recebeu uma transfusão de linfócitos geneticamente corrigidos e cuja expressão do transgene foi de longa duração¹. Os avanços da biologia molecular nas últimas duas décadas contribuíram muito para o desenvolvimento de técnicas de trans-

*Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia (Emescam) – Vitória, ES

**Programa Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, UFES

ferência *ex vivo*, *in situ*, *in vivo* e *in vitro* de genes visando corrigir ou repor a expressão de determinado gene defeituoso. Estudos que inicialmente tinham como objetivo o tratamento de doenças hereditárias humanas decorrentes de defeitos monogênicos, tal como a fibrose cística, e evoluíram a tal ponto que hoje a terapia gênica é vista como promissora no tratamento de doenças adquiridas, dentre elas aquelas que são de origem poligênica e que afetam a função normal do sistema cardiovascular, tais como a hipertensão arterial, a aterosclerose e o infarto do miocárdio. Além disso, a transferência de genes é utilizada hoje pelos fisiologistas como uma poderosa ferramenta para o entendimento dos diferentes mecanismos da célula normal.

Conforme sugerido por Rios², são necessárias pelo menos dez etapas para que a transferência gênica possa atingir um uso terapêutico nas doenças cardiovasculares: (1) desenvolver um vetor que seja seguro e eficiente; (2) preparar o vetor para transportar o gene de interesse; (3) alterar uma função de tecidos em cultura; (4) alterar a função no vaso sanguíneo *in vitro*; (5) transferir *in vivo* o vetor; (6) alterar a função *in vivo*; (7) corrigir a disfunção em estados fisiopatológicos experimentais; (8) suprimir a resposta imunológica; (9) alterar a função em indivíduos normais e (10) corrigir a disfunção no ser humano.

Embora inúmeros obstáculos já tenham sido superados nos últimos dez anos e a terapia gênica seja atualmente uma das áreas de pesquisa básica e clínica de maior investimento nos países desenvolvidos, ainda estamos muito distantes de um procedimento terapêutico ideal. Para isto, centenas de laboratórios se dedicam constantemente à busca e otimização de sistemas de transferência *in vivo* de genes tendo como base o uso de vetores virais e não-

virais. Todavia, assim como ocorre com os fármacos, os cientistas têm como preocupação superar as dificuldades de dirigir o gene terapêutico especificamente para aquele tecido em estudo ou a ser tratado, evitando assim seus efeitos em células que não são alvo. Outro ponto crítico na terapia gênica é a resposta de rejeição da célula hospedeira, bem como a duração da expressão do gene transferido, as quais dependem de um ou mais fatores, tais como (a) a resposta imune ao vetor viral; (b) a resposta imune à síntese da nova proteína; (c) a persistência do DNA transgênico na célula hospedeira; (d) a capacidade do promotor transgênico manter a produção de RNAm para permitir uma contínua síntese da proteína desejada e (e) a viabilidade da célula hospedeira após a sua transfecção. Em síntese, para que um sistema de transferência de genes para a célula-alvo venha a ser ideal, será necessário que (a) permita a inserção de DNA de vários tamanhos; (b) possa ser facilmente produzido e concentrado; (c) apresente especificidade por células e tecidos; (d) não tenha competência para se reproduzir; (e) permita uma expressão gênica de longa duração; (f) não seja citotóxico e assim garantir a viabilidade da célula hospedeira e (g) não ative o sistema imunológico.

Transferência de genes

Vetores não-virais

Muitas vezes o que se deseja é impedir a expressão de determinado gene para corrigir uma função. Isso pode ser obtido através de seqüências curtas de DNA ou RNA, denominadas oligonucleotídeos antisense, pela propriedade que estes têm de reconhecer seqüências específicas de bases, inibindo a expressão de genes específicos. O oligonucleotídeo antisense pode agir (a) impedindo a maturação

de RNAm pela exclusão de íntrons; (b) promovendo a degradação de fitas duplas de DNA e RNA; (c) impedindo a leitura do RNAm pelos ribossomos e (d) formando uma fita tripla com o DNA nativo e impedindo assim a formação do RNA. Dentre as vantagens dos oligonucleotídeos antisense destacam-se: (a) a seqüência de DNA é específica; (b) a sua captação pelas células é relativamente eficiente; (c) não é tóxico para a célula e (d) não causa resposta imunoinflamatória. A inibição antisense por meio de oligonucleotídeos simples ou associados a lipossomos ou vetores virais tem sido utilizada experimentalmente com sucesso visando impedir a expressão dos genes dos receptores de angiotensina em animais hipertensos³.

Em outras situações o objetivo final é introduzir na célula ou tecido-alvo um gene que ao ser expressado venha a corrigir determinada disfunção. O meio mais simples de transferência de genes para células do organismo é através de DNA de plasmídeo não-associado. Esse método tem como principais vantagens (a) a baixa toxicidade; (b) a ausência de resposta imunoinflamatória e (c) não requer que a célula-alvo esteja em mitose. As principais desvantagens são (a) a dificuldade da molécula DNA polarizada atravessar a membrana lipídica da célula-alvo e (b) a ação de DNases da célula-alvo. Esse tipo de vetor tem-se mostrado mais eficiente na transdução de células musculares esqueléticas e cardíacas.

Uma técnica bastante promissora dentre as não-virais é o emprego de lipossomos, que consiste na mistura do DNA desejado com fosfolipídios, resultando na formação de complexos moleculares hidrofílicos envolvidos com moléculas hidrofóbicas, facilitando assim a passagem do material genético pela membrana celular e protegendo relativamente esse material do ataque enzimático intracelular. Atualmente,

é possível produzir lipossomos uni ou multilamelares e podem ainda ter uma carga elétrica, tornando-os complexos do tipo aniônico ou catiônico. Assim, aumentariam as chances de o transgene atravessar a membrana celular e alcançar o núcleo para utilização da maquinaria de transcrição da célula hospedeira, sem se integrar no seu genoma. Os lipossomos como vetores na terapia gênica destacam-se por (a) ser não-tóxicos; (b) ser não-imunogênicos; (c) poder transferir genes de qualquer tamanho e (d) pela possibilidade de serem transferidos para a maioria dos tecidos. Apesar das vantagens e do constante aprimoramento dos métodos acima descritos para transferência de genes, a utilização destes como ferramenta de estudo em fisiologia ou com fins terapêuticos ainda é muito limitada, devido à baixa taxa de transfecção obtida. A eficiência dos lipossomos como vetores poderá aumentar se forem desenvolvidas técnicas que permitam associar a estes proteínas virais que uma vez reconhecidas pelos receptores de membrana (integrinas) possam iniciar o processo de endocitose, facilitando assim a chegada do material genético até o núcleo da célula-alvo.

Vetores virais

O uso de vetores virais para transferência de genes aproveita-se do fato de os vírus de mamíferos terem desenvolvido mecanismos eficientes para transferência de seu genoma para células hospedeiras. Para isso, os segmentos do genoma viral responsáveis pela sua replicação na célula hospedeira são removidos e substituídos por um gene exógeno de interesse e respectivas seqüências de função promotora e função acentuadora, tornando-o assim um vírus recombinante e também replicante-incompetente. Atualmente, centenas

de estudos de terapia gênica estão sendo realizados em seres humanos nos países desenvolvidos, utilizando-se para isso vetores virais, principalmente retrovírus e adenovírus.

Retrovírus. Os retrovírus foram os primeiros vetores virais usados na clínica e vêm sendo utilizados majoritariamente por possibilitarem uma expressão do transgene estável e mais duradoura que os demais vetores⁴. O adenovírus possui um envelope glicoprotéico contendo duas cópias de RNA, cada uma com aproximadamente 8,8 quilobases (kb) e 3 genes (*gag*, *pol* e *env*), os quais são substituídos por um ou mais genes de interesse. Ao penetrar na célula hospedeira, o retrovírus utiliza uma transcriptase reversa para transformar o seu RNA em uma dupla fita de DNA, o qual se dirige para o núcleo e por ação da integrase viral o provírus se integra aleatoriamente a um cromossomo da célula hospedeira. O provírus integrado utiliza a própria maquinaria da célula hospedeira para sintetizar novos filamentos de RNA e assim originando e organizando o RNA genômico viral e filamentos protéicos que completam a estrutura viral. Portanto, como na produção de retrovírus recombinantes são removidos os genes que codificam proteínas estruturais virais e proteínas mediadoras da replicação viral, linhagens celulares capazes de fornecer estas proteínas poderão ser úteis na produção de vetores contendo os genes de interesse e sem competência para replicação. Na produção laboratorial de vírus recombinantes, a tecnologia disponível possibilita que junto com a substituição do genoma viral pelo transgene de interesse terapêutico, acompanhado da respectiva seqüência de promotor e acentuador, também seja inserido um gene que codifica resistência a antibióticos. Isso possibilita selecionar as células que contêm o vírus recombinante em culturas *ex*

vivo, bem como a subsequente determinação do título do vírus. A completa eliminação do RNAm viral codificado no vírus recombinante impossibilita que antígenos virais possam desencadear respostas imunes nas células hospedeiras transduzidas. Na produção de retrovírus recombinante a partir do vírus da leucemia murina de Moloney, é utilizado um gene de envoltório de uma linhagem específica e assim possibilitando que o poder de transfecção do vírus recombinante não seja restrito às células murinas. A simples estrutura genômica do retrovírus é um dos maiores atrativos para a sua utilização como vetor viral, o qual pode ser administrado por transdução *ex vivo* de células em cultura ou pela administração direta no tecido desejado. Dentre as vantagens do vetor retroviral destacam-se (a) a persistência do transgene, devido à sua integração ao DNA cromossômico da célula hospedeira, e (b) a carência da expressão de proteínas virais na sua superfície e, conseqüentemente, menor resposta imunoinflamatória, devido à remoção completa do RNA viral codificado no retrovírus recombinante. Como desvantagens, destacam-se (a) a dificuldade técnica na purificação e obtenção de altos títulos do vírus recombinante; (b) a possibilidade de originar mutações devido a sua integração aleatória e (c) sua deficiência em transfectar células que não se dividem, tornando-se um ponto crítico, pois no sistema cardiovascular adulto a divisão celular é mínima.

Adenovírus. O adenovírus é atualmente o vetor viral recombinante mais utilizado nos estudos básicos e clínicos que têm por objetivo a transferência de genes para tecidos do sistema cardiovascular. Embora existam mais de 40 sorotipos de adenovírus humanos, comumente encontrados nas vias aéreas superiores, os vetores adenovirais mais utilizados são do sorotipo 5 e 2. Em contraste com os retrovírus, o

adenovírus não possui envelope e contém uma dupla fita de DNA com 36 kb. Fibras protéicas que emergem do capsídeo icosaédrico interagem com receptores (integrinas) na superfície das células hospedeiras, levando à internalização do vírus via endocitose e posterior transferência do seu genoma para o núcleo, onde se inicia a transcrição do RNA viral. Em contraste com os retrovírus, o DNA adenoviral dificilmente se integra ao DNA genômico da célula hospedeira, permanecendo portanto episomal. O adenovírus tornou-se um vetor viral atraente nos estudos de fisiologia e na terapia gênica pela capacidade que este tem de transduzir um amplo espectro de tecidos, incluindo o endotélio vascular, os miócitos cardíacos e as células do sistema nervoso central e periférico, pois o mesmo não requer que a célula hospedeira esteja em divisão. Outra vantagem desse vetor é que ele pode ser administrado por múltiplas vias. A produção laboratorial do vetor adenoviral recombinante baseia-se no uso de plasmídios bacterianos contendo o genoma do adenovírus, no qual os genes E1, responsáveis pela replicação do vetor, bem como a parte não-essencial da região E3 são removidos e substituídos pelo gene de interesse terapêutico e em seguida esse plasmídio vetor é cultivado em meio de cultura bacteriana. Para reprodução do vetor viral recombinante, são utilizadas linhagens 293 de células renais de embrião humano, as quais têm a capacidade de expressar as proteínas E1 necessárias para a reprodução adenoviral, resultando, assim, na produção de adenovírus recombinantes e incompetentes para replicação. A partir desse processo, o vírus recombinante pode ser purificado, concentrado em altos títulos utilizando-se diferentes veículos e sem perda de atividade, desde que mantido a temperaturas ultrabaixas. Dentre as principais vantagens desse vetor

adenoviral destacam-se (a) a produção e manipulação seguras; (b) a fácil obtenção e purificação; (c) a possibilidade de obtenção de altos títulos; (d) a presença das integrinas receptoras em grande variedade de células nos mamíferos; (e) a capacidade para acomodar grande quantidade de material genético e (f) não requerem o processo de mitose para transferência de seu material genético, capacitando-os, assim, para transfectar a maioria das células do sistema cardiovascular. Uma das maiores desvantagens no uso de vetores adenovirais das primeiras gerações deve-se ao fato de estes ainda carregarem uma alta porcentagem do seu genoma original e, conseqüentemente, a expressão de suas proteínas resulta em respostas imunoinflamatórias nas células-alvo usadas para fins de estudo ou terapia gênica. Por isso, e conforme demonstrado em estudos experimentais, a expressão gênica em vários tecidos atinge um pico em aproximadamente 5 dias, decresce para níveis basais em 3 semanas e praticamente é indetectável aos 80 dias pós-transfecção⁵, e a readministração do vetor geralmente não resulta em sucesso⁶. Pelo menos parte desse problema deve ser superado após o desenvolvimento de vetores adenovirais, nos quais genes adicionais estão sendo modificados ou suprimidos visando reduzir a resposta imune das células transduzidas⁷.

Vírus adeno-associado (AAV). Trata-se de um parvovírus, cuja estrutura do genoma é muito simples, possui uma única fita de DNA de 4,7 kb, é encapsulado numa partícula icosaédrica não envelopada e é composto dos genes *rep* e *cap*, os quais respectivamente expressam proteínas responsáveis pela replicação viral e proteínas estruturais. O genoma viral integra-se com alta especificidade ao cromossomo 19 do genoma de células hospedeiras humanas.

O vírus permanece latente na célula hospedeira (é por si só replicante-incompetente) e só passa para uma fase lítica na presença do adenovírus, o qual irá viabilizar o processo expressando seus genes iniciais. O AAV recombinante utilizado com fins de terapia gênica carece das seqüências *rep* e *cap*. Para sua produção é também utilizada a linhagem de células 293 e o processo requer ainda a presença do adenovírus. Em comparação com os retrovírus e adenovírus, a produção de AAV recombinante é um processo difícil. Embora o AAV recombinante seja facilmente purificado e estocado por longo períodos e tenha surgido um vetor viral bastante promissor⁸, o seu uso na terapia gênica é principalmente limitado pela dificuldade em produzi-lo em grandes quantidades, por integrar-se ao genoma da célula hospedeira e pelo diminuto espaço para inserção do gene de interesse terapêutico. Apesar disso, Phillips⁹ tenta demonstrar que este seria um ótimo vetor viral para a transferência de DNA antisense anti-receptores de angiotensina.

Vírus herpes simples. Trata-se de um vírus com DNA dupla fita de 152 kb, capaz de se replicar em células hospedeiras que se dividem e aquelas que não se dividem, nas quais permanece no estado episomal. Dentre as vantagens do seu uso como vetor viral na terapia gênica estão (a) a capacidade para acomodar no seu genoma seqüências de transgenes de 20 a 30 kb; (b) a fácil obtenção de altos títulos e (c) o seu neurotropismo¹⁰. É um dos vetores virais mais estudados visando a doença de Parkinson e o tratamento de tumores cerebrais. Dentre as maiores desvantagens destacam-se a dificuldade técnica em se obter preparações livres de vírus com capacidade replicativa e pelo potencial de toxicidade na célula transduzida.

As doenças do sistema cardiovascular como alvo para a terapia gênica

O desenvolvimento de técnicas de transferência de genes, além de permitir compreender a fisiologia e o processo pelo qual as doenças cardiovasculares se desenvolvem, também proporciona um novo horizonte na terapia gênica e conseqüente aplicação clínica. As demonstrações experimentais de transferência de genes exógenos para o endotélio e células musculares lisas dos vasos sanguíneos são fortes indicadores de que a transferência gênica poderá ser utilizada na clínica para, por exemplo, alterar ou evitar a aterosclerose, produzir vasodilatação ou produzir anticoagulação.

Transferência de genes *ex vivo*

Experimentos em laboratório proporcionaram a obtenção de modelos animais para doenças humanas, bem como o desenvolvimento de estratégias de transferência de genes para posterior utilização com fins clínicos. Utilizando técnicas *ex vivo*, demonstrou-se que é possível utilizar o retrovírus recombinante para transduzir células endoteliais de cães cuja expressão gênica persistia por mais de cinco semanas¹¹.

Experimentos feitos em coelhos com hiperlipidemia hereditária mostraram que através da transferência gênica *ex vivo* dos receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) é possível reduzir esse distúrbio¹². Para isso, culturas de hepatócitos dos animais com hiperlipidemia foram expostos ao retrovírus recombinante, que expressa o receptor de LDL, e depois os hepatócitos transduzidos foram injetados via veia porta no mesmo animal. Esses estudos laboratoriais abriram caminho para posteriores estudos utili-

zando a transferência *ex vivo* para tratamento de pacientes com hipercolesterolemia familiar¹³. Todavia, a utilização dessa técnica em laboratório e principalmente na clínica requer um rigoroso controle para impedir a contaminação durante a coleta das células e o reimplante das mesmas após transduzidas.

Transferência de genes *in vivo*

Uma das estratégias para transferência de genes mais estudadas tem sido a técnica *in vivo* de transferência gênica, a qual consiste em injetar o vetor viral codificando o gene de interesse diretamente no tecido¹⁴ do organismo ou nas células de tecidos dissociados e mantidas em cultura¹⁵.

Uma das técnicas desenvolvidas e já testada por vários pesquisadores no sistema cardiovascular consiste em utilizar um cateter de balão duplo que promove o isolamento do segmento arterial desejado, no qual é aplicada a solução contendo o gene de interesse^{16,17}. Todavia, a aplicação intraluminal vascular de vetores virais oferece algumas limitações, dentre as quais destacamos o fato de a transferência do gene ficar limitada àquele segmento. Outro potencial da terapia gênica é a demonstração num modelo experimental de re-estenose mostrando que o uso de um vetor adenoviral codificando a timidina e associado com a ganciclovir efetivamente bloqueia a hiperplasia do músculo liso arterial¹⁸, resultado este que pode ter aplicabilidade nas re-estenoses que ocorrem em pacientes submetidos à angioplastia coronária.

Vários estudos experimentais e clínicos mostram que a transferência de genes pode ser utilizada para induzir a produção de fatores de crescimento endotelial vascular e de fibroblastos e, conseqüentemente, induzir a angiogênese terapêutica aplicada no tratamento de isquemia do miocárdio e na insuficiência arterial periférica¹⁹⁻²². O

miocárdio é obviamente outro alvo para a transferência gênica. Embora os miócitos em cultura possam ser facilmente transduzidos por vetores adenovirais, a transferência *in vivo* de genes para o miocárdio ainda conta com vários obstáculos a serem superados, conforme observado em experimentos com porcos e cães²³⁻²⁵.

A aterosclerose é outra doença-alvo que tem motivado as pesquisas de transferência *in vivo* de genes em animais experimentais. Nessa linha de pesquisa, há estudos mostrando uma drástica redução na meia-vida da LDL de camundongos normais após a administração intravenosa de vetores adenovirais codificando o gene do receptor de LDL²⁶.

Experimentos em ratos com hipertensão arterial mostraram que é possível obter uma significativa redução da pressão arterial após manipulação gênica para aumentar a expressão do gene da calicreína ou diminuir a produção de angiotensinogênio^{27,28}. Também a injeção intracerebroventricular de vírus adeno-associados codificando um antisense anti-receptores de angiotensina II foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos geneticamente hipertensos por até 9 semanas⁹. Recentemente nós desenvolvemos uma estratégia para transferência de genes visando futuramente repor o gene da vasopressina na *diabetes insipidus* hereditária e assim restaurar a homeostase cardiovascular e o controle dos fluidos no organismo²⁹. Para isso, injetamos o vetor adenoviral recombinante e replicante-deficiente na neurohipófise de camundongos e verificamos que após 4 dias o vetor viral havia se deslocado retrogradamente pelas terminações axônicas para os neurônios produtores de vasopressina que estão localizados em núcleos hipotalâmicos. Isso mostra que podemos utilizar estratégias e propriedades virais, ainda que experimentais neste momento, para seletiva-

mente expressar o gene de interesse em tecidos específicos.

Transferência de genes *in vitro*

Estudos de transferência *in vitro* de genes para vasos sanguíneos têm contribuído significativamente para o entendimento da fisiologia e de várias fisiopatologias do sistema vascular. Devido à importância dada à descoberta do óxido nítrico como fator de relaxamento derivado do endotélio, a maioria das pesquisas sobre transferência de genes para vasos isolados nos últimos tem focado principalmente o gene que expressa a óxido nítrico sintase endotelial. Alguns desses estudos mostram que a aplicação de vetores adenovirais codificando o gene que expressa essa enzima em artérias carótidas comuns de coelhos³⁰ e artérias basílicas de cães³¹ resulta em aumento significativo do relaxamento dos vasos frente a estímulos apropriados.

Animais transgênicos

Reconhecidamente, modelos clássicos de animais experimentais têm contribuído significativamente para o entendimento da fisiologia e das diferentes fisiopatologias do ser humano. Na área de doenças cardiovasculares temos como exemplos de tais contribuições (a) o modelo de desnervação dos barorreceptores sino-aórticos no rato; (b) os modelos de hipertensão renovascular renina-dependente e volume-dependente no rato e (c) o rato com hipertensão genética (SHR – *spontaneously hypertensive rat*).

A partir das últimas duas décadas, o desenvolvimento de procedimentos de biologia molecular e de manipulação de genes possibilitou a produção de animais transgênicos por modificação, deleção ou adição de genes, os quais muito têm auxiliado no entendimento das fisiopatologias cardiovasculares e a reprodução experimental de doenças

causadas por mutação³². O procedimento para gerar um animal transgênico geralmente consiste em introduzir aleatoriamente um transgene no genoma do animal, o qual se espera que seja transmitido às próximas gerações e o qual irá alterar uma determinada função do organismo. Todavia, a expressão transgênica é dependente de vários fatores, tais como o tipo de promotor e elementos acentuadores, o número de cópias incorporadas e o *locus* onde ocorreu a integração do transgene. No entanto, está em ritmo acelerado o aprimoramento da tecnologia de transgênicos que permitirá superar esses problemas e poderemos então regular o momento certo e o nível de expressão desejado do transgene e, além disso, inativar o gene de interesse de modo a garantir a especificidade pelo tecido.

A aterosclerose é uma das doenças-alvo, que motivou a utilização de técnicas de manipulação genética de células embrionárias viáveis no camundongo, as quais consistem em gerar mutantes nulos para determinados genes relacionados com aterosclerose, animais estes denominados *knock-out*³³. Atualmente estão disponíveis para o pesquisador camundongos *knock-out* para receptores de LDL humanos e para apolipoproteínas (apoA e apoE), os quais apresentam elevados níveis de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e intermediária (IDL). Interessante que a tecnologia de geração de camundongos *knock-out* pode ser associada com a de transferência de genes, numa demonstração que a terapia gênica pode ser utilizada para corrigir a ausência congênita de certos genes. Por exemplo, foi demonstrado que a injeção de vetores adenovirais codificando o receptor de LDL humano ou ApoE era capaz de normalizar os níveis séricos de lipoproteínas, bem como prevenir a aterosclerose de camundongos *knock-out* para receptores LDL ou ApoE³⁴⁻³⁷. Recentemente nós também demons-

tramos em camundongos *knock-out* para ApoE que a disfunção do reflexo barorreceptor podia ser revertido pela aplicação de solução adenoviral codificando o gene da superóxido desmutase e catalase no seio carotídeo³⁸.

O fenótipo do animal transgênico é altamente dependente da espécie, em que por exemplo a superexpressão do gene humano para renina ou angiotensinogênio resulta em hipertensão arterial no rato, mas não no camundongo. Por outro lado, o camundongo transgênico para renina humana só é capaz de produzir angiotensina I se ele também for transgênico para expressar o angiotensinogênio humano. Além disso, camundongos *knock-out* para um determinado gene não necessariamente irão apresentar o fenótipo esperado. Por exemplo, camundongos *knock-out* para endotelina 1 inesperadamente apresentam leve aumento da pressão arterial quando heterozigotos, provavelmente devido à interferência de outros fatores de regulação cardiovascular. Por outro lado, os camundongos *knock-out* homozigotos para o gene da endotelina 1 não sobrevivem devido à manifestação de anormalidades craniofaciais e respiratórias. A tabela 1 mostra alguns exemplos de modelos de adição e deleção de genes em animais transgênicos utilizados como modelos de doenças cardiovasculares.

Conclusões e perspectivas

Passos fundamentais foram dados nas pesquisas básicas e clínicas de manipulação de genes, o que no futuro poderá revolucionar a prática de medicina de como tratar, curar e prevenir um vasto espectro de doenças cardiovasculares. Apesar de vários vetores virais e não-virais estarem hoje aperfeiçoados e disponíveis para o fisiologista e clínico, ainda estamos muito longe de dispormos de um sistema de

transferência de genes que seja ao mesmo tempo (a) seguro; (b) de efeitos marcantes e duradouros no tecido-alvo e (c) que, assim como desejaríamos para a farmacoterapia clássica, que tenha especificidade pelo tecido-alvo e

não cause efeitos colaterais. A manipulação gênica também está possibilitando o desenvolvimento de animais transgênicos, os quais já são centenas deles e que estão servindo como uma nova ferramenta de estudo na fisiologia

e como modelos para doenças genéticas do ser humano. Infelizmente, as tecnologias de biologia molecular e de manipulação de genes são de custos elevados e, portanto, acessíveis para muito poucos cientistas no Brasil.

Manipulação gênica	Fenótipo	Referência
Gene adicionado		
Renina (c)	Hipertensão (r)	39
Renina (h)	Hipertensão (r)	40
Angiotensinogênio (h)	Hipertensão (r)	40
Angiotensinogênio (r)	Hipertensão (c)	41
Renina/angiotensinogênio (h)	Hipertensão e disfunção do barorreflexo (c)	42
Peptídio natriurético atrial	Hipotensão	43
Vasopressina	<i>Diabetes insipidus</i> nefrogênica	44
Receptor de LDL	Proteção contra aterosclerose	45
Apolipoproteína E	Menor risco de aterosclerose	46
Receptor adrenérgico α_1	Hipertrofia ventricular	47
α -miosina cardíaca de cadeia pesada	Hipertrofia ventricular	48
Fator miogênico	Insuficiência cardíaca	49
Gene deletado (knock-out)		
Endotelina 1	Leve hipertensão (heterozigoto)	50
Receptor de bradicinina B ₂	Hipertensão com dieta em sal	51
Receptor de LDL	Hiperlipidemia e aterosclerose	34
Apolipoproteína E	Hiperlipidemia e aterosclerose	52
Apolipoproteína/receptor de LDL	Aterosclerose severa e remodelamento vascular	53
Óxido nítrico sintase endotelial	Hipertensão e aumento da variabilidade pressórica	54, 55

Tabela 1 – Exemplos de alguns modelos de adição e deleção de genes em animais experimentais para alterar fenótipos associados com doenças cardiovasculares. Abreviaturas: (c) camundongo; (r) rato; (h) humano.

Abstract

Manipulation of gene expression for the understanding and treatment of cardiovascular diseases

The reported good progress of the Human Genome Project supports the medical potential of gene-based therapies. With increasing knowledge of molecular biology techniques and how to manipulate gene expression researchers have developed strategies of gene delivery that in the near future will enable us to correct, prevent and treat human diseases. Gene delivery systems are based on

the use of several engineered viral (such as adenovirus, adeno-associated virus, retroviruses and herpes simplex virus) and non-viral vectors (such as naked DNA and liposomes) which have been studied in physiology and tested in clinical trials during the last decade. Additionally, there are available many transgenic animals in which a specific gene was inserted (rat and mouse) or deleted (*knock out* mouse) to be used as animal models of human diseases, such as heart failure, arterial hypertension and atherosclerosis. Also, the strategies of adenoviral-mediated gene delivery and transgenic animals can be associated to study the effectiveness of gene therapy for treatment of genetic diseases.

Keywords: Gene delivery; Viral vectors; Transgenic animals.

Referências

1. Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-80, 1995.
2. Rios CD, Chu Y, Davidson BL et al. Ten steps to gene therapy for cardiovascular diseases. *J Lab Clin Med* 132: 104-111, 1998.
3. Phillips MI. Antisense inhibition and adeno-associated viral vector delivery for reducing hypertension. *Hypertension* 29(Pt 2): 177-87, 1997.
4. Miller AD, Miller DG, Garcia JV, et al. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Meth Enzymol* 217: 581-99, 1993.
5. Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* 334: 1185-7, 1996.
6. Schulick AH, Vassalli G, Dunn PF et al. Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries: potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J Clin Invest* 99: 209-19, 1997.
7. Engelhardt JF, Litzky L, Wilson JM. Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenovirus defective in E2a. *Human Gene Ther* 5: 1217-29, 1994.
8. Kotin RM. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Human Gene Ther* 5: 793-801, 1994.
9. Phillips MI, Mohuczy-Dominiak D, Coffey M et al. Prolonged reduction of high blood pressure with an in vivo nonpathogenic, adeno-associated viral vector delivery of AT1-R mRNA antisense. *Hypertension* 29: 374-80, 1997.
10. Kennedy PGE, Steiner I. The use of herpes simplex virus vectors for gene therapy in neurological diseases. *Q J Med* 86: 697-702, 1993.
11. Wilson JM, Birinyi LK, Salomon RN, et al. Implantations of vascular grafts lined with genetically modified endothelial cells. *Science* 244: 1344-6, 1989.
12. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, et al. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 254: 1802-5, 1991.
13. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6: 335-41, 1994.
14. Meyrelles SS, Mao HZ, Heistad DD, et al. Gene transfer to carotid sinus in vivo: A novel approach to investigation of baroreceptors. *Hypertension* 30(Pt 2): 708-13, 1997.
15. Meyrelles SS, Sharma RV, Whites CA et al. Adenovirus-mediated gene transfer to cultured nodose sensory neurons. *Mol Brain Res* 51: 33-41, 1997.
16. Barr E, Carron J, Kalyuyeh AM et al. Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. *Gene Ther* 1: 51-8, 1994.
17. Marshall DJ, Palasis M, Lepore JJ et al. Biocompatibility of cardiovascular gene delivery catheters with adenovirus vectors: An important determinant of the efficiency of cardiovascular gene transfer. *Mol Ther* 5: 423-9, 2000.
18. Ohno T, Gordon D, San H et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 265: 781-4, 1994.
19. Muhlhauser J, Pili R, Merrill MJ et al. In vivo angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted and non-secreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Human Gene Ther* 6: 1457-65, 1995.
20. Takeshita S, Weir L, Zheng LP et al. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hind limb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 628-35, 1996.
21. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97: 1114-23, 1998.
22. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R et al. Clinical evidence of angiogenesis after gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348: 370-4, 1996.
23. Muhlhauser J, Jones M, Yamada I et al. Safety and efficacy of in vivo gene transfer into the porcine heart with replication-deficient recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 3: 145-53, 1996.
24. French BA, Mazur W, Geske RS et al. Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenovirus vectors. *Circulation* 90: 2414-24, 1994.
25. Li JJ, Ueno H, Pan Y et al. Percutaneous transluminal gene transfer into canine myocardium in vivo by replication-defective adenovirus. *Cardiovasc Res* 30: 97-105, 1995.
26. Herz J, Gerard RD. Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2812-6, 1993.
27. Xiong W, Chao J, Chao L. Muscle delivery of human kallikrein gene reduces blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* 25: 715-9, 1995.
28. Tomita N, Morishita R, Higaki J et al. Transient decrease in high blood pressure by in vivo gene transfer of antisense oligodeoxynucleotides against rat angiotensinogen. *Hypertension* 26: 131-6, 1995.
29. Vasquez EC, Beltz TG, Meyrelles SS et al. Adenovirus-mediated gene delivery to hypothalamic magnocellular neurons in mice. *Hypertension* 34(Pt 2): 756-61, 1999.
30. Ooboshi H, Chu Y, Rios CD et al. Altered vascular function after adenovirus-mediated overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 273: H265-H270, 1997.
31. Chen AFY, O'Brien T, Tsutsui M et al. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery. *Circ Res* 80: 327-35, 1997.
32. Franz W-M, Mueller OJ, Hartong R et al. Transgenic animal models: new avenues in cardiovascular physiology. *J Mol Med* 75: 115-129, 1997.
33. Hofker MH, van Vlijmen BJM, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137: 1-11, 1998.
34. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus mediated gene delivery. *J Clin Invest* 95: 883-93, 1993.

35. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M et al. Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat Genet* 13: 54-62, 1996.
36. Stevenson SC, Marshall-Neff J, Teng B et al. Phenotypic correction of hypercholesterolemia in apoE-deficient mice by adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 479-84, 1995.
37. Kashyap VS, Santamarina-Fojo S, Brown DR et al. Apolipoprotein E deficiency in mice: gene replacement and prevention of atherosclerosis using adenovirus vectors. *J Clin Invest* 96: 1612-20, 1995.
38. Meyrelles SS, Chapleau MW. Impaired carotid occlusion reflex in apoE deficient mice and its reversal by gene transfer to carotid sinus. *J Hypertension* 18 (Suppl 4): S202, 2000.
39. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344: 541-4, 1990.
40. Ganten D, Wagner J, Zeh K et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7806-10, 1992.
41. Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B et al. High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *EMBO J* 11: 821-7, 1992.
42. Merrill DC, Thompson MW, Carney CL et al. Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes. *J Clin Invest* 97: 1047-55, 1996.
43. Steinhilber ME, Cochrane KL, Field LJ. Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes. *Hypertension* 16: 301-7, 1990.
44. Habener JF, Cwikel B, Hermann H, et al. Expression of a metallothionein-vasopressin fusion gene in transgenic mice produces hypervasopressina and manifestations of nephrogenic diabetes insipidus. *Trans Ass Am Physicians* 101: 155-62, 1988.
45. Hofmann SL, Russell DW, Brown MS. Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science* 239: 1277-81, 1988.
46. Shimano H, Yamada N, Katsuki M et al. Overexpression of apolipoprotein E in transgenic mice: marked reduction in plasma lipoproteins except high density lipoprotein and resistance against diet-induced hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1750-4, 1992.
47. Milano CA, Dolber PC, Rockman HA et al. Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10109-13, 1994.
48. Vikstrom KL, Factor SM, Leinwand LA. A murine model for hypertrophic cardiomyopathy. *Z Kardiol* 84 (Suppl 4): 49-54, 1995.
49. Edwards JG, Lyons GE, Micales BK et al. Cardiomyopathy in transgenic mice. *Circ Res* 78: 379-87, 1996.
50. Karihara Y, Kurihara H, Suzuki H et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703-10, 1995.
51. Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, et al. Effects of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension* 29: 483-7, 1997.
52. Zhang SM, Reddick RL, Piedrahita JA et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-71, 1992.
53. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA et al. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2333-40, 1997.
54. Huang PL, Huang Z, Mashimo H et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-42, 1995.
55. Stauss HM, Gödecke A, Mrowka R et al. Enhanced blood pressure variability in eNOS knock out mice. *Hypertension* 33: 1359-63, 1999.