

**IGOR CORRÊA DA COSTA BRAGA**

**EFEITO DA TERAPIA GÊNICA COM O FATOR  
DERIVADO DE EPITÉLIO PIGMENTADO (PEDF) VIA  
VETOR VIRAL AAV8 EM MODELO MURINO DE  
SILICOSE.**



**Monografia apresentada ao  
Instituto de Microbiologia Paulo  
de Góes, da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro, como pré-  
requisito para a obtenção do Grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
DEZEMBRO / 2017**

Trabalho a ser realizado no Departamento de Terapia Celular e Bioengenharia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Sabrina V. Martini

## FICHA CATALOGRÁFICA

CB813e      Correa da Costa Braga, Igor  
                  EFEITO DA TERAPIA GÊNICA COM O FATOR  
                  DERIVADO DE EPITÉLIO PIGMENTADO (PEDF)  
                  VIA VETOR VIRAL AAV8 EM MODELO MURINO  
                  DE SILICOSE.  
Igor Correa da Costa Braga. -- Rio de Janeiro, 2017.  
66 f.

Orientadora: Sabrina Vargas Martini. Trabalho  
de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de  
Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2017.  
Bibliografia: f.59-66

1. Terapia gênica. 2. Silicose. 3. Adenovírus  
Associado. 4. PEDF. I. Vargas Martini, Sabrina,  
orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

IGOR CORRÊA DA COSTA BRAGA

EFEITO DA TERAPIA GÊNICA COM O FATOR DERIVADO DE EPITÉLIO  
PIGMENTADO (PEDF) VIA VETOR VIRAL AAV8 EM MODELO MURINO DE  
SILICOSE.

Rio de Janeiro 7 de dezembro de 2017

---

(Luciana Barros de Arruda, Doutora, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes)

---

(Renata de Meirelles Santos Pereira, Doutora, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes)

---

(Debora Pires Ferreira, Mestre e Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho)

---

(Luciana Jesus da Costa, Doutora, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes)

Dedico esse trabalho à Deus, por toda a força que me forneceu e por todas as pessoas que colocou em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Sabrina Martini e ao professor Marcelo Morales, pela sabedoria e pelos esforços para me tornar um aluno sempre melhor.

À professora Hilda Petrs-Silva, pelo fornecimento dos vetores necessários para a realização desse trabalho.

Aos companheiros de laboratório pelos ensinamentos passados a mim e pelos momentos de descontração que tornaram a execução deste trabalho bem mais prazerosa. E, principalmente, pela paciência comigo por todo esse tempo de convivência.

A todos os professores de graduação por toda a ajuda e ensinamentos que me ajudaram a realizar este estudo.

Aos meus pais, Karen e Luiz Claudio, por toda a educação, todo amor, auxílio e sacrifício que sempre fizeram para o meu bem e por estarem sempre ao meu lado, fornecendo apoio em tudo, desde o meu nascimento.

Ao meu irmão, Yuri, por todo amor demonstrado, todo apoio, ajuda, por todas as brigas e brincadeiras, além de seu companheirismo fornecido desde que nasceu.

À minha namorada, Karina, por todo amor, por cada palavra de força e apoio que me deu nos momentos mais difíceis, pelo companheirismo, pela cumplicidade, por ser meu porto seguro e por fornecer os dias mais felizes da minha vida.

Aos meus primos e melhores amigos, que estão sempre ao meu lado querendo o melhor para mim, por todas as vezes que levantaram meu animo e lutaram junto comigo e pelos momentos mais engraçados e divertidos da minha vida.

Aos meus padrinhos, Karla e Evenilson, por serem meus segundos pais, por me amarem como filho, estarem sempre me ensinando e me guiando para o melhor, por todo apoio e por todos pelos puxões de orelha que me deram.

A todos os familiares que são tão importantes na minha vida, por me acompanharem de perto desde meu nascimento, me dando apoio, e por todos os momentos maravilhosos na minha vida que proporcionaram.

Aos órgãos fomentadores, FAPERJ, CAPES e CNPq por viabilizarem a realização desse estudo.

## RESUMO

IGOR CORREA DA COSTA BRAGA

EFEITO DA TERAPIA GÊNICA COM O FATOR DERIVADO DE EPITÉLIO PIGMENTADO (PEDF) VIA VETOR VIRAL AAV8 EM MODELO MURINO DE SILICOSE.

Orientadora: Sabrina Vargas Martini

A silicose é uma doença ocupacional relacionada à exposição de trabalhadores a partículas de sílica. A inalação da sílica leva a um processo inflamatório crônico do sistema respiratório e, posteriormente, uma doença fibrosante do parênquima pulmonar. Até o momento, não há um tratamento eficiente para impedir ou minimizar a evolução desta enfermidade. A terapia gênica, que em seu termo mais amplo, significa o tratamento de doenças genéticas ou adquiridas pela introdução de genes exógenos nas células de pacientes, surge como uma alternativa para o tratamento da silicose. Pode ser utilizado sistemas de transferência gênica tanto virais quanto não virais. Dentre os vetores virais, o adenovírus associado 8 (AAV8) surgiu como um vetor promissor para o tratamento de doenças respiratórias, pois, apresenta um tropismo natural para as células epiteliais das vias aéreas e é pouco imunogênico. Um gene promissor para a utilização na terapia gênica em silicose é o fator derivado de epitélio pigmentado (PEDF), pois ele possui atividade antiangiogênica, anti-inflamatória, antifibrótica e antioxidante. Portanto, o presente estudo visa demonstrar o potencial terapêutico do PEDF na silicose. Nesse contexto, foi avaliada a hipótese de que o gene codificador do PEDF, entregue pelo vetor AAV8, reduz a inflamação e o remodelamento pulmonar em modelo murino de silicose. Para tal, camundongos C57BL/6 fêmeas (20-25g) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (C) e sílica (SIL). O grupo controle foi subdividido em C-SAL e C-PEDF, e o grupo sílica (instilados com 20 mg/50 µL de sílica) subdividido em SIL-SAL e SIL-PEDF. Os animais dos subgrupos salina, C-SAL e SIL-SAL, foram instilados com 50 µl de salina, intratraquealmente (it) e os animais dos subgrupos PEDF, C-PEDF e SIL-PEDF, foram instilados com o vetor AAV8 carreando o gene codificador do PEDF (AAV8-PEDF),  $10^{10}$  vg em 50 µL de salina, it. Realizamos três modelos experimentais: 1) vetor AAV8-PEDF instilado 15 dias depois da instilação de sílica, 2) vetor AAV8-PEDF instilado 1 dia antes da instilação de sílica e 3) vetor AAV8-PEDF instilado 28 dias antes da

instilação de sílica. A quantidade relativa de RNAm, a mecânica respiratória e fração de área de granuloma foram investigados. A instilação de sílica provocou alterações histológicas no parênquima pulmonar, como a presença de granulomas (modelo 1 e 3), além de causar alta taxa de mortalidade. No modelo 1 não foi observado melhoras na função e histologia pulmonar, além da baixa expressão do gene PEDF no subgrupo SIL-PEDF. No modelo 2, os resultados da mecânica respiratória sugerem ausência do desenvolvimento da doença, também sendo observado redução na expressão do gene PEDF no subgrupo SIL-PEDF em comparação ao subgrupo C-PEDF. No terceiro modelo, não foi observada melhora na função e histologia pulmonar no subgrupo SIL-PEDF, além desse subgrupo apresentar uma diminuição da expressão do gene PEDF em relação ao subgrupo C-PEDF. Devido a alta taxa de mortalidade (modelo 2 e 3) o número experimental foi baixo, sendo necessário seu aumento para confirmação dos resultados. Portanto, mais estudos serão realizados para determinar o efeito da terapia gênica com o PEDF no tratamento silicose.

Palavras-chave: Terapia gênica, Silicose, Adenovírus associado, PEDF.



## ABSTRACT

IGOR CORREA DA COSTA BRAGA

EFFECT OF GENE THERAPY WITH THE PIGMENTED EPITHELIUM DERIVED  
FACTOR (PEDF) VIA VIRAL VECTOR AAV8 IN MURINO SILICOSE MODEL.

Orientadora: Sabrina Vargas Martini

Silicosis is an occupational disease related to exposure of workers to silica particles. Inhalation of silica leads to a chronic inflammatory process of the respiratory system and, subsequently, a fibrosing disease of the lung parenchyma. To date, there is no efficient treatment to prevent or minimize the evolution of this disease. Gene therapy, which in its broadest term means the treatment of genetic diseases or acquired by the introduction of exogenous genes into the cells of patients, appears as an alternative for the treatment of silicosis. Both viral and non-viral gene transfer systems may be used. Among the viral vectors, the associated adenovirus 8 (AAV8) has emerged as a promising vector for the treatment of respiratory diseases, since it presents a natural tropism for the airway epithelial cells and is poorly immunogenic. A promising gene for use in silicosis gene therapy is pigmented epithelium-derived factor (PEDF), as it has antiangiogenic, anti-inflammatory, antifibrotic and antioxidant activity. Therefore, the present study aims to demonstrate the therapeutic potential of PEDF in silicosis. In this context, we hypothesized that the gene encoding PEDF, delivered by the AAV8 vector, reduces inflammation and pulmonary remodeling in a murine model of silicosis. For this, female C57BL / 6 mice (20-25g) were randomly divided into two groups: control (C) and silica (SIL). The control group was subdivided into C-SAL and C-PEDF, and the silica group (instilled with 20 mg / 50  $\mu$ L of silica) subdivided into SIL-SAL and SIL-PEDF. The animals of the subgroups PEDF, C-PEDF and SIL-PEDF were instilled with the AAV8 vector carrying the gene. The animals of the subgroups saline, C-SAL and SIL-SAL were instilled with 50  $\mu$ l of saline, intratracheally (it) PEDF encoder (AAV8-PEDF), 1010 vg in 50  $\mu$ l saline, it. We performed three

experimental models: 1) AAV8-PEDF vector instilled 15 days after silica instillation, 2) AAV8-PEDF vector instilled 1 day prior to silica instillation, and 3) AAV8-PEDF vector instilled 28 days prior to instillation of silica. The relative amount of mRNA, respiratory mechanics and fraction of granuloma area were investigated. Silica instillation caused histological alterations in the pulmonary parenchyma, such as the presence of granulomas (model 1 and 3), in addition to causing a high mortality rate. In model 1 no improvement in pulmonary function and histology was observed, besides the low PEDF gene expression in the SIL-PEDF subgroup. In model 2, the results of respiratory mechanics suggest absence of disease development, and a reduction in PEDF gene expression was observed in the SIL-PEDF subgroup compared to the C-PEDF subgroup. In the third model, there was no improvement in lung function and histology in the SIL-PEDF subgroup, in addition to this subgroup there was a decrease in the expression of the PEDF gene in relation to the subgroup C-PEDF. Due to the high mortality rate (model 2 and 3) the experimental number was low, and its increase was necessary to confirm the results. Therefore, further studies will be conducted to determine the effect of gene therapy with PEDF on silicosis treatment.

Key words: Gene Therapy, Silicosis, Adeno-associated virus, PEDF.

ÍNDICE		
1	INTRODUÇÃO	12
1.1	SILICOSE	12
1.2	TERAPIA GÊNICA	16
1.3	VETORES VIRAIS NA TERAPIA GÊNICA	17
1.4	ADENOVÍRUS ASSOCIADOS	19
1.5	DESAFIOS NA TERAPIA GÊNICA VIA AAV	23
1.6	VETORES MUTANTES	24
1.7	TERAPIA GÊNICA PULMONAR	25
1.8	ADENOVÍRS ASSOCIADO 8	26
1.9	PEDF	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVOS GERAIS	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS	31
4.2	VETOR	31
4.3	MODELO MURINO DE SILICOSE	31
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
4.5	INSTILAÇÃO INTRATRAQUEAL	35
4.6	MECÂNICA RESPIRATÓRIA IN VIVO	35
4.6.1	MÉTODO DE OCLUSÃO AO FINAL DA INSPIRAÇÃO	37
4.7	REMOÇÕES DOS PULMÕES	39
4.8	HISTOLOGIA PULMONAR	40
4.8.1	FIXAÇÃO E PREPARO DAS LÂMINAS PARA MICROSCOPIA	40
4.8.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA	40
4.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	41
4.9.1	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	41
4.9.2	TRANSCRIÇÃO REVERSA	42
4.9.3	PCR EM TEMPO REAL	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS	44
5.1	MORTALIDADE	44
5.2	MECÂNICA RESPIRATÓRIA	45
5.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE PELA TÉCNICA DE RT-PCR	47
5.3.1	RT-PCR hPEDF	47
5.4	ÁREA DE GRANULOMA	48
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	57
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	58
9	REFERÊNCIAS	59

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – SILICOSE

A sílica é o segundo mineral mais abundante na terra, podendo ser encontrada em duas formas distintas, a forma amorfa e a forma cristalina. Sua forma mais tóxica é a cristalina, essa forma é fibrogênica para o pulmão, quando inalada tem a capacidade de desenvolver a silicose. Na forma amorfa a inalação de sílica não gera o desenvolvimento da silicose, porém ela não é completamente inócua, podendo gerar outras pneumoconioses (doença pulmonar decorrente da inalação de poeiras minerais). Para que a partícula de sílica seja inalada e tenha a capacidade de se depositar no trato respiratório, é essencial que ela apresente 10 µm de diâmetro ou menos (C. FLORES, 2016).

A inalação da partícula de sílica por trabalhadores, submetidos a exposição, gera um processo inflamatório que resulta em uma doença fibrogênica, a silicose. A silicose é um problema de saúde pública e está presente no mundo todo, principalmente em países em desenvolvimento. Atualmente, no Brasil, é esperado que mais de 6 milhões de trabalhadores espalhados pelo território nacional estejam sendo expostos à poeira de sílica e, apesar dos mecanismos produzidos para a prevenção da inalação da poeira de sílica, a doença continua se desenvolvendo nos trabalhadores do mundo todo (M.L. PACHECO, 2012; M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016).

Nódulos silicóticos caracterizam a lesão causada pela exposição à sílica e são formados por agregados de células polimorfonucleares e mononucleares que se associam à partícula de sílica e se arranjam em torno de uma região central de colágeno (CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000). Tais lesões se assemelham à granulomas. Com a impossibilidade de eliminação da partícula de sílica, ela permanece no pulmão, o que gera uma progressiva proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno. Com o passar do tempo o depósito de colágeno, que antes era central, se expande e se torna concêntrico, resultando na diminuição das células inflamatórias periféricas (BARBOZA *et al.*, 2008). Lesões de 1 cm, ou mais, de diâmetro são formadas a partir da confluência dos nódulos silicóticos, (LEUNG, SUN YU, CHEN, 2012) o que gera a destruição do parênquima pulmonar. A silicose é uma das pneumoconioses mais ocorrentes no mundo (STEENLAND, WARD, 2014).

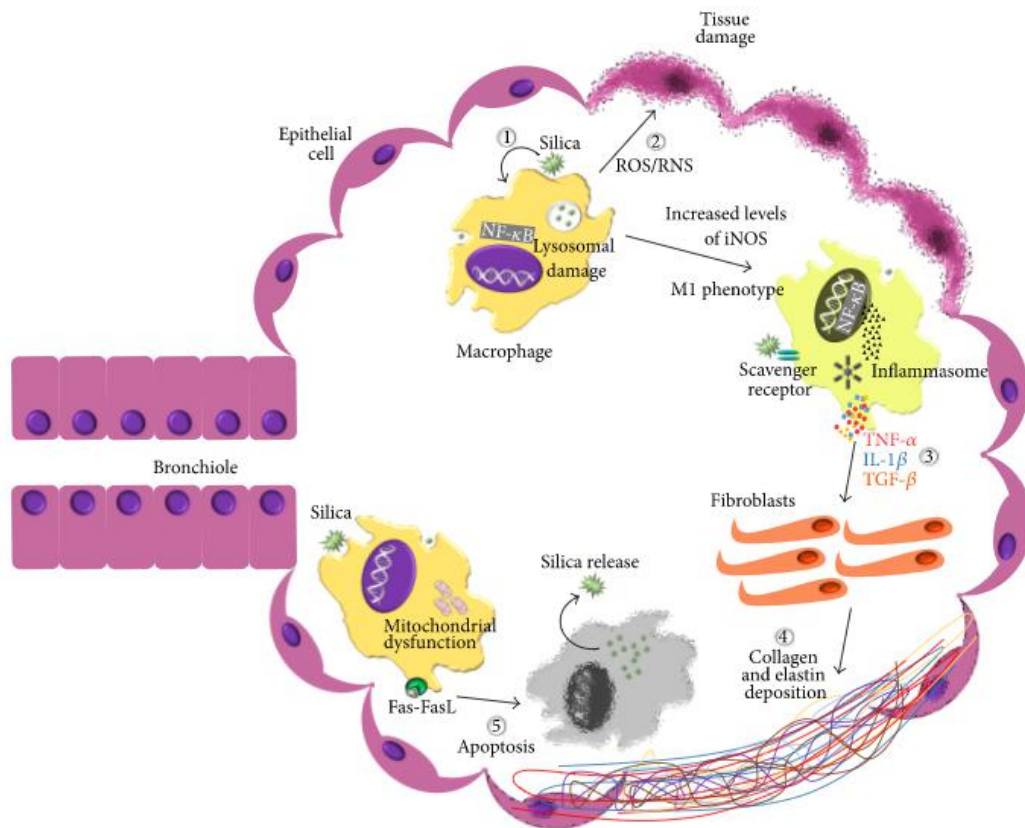
O ciclo inflamatório da silicose é desencadeado por 5 mecanismos essenciais: 1) citotoxicidade direta; 2) ativação de geração de oxidantes; 3) estimulação da secreção de citocinas e quimiocinas; 4) estimulação da secreção de fatores fibrogênicos; 5) morte celular por apoptose (G. N. JOSHI & D. A. KNECHT, 2013; M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016) (Figura 1).

A citotoxicidade direta ocorre devido a capacidade da partícula de sílica em adquirir polaridade elétrica (piezoelectricidade). Podendo interagir diretamente, através da superfície água-ar, com as células da membrana broncoalveolar e causar peroxidação lipídica, o que leva a ruptura da membrana plasmática e lisossomal, causando, conseqüentemente, uma lesão tecidual (M.L. PACHECO, 2012; M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016) (figura 1).

No segundo mecanismo, pela capacidade da sílica de aumentar a atividade da cadeia respiratória nos macrófagos alveolares (MAs), com o aumento do consumo de oxigênio, ocorre a ativação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NOS) em nível acima do suportado pela defesa antioxidante do pulmão, gerando lesão celular, aumento de ativação de MAs e proliferação de pneumócito tipo II (M.L. PACHECO, 2012; M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016) (figura 1).

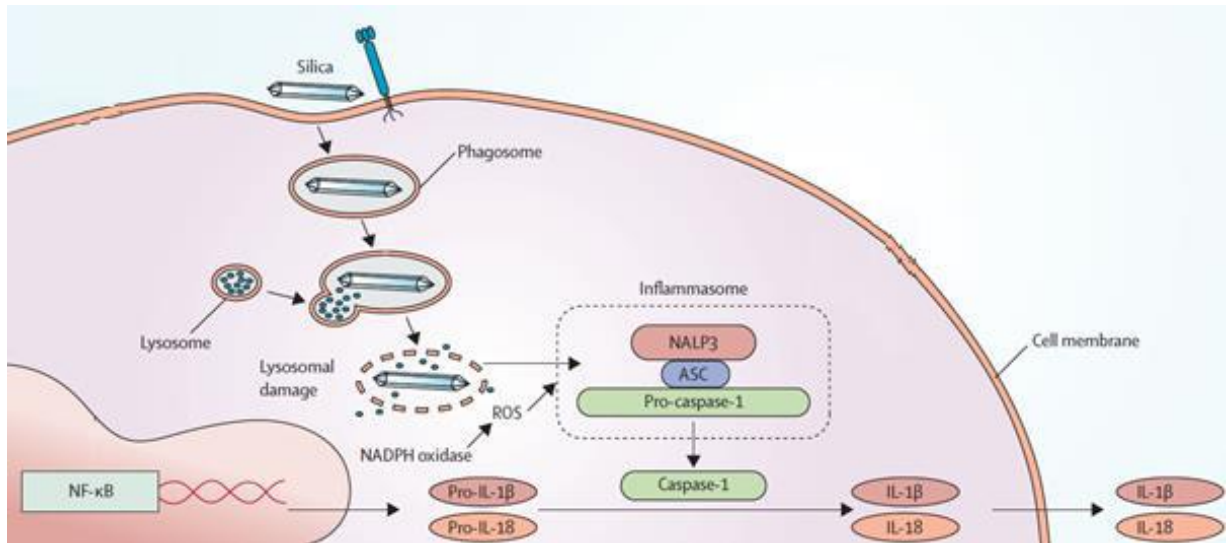
O estresse oxidativo leva, então, ao terceiro mecanismo, estimulação da secreção de citocinas e quimiocinas por células residentes e, posteriormente, por células recrutadas. A estimulação é oriunda da ativação de fatores de transcrição como fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora-1 (AP-1). Quando ativados, estes fatores de transcrição regulam positivamente a secreção de citocinas como IL-1 $\beta$ , a IL-6, IL-8, fator ativador de plaqueta (PAF), o TNF- $\alpha$ , proteína inflamatória de macrófago (MIP) 1 e 2, além de derivados do ácido araquidônico, quimiocinas como fator de monócitos-1 (MCP-1) e entre outros. Também influenciado pela ativação do NF- $\kappa$ B e AP-1, entra o quarto mecanismo, a estimulação da secreção de fatores fibrogênicos como fator de crescimento e transformação (TGF)- $\beta$  fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-1, o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e IL-10. Fatores como TGF- $\beta$  são muito importantes no processo de fibrose, pois estimulam a produção e deposição de colágeno do tipo III e I no parênquima pulmonar (M.L. PACHECO, 2012; M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016) (figura 1).

O quinto mecanismo ocorre pelo aumento da produção de ROS, o que acarreta na disfunção mitocondrial, aumento da expressão gênica de receptores de morte e (ou) seus ligantes, como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e o ligante de Fas (FasL) e, posteriormente, ativando caspase 9 e 3 e fragmentando o DNA. Com a apoptose do macrófago ou seu rompimento, a sílica retorna ao parênquima pulmonar para ser fagocitada por outro macrófago, o que faz com que o ciclo se repita (M.L. PACHECO, 2012; M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016) (figura 1).



**Fig. 1. Patogênese da silicose.** 5 mecanismos essenciais para ocorrer o ciclo inflamatório da silicose: 1) citotoxicidade direta; 2) ativação de geração de oxidantes; 3) estimulação da secreção de citocinas e quimiocinas; 4) estimulação da secreção de fatores fibrogênicos; 5) morte celular por apoptose (M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016)

Além dos mecanismos citados, através do processo inflamatório intracelular, desencadeado pela fagocitose da sílica, são causados danos aos lisossomos e o há um aumento da concentração de ROS intracelular, o que gera a ativação do inflamassoma NALP3, desencadeando uma cascata inflamatória que, posteriormente, resulta em fibrose (LEUNG, SUN YU, CHEN, 2012). Os sinais de lesão celular ativam o inflamassoma NALP3, esse inflamassoma contém domínio pyrin (PYD), domínio responsável por se ligar a outras proteínas que contenham o mesmo domínio, com isso, ele recruta e se liga a pró-caspase-1, ativando-a e fazendo com que ela clive as pró interleucinas 18 e 1β, fazendo com que elas fiquem ativas e sejam liberadas (CAO *et al*, 2015) (Figura 2).



**Fig. 2: Etapas envolvidas na ativação do NALP3. (Modificado de LEUNG, SUN YU, CHEN, 2012).** Ativação de inflamossoma NALP3 através de danos lisossomais e aumento da concentração de ROS, com consequente ativação de IL-18 e IL-1 $\beta$  e efluxo de potássio.

Exposta de forma crônica, a sílica tem a capacidade de aumentar, consideravelmente a aparição de outras doenças, como o risco de surgimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (HNIZDO et al., 1991; HNIZDO & VALLYATHAN, 2003; COHEN, PATEL, GREEN 2008), tuberculose pulmonar (HNIZDO & MURRAY, 1998; PASULA, 2009; NGOSA, NAIDOO 2016) e doenças autoimunes (MOSSMAN, GLENN, 2013), independentemente da ocorrência ou não de silicose.

O tempo de exposição, a carga de exposição e o tipo de partícula inalada são usados para a classificação da silicose. Pode ser classificada como: 1- silicose aguda, quando ocorre exposição a grandes quantidades de partícula de sílica em um curto período, que varia de meses até cerca de cinco anos, apresentando sintomas rapidamente; 2- silicose acelerada, quando há inalação de grandes quantidades de sílica, com os primeiros sintomas surgindo apenas entre 5 a 10 anos após o início da exposição; e 3- silicose crônica, sendo a forma mais comumente ocorrida, surge a partir da inalação de baixas quantidade de sílica por um período long, tendo o início dos sintomas a partir de 10 anos da exposição. Alguns autores consideram ainda uma quarta classificação para silicose, a silicose conglomerada, que ocorre quando os nódulos silicóticos aumentam e se aglutinam, o que não é consenso no meio científico (CRAIGHEAD et al., 1987; CASTRANOVA & VALLYATHAN, 2000).

Até o momento não foi descoberto nenhum tratamento eficaz para silicose (LEUNG, SUN YU, CHEN, 2012). Dentre os medicamentos utilizados para a tentativa de tratamento da silicose, estão listados: 1- glicocorticoides e citrato de alumínio (KENNEDY, 1956; SHARMA et al., 1991; GOODMAN et al., 1992; ABU-SHAMS et al., 2005), e 2- técnicas de

lavado bronco alveolar, visando remover as partículas de sílica (BANKS et al., 1993). Há, ainda, a utilização de inibidores da ativação de macrófagos e anticorpos monoclonais contra a IL-1(CASTRANOVA et al., 1991, GREENBERG et al., 2007). Em casos extremos o transplante pulmonar também é utilizado (LANEY, WEISSMAN, 2014). Até hoje nenhuma terapia conseguiu reduzir, significativamente, a mortalidade associada a doença, pois os benefícios tinham curta duração (GREENBERG et al., 2007), assim como não foi observada melhora da função pulmonar. Porém algumas terapias vêm mostrando bons resultados em modelos animais, dentre elas a terapia gênica (M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016).

## 1.2 – TERAPIA GÊNICA

Terapia gênica define-se por procedimentos que introduzam material genético em células-alvo, visando: regular, reparar, substituir, adicionar ou deletar uma sequência gênica que resultem em benefício terapêutico (MORALES, 2007; WIRTH, YLA HERTTUALA, 2013). A terapia gênica é utilizada com o objetivo de cura tanto de doenças genéticas, como hemofilia (SHARMA, et al. 2016), síndrome de imunodeficiência combinada (THRASHER, WILLIAMS, 2017), deficiência da lipoproteína lipase (OLIVEIRA, 2013), quanto para doenças adquiridas, como asma (DA SILVA *et al.*, 2014), doença pulmonar obstrutiva crônica, DPOC (AL-JAMAL, WALLACE, HARRINSON, 2005), silicose, câncer (HUSAIN *et al.* 2015; ABRAHAM *et al.* 2016) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (WAGNER, 2016).

Em doenças genéticas, a terapia gênica pode atuar inserindo genes saudáveis em indivíduos doentes, substituindo o gene defeituoso na célula-alvo, o que resulta na expressão correta do gene, fazendo com que a função celular seja reestabelecida. Em casos de doenças adquiridas, o foco é interromper o ciclo de vida do alvo em questão ou estimular uma resposta imune contra ele. Como exemplo, a terapia gênica em câncer busca a introdução de um gene que estimule a interrupção de seu ciclo tumoral, impedindo sua proliferação (AMER, 2014), outro exemplo é a introdução de um gene que desencadeie em uma interrupção da replicação viral, impedindo a proliferação do vírus e, conseqüente, desenvolvimento da doença (MENDOZA *et al.*, 2015).

A terapia ainda pode ser classificada em duas categorias, são elas: 1- terapia de células somáticas, ou seja, as células tratadas são todas as células adultas, responsáveis pela formação de tecidos e órgãos do corpo de um indivíduo, com isso, o tratamento gera benefícios apenas para o paciente específico do procedimento, pois essas células não estão envolvidas no



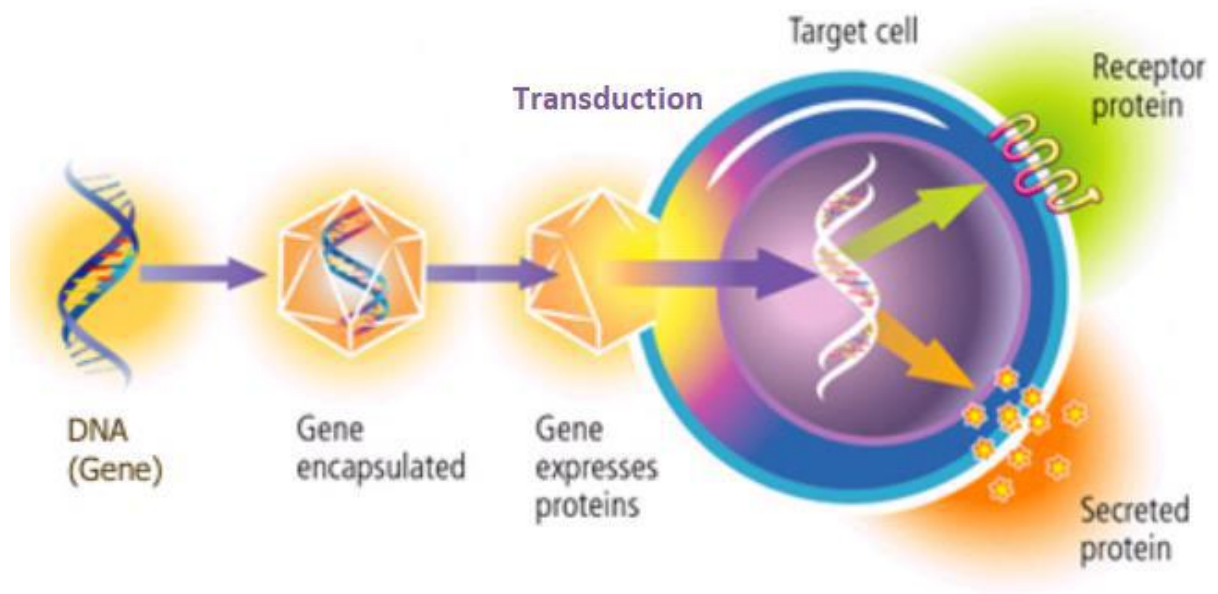
processo de reprodução. A modificação genética ocorre apenas em células não germinativas, impossibilitando a perpetuação da mudança genética de forma hereditária; 2- terapia “germ-line”, que se baseia na terapia gênica em células germinativas, ou seja, células envolvidas no processo de reprodução (espermatozoide e ovócito no caso de humanos). Quando a fecundação entre as células tratadas ocorre, será originado um zigoto contendo o gene inserido na terapia gênica, tal gene passará a compor todas as células produzidas posteriormente por esse zigoto, resultando assim em uma característica genética que poderá ser passada hereditariamente (MOSS, 2014).

A aplicação de um vetor para o transporte do material genético até o núcleo é de suma importância para o sucesso da terapia (MARTINI *et al.*, 2009). Para a realização da terapia há, primeiramente, a busca pelo vetor apropriado que levará o material genético para seu alvo. Depois, o gene de interesse é isolado e clonado para, então, ser inserido no vetor e utilizado (SCADUTO, WANG, 2000). Diversos tipos de ácido nucleico podem ser usados, dentre eles o DNA, RNA ou oligonucleotídeo (MARTINI *et al.*, 2009).

O sucesso da terapia gênica depende de alguns fatores, dentre eles, um dos principais é a característica dos vetores. Para que a terapia possa ocorrer com êxito, o vetor deve ser pouco custoso com fácil produção e manipulação; ter tropismo para os alvos determinados (células ou tecidos), para evitar distribuições para órgãos aleatórios (inespecíficos); ter baixa imunogenicidade, para que a resposta imunológica desencadeada não resulte em sua destruição, ou na destruição do transgene, evitando, assim, que as células expressando o transgene acabem sendo eliminadas; além de promover a terapia gênica de modo eficiente e duradouro (LU, 2004; MOSS, 2014).

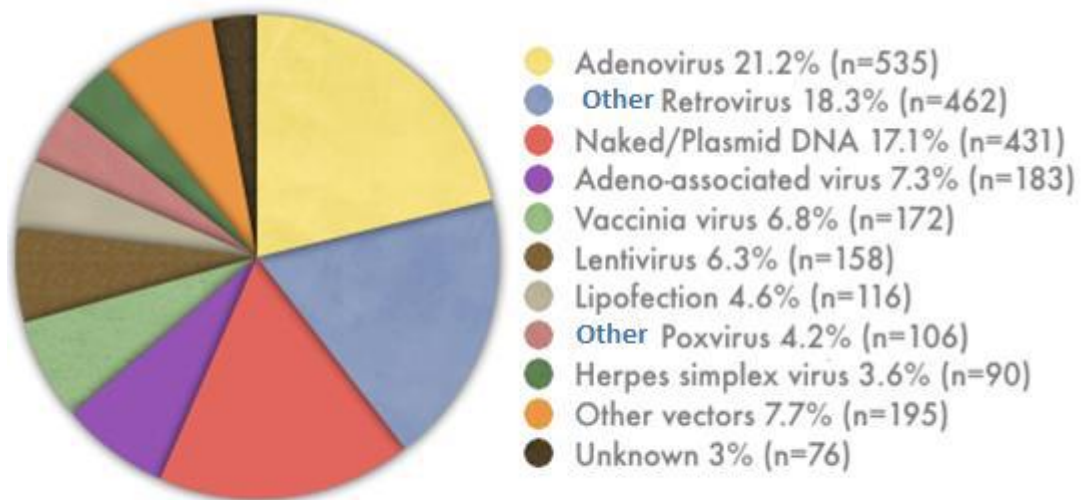
### **1.3 – VETORES VIRAIS NA TERAPIA GÊNICA**

Existem dois tipos de vetores atualmente, os vetores virais e os vetores não-virais. Dentre os vetores não-virais estão representados, os plasmídeos (MENCK, VENTURA, 2007), nanopartículas (SILVA *et al.*, 2013), os lipossomos catiônicos (TEAGLE, BIRCHALL, HARGEST, 2016), porém sua eficiência é baixa (REY-RICO, CUCCHIARINI, 2016). Evolutivamente os vírus desenvolveram a capacidade de realizar a encapsidação do material genético, além de infectar células, fazendo com que seu gene seja transcrito e traduzido por essas células (figura 3). Por apresentarem essas características, naturalmente, eles representam os vetores mais eficazes para a terapia gênica, apresentando uma capacidade de transdução muito alta, com recursos para escapar de barreiras extracelulares e intracelulares (MISRA, 2013).



**Fig. 3. Etapas envolvidas no experimento de terapia gênica.** Exemplo de transdução viral (PATHBIO, 2017). Primeiramente o gene de interesse é identificado e isolado. Após o isolamento o gene é inserido no vetor. Posteriormente a construção do vetor, há sua utilização, gerando a transdução do vetor nas células alvo. Por fim o vetor irá levar o material genético até o núcleo da célula, onde o gene será transcrito e gerar a expressão da proteína de interesse.

Os retrovírus (como os lentivírus), herpes vírus, adenovírus e adenovírus associado são os vetores virais mais estudados (MOSS, 2014). Por apresentar baixa imunogenicidade e não ser patogênico, o adenovírus associado (AAV) pode ser readministrado (MARTINI et al, 2009; BENNETT *et al.* 2012), além disso, ele não gera reações inflamatórias, o que permite com que o tecido não seja mais lesado durante sua administração, resultando em uma expressão mais prolongada do transgene. Por apresentar estas características, ele obtém vantagem quando comparado a outros vetores virais. (DAYA, BERNS, 2008; SANTIAGO-ORTIZ, SCHAFFER, 2016) Dentre os vetores virais, atualmente, ele é o quarto vetor mais utilizado em pesquisas envolvendo terapia gênica. (Figura 4).



**Fig. 4. Porcentagem de utilização dos vetores usados na terapia gênica.** Número de trabalhos científicos utilizando vetores virais e não virais (Modificado de WILEY, SONS, 2017).

#### 1.4 - ADENOVÍRUS ASSOCIADO

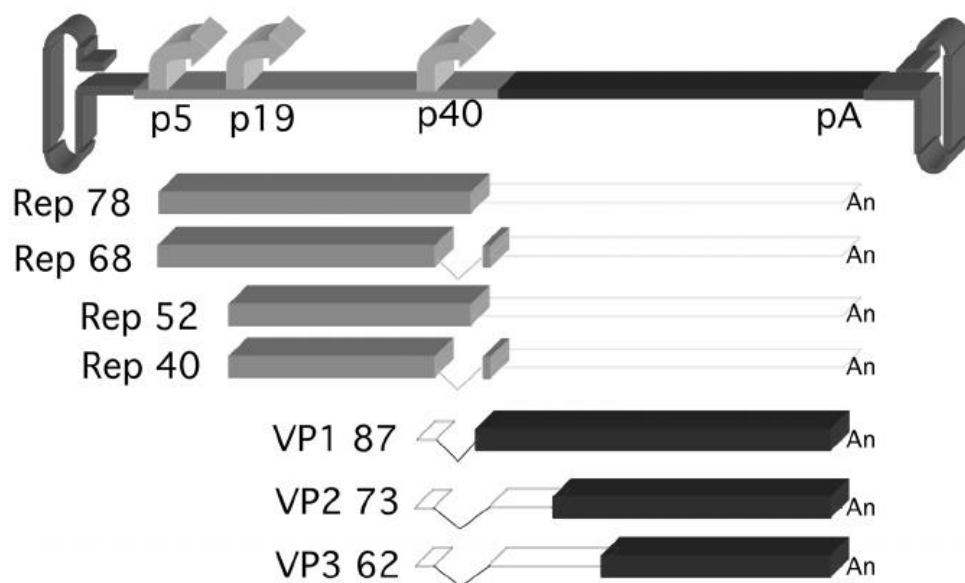
Os AAVs não são envelopados, contém um formato icosaédrico, seu capsídeo tem 25 nm e pertencem a família *Parvoviridae* do gênero *Dependovirus*. Quando infecta a célula sozinho ele se integra ao cromossomo e fica inativado, por isso eles dependem do adenovírus ou herpes vírus para se replicar. São 12 sorotipos descritos até hoje (AAV sorotipo 1 [AAV1] ao AAV12), sendo o mais estudado e detalhado o sorotipo 2 (AAV2) (TSENG, AGBANDJE-MCKENNA, 2014).

O AAV2 é constituído de fita simples de DNA com 4,7 kilobases (kb) (Figura 5) contendo flanqueamentos de repetições terminais invertidos (ITRs) em suas extremidades, os quais apresentam um tamanho de 145 pares de base (pb). Contêm duas janelas abertas de leitura (ORF), uma para cada um de seus respectivos genes, rep e cap. A ORF contendo o gene rep (replicação), codifica quatro proteínas Rep (Rep 78, Rep 68, Rep 52 e Rep 42), que são proteínas não estruturais e tem seus nomes baseados em seus pesos moleculares. O gene rep contém dois promotores, o P5, que é o promotor para a transcrição das proteínas Rep 78 e Rep 68, e o P19, promotor para a transcrição das proteínas Rep 52 e Rep 42. As proteínas de maior peso molecular (Rep 78 e 68) são provenientes de um mesmo transcrito, a partir do promotor P5, e atuam na regulação da expressão gênica, regulando positivamente, quando presente o helper vírus (adenovírus e Herpes vírus), e negativamente, quando ausente o helper vírus. As menores proteínas (Rep 52 e 42) também provenientes de um mesmo transcrito, a partir do promotor P19, tem a função atrelada ao acúmulo de DNA viral fita simples. Após o acúmulo, o DNA será empacotado dentro do capsídeo do AAV. Todas as proteínas Rep

possuem ainda atividade de helicase e de ATPase (TSENG, AGBANDJE-MCKENNA, 2014).

A ORF contendo o gene cap (capsídeo), a partir do promotor P40, produz dois transcritos através de splicing alternativo, gerando três proteínas do capsídeo viral, VP1, VP2 e VP3, que compartilham uma sequência C-terminal e se diferem por seus N-terminais (DAYA, BERNS, 2008). A proteína VP1 é a maior, e está implicada na infecciosidade do vírus, enquanto que a proteína VP3 apresenta o menor tamanho dentre elas, e, provavelmente, é a responsável pelo tropismo do vírus, além da proteína VP2, que está envolvida na montagem do capsídeo (TSENG, AGBANDJE-MCKENNA, 2014).

As ITRs são sequências de 145 pb que flanqueiam as extremidades das ORFs do genoma viral. Consistindo em 125 pares de base, as ITRs formam uma sequência palindrômica, o que resulta na formação de uma estrutura de grampo, enquanto os outros 20 nucleotídeos, denominada sequência D, permanecem não pareados (DAYA, BERNS, 2008). Além disso, as ITRs também contêm duas origens de replicação, sendo elas a Rep-Protein Binding Site (RBS), que é um sitio de ligação mais especificamente para Rep 78 e Rep68, e a Terminal Resolution Site (TRS), idêntico a uma sequência compreendida no cromossomo 19, servindo como uma sequência de integração, por recombinação homóloga, do genoma viral no genoma humano. A estrutura secundária da ITR tem um grupo hidroxila 3' livre, o que inicia a replicação de DNA, atuando como um *primer* (YOUNG, SAMULSKI, 2001; BALAKRISHNAN, JAYANDHARAN, 2014).



**Fig. 5. Figura representativa da estrutura do genoma do AAV.** Genoma do AAV, os três promotores (P5, P19 e P40), as quatro proteínas Rep (Rep78, Rep68, Rep 52, Rep 42) e as três proteínas Cap (VP1, VP2 e VP3), flanqueadas pelas ITRs (GOSH, DUAN, 2007).

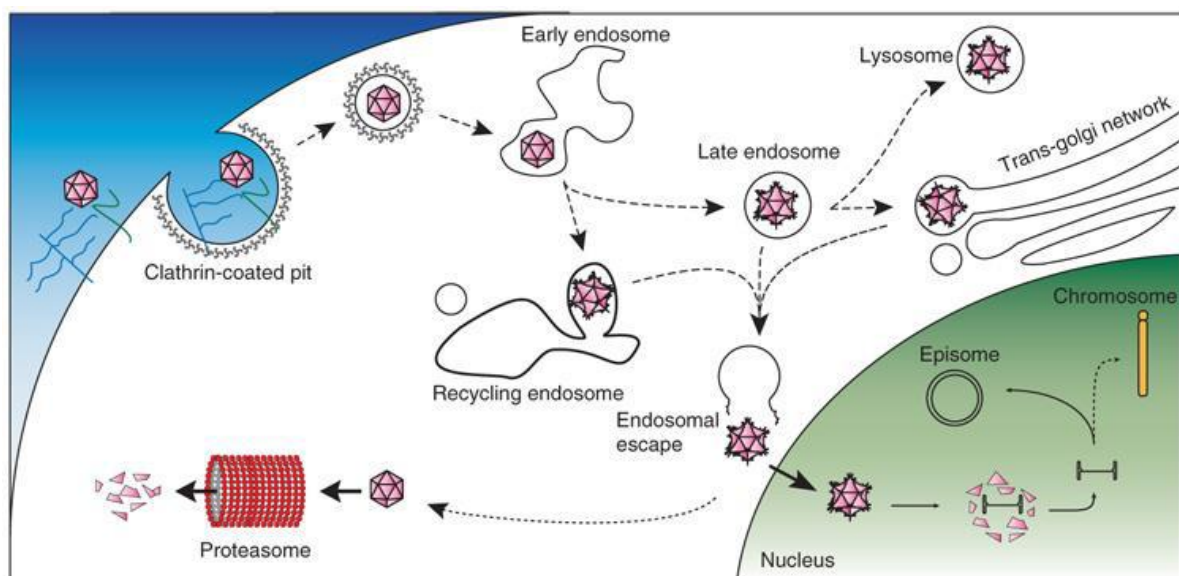
Para que os vetores virais AAV não se repliquem ou se integrem ao cromossoma humano, se tornando seguros para utilização na terapia gênica, seus dois genes de virulência, rep e cap, devem ser removidos (LU, 2004; SANTIAGO-ORTIZ, SCHAFFER, 2016). Assim, o vetor limita-se à apenas transferir seu material genético, que fica em seu estado episomal, para a célula alvo, o que os torna incapaz de continuar seu ciclo infeccioso (DUAN, *et al.*, 1998). Os genes de interesse e seus promotores são, então, inseridos no vírus, de forma a serem flanqueados pelas ITRs do genoma do AAV selvagem, as quais tem sua permanência necessária pois em sua ausência não é possível ocorrer a replicação viral e nem o empacotamento do material genético durante a construção do vetor recombinante AAV (rAAV) (SANTIAGO-ORTIZ, SCHAFFER, 2016).

No processo de infecção, existem vários passos, dentre eles: ligação do vírus a célula alvo, internalização, tráfego endossomal, importação para o núcleo e expressão/replicação. O primeiro passo é a ligação do capsídeo viral no seu receptor primário na célula alvo (SCHULTZ, CHAMBERLAIN, 2008; BALAKRISHNAN, JAYANDHARAN, 2014). A fixação do AAV2 ocorre através do reconhecimento dos domínios do capsídeo viral pelo receptor primário proteoglicano sulfato de heparina (HSPG), que está presente na membrana plasmática de diversos tipos celulares, justificando seu amplo tropismo (SUMMERFORD, SAMULSKI, 1998). Além do HSPG, diferentes co-receptores podem se ligar a domínios virais, dentre eles: o receptor 1 do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR1) (QING, *et al.*, 1999; BLACKBURN, STEADMAN, JOHNSON, 2006), o receptor do fator de crescimento de hepatócito (KASHIWAKURA *et al.*, 2005), integrinas  $\alpha\beta5$  /  $\alpha5\beta1$  (SUMMERFORD, BARTLETT, SAMULSKI, 1999; ASOKAN *et al.*, 2006) e o receptor de laminina (AKACHE *et al.*, 2006; SKUBIS-ZEGADLO, STACHURSKA, MALECKI, 2013). A ligação dos domínios virais aos receptores de superfície celular desencadeia vias de sinalização que estimulam a endocitose, onde ocorre a internalização da partícula viral. Alguns mecanismos vêm sendo propostos para esse processo, dentre eles, endocitose dependente de dinamina, formação de vesículas de clatrina ou mecanismos independentes de dinamina/clatrina, como a macropinocitose (BALAKRISHNAN, JAYANDHARAN, 2014). Outro estudo demonstrou que a transdução de AAV2 não é dependente da via de clatrina (NONNENMACHER, WEBER, 2011).

Após a internalização do vírus na célula, há a formação do endossomo. Com o amadurecimento em endossomo tardio, o meio se acidifica, o que resulta na mudança da conformação do capsídeo viral, expondo o domínio fosfolipase A2 (domínio responsável pela

catálise da quebra de fosfolípidos de membrana) da proteína VP1, que antes não era exposto no capsídeo viral, o que permite o vírus romper a membrana do endossomo tardio e ir para o citoplasma (BARTLETT, WILCHER, SAMULSKI, 2000; XIAO, SAMULSKI, 2012; BALAKRISHNAN, JAYANDHARAN, 2014). A mudança conformacional do capsídeo, com a acidificação do endossomo tardio, também expõe o sinal de localização nuclear, sinalização necessária para que o capsídeo viral seja reconhecido pelo complexo de poros nucleares e internalizado (JOHNSON *et al*, 2010; XIAO, SAMULSKI, 2012; LIU *et al.*, 2017). Uma vez no núcleo, o material genético do vírus será liberado do capsídeo para o meio nuclear e a expressão gênica, viral, ocorrerá através da utilização das proteínas responsáveis pela expressão gênica celular (DING *et al.*, 2005; XIAO, SAMULSKI, 2012). Estudos sugerem que todo o transporte, tanto do endossomo quanto do vírus no citoplasma ocorre através de suas respectivas associações aos microtúbulos e microfilamentos (SCHULTZ, CHAMBERLAIN, 2008; XIAO, SAMULSKI, 2012) (Figura 6).

Além de passar pela via lisossomal, como descrito acima, para que o vetor possa chegar ao núcleo e fazer com que o gene seja expresso, é necessário, também, que ele escape da via não lisossomal de proteólise. Após sua saída do endossoma e posterior chegada ao citoplasma, o vetor pode ser reconhecido e marcado para a degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina/proteassoma, o que também pode afetar, negativamente, a transdução viral (MINGOZZI, HIGH, 2013) (Figura 6).



**Fig. 6. Entrada e tráfego celular de vírus recombinante adeno-associado (rAAV).** A entrada do rAAV na célula é através da endocitose mediada pelo receptor. Há uma série de vias possíveis para o vírus chegar no núcleo, algumas delas estão representados aqui. O processamento endossomal de vírus resulta em externalização de sinais de localização nuclear (NLS) e domínio de fosfolipase em proteínas do capsídeo, possibilitando, então, a fuga endossomal e a segmentação nuclear. A saída do material genético do capsídeo provavelmente ocorre no núcleo, liberando o genoma do vetor para formar episomas ou, raramente, para se integrar no genoma da célula hospedeira (SHULTZ, CHAMBERLAIN, 2008).

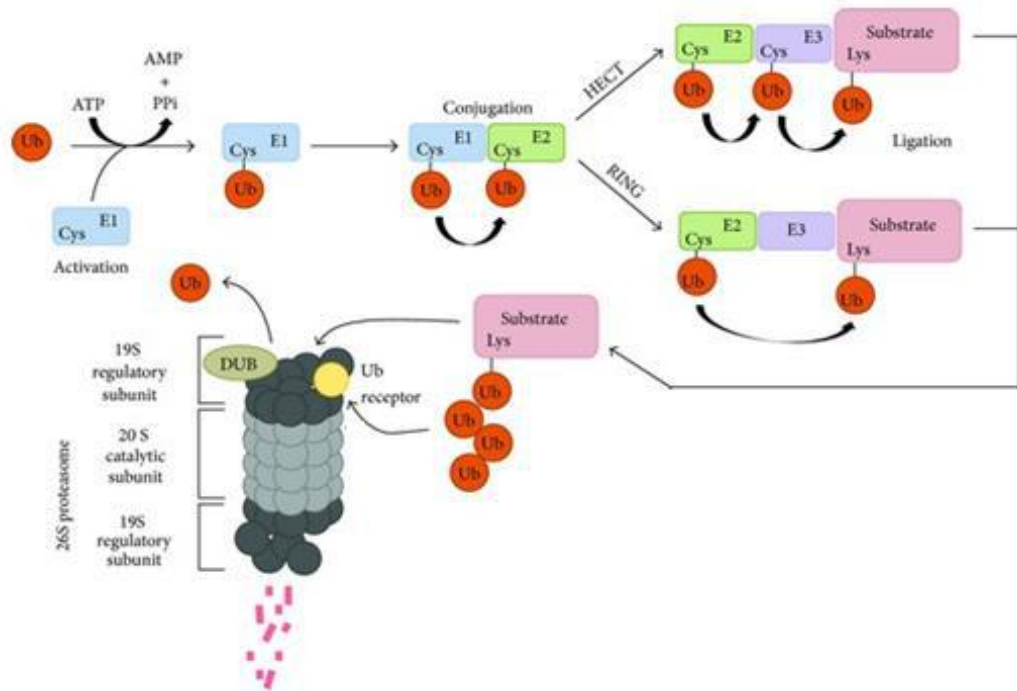
## 1.5 – DESAFIOS NA TERAPIA GÊNICA VIA AAV

Como explicado anteriormente, Além das barreiras intracelulares, em seu percurso para o núcleo, como a via de proteólise lisossomal, o vírus também pode ser alvo da degradação proteica dependente de ubiquitina/proteassoma (via de proteólise não lisossomal) através da ubiquitinação de proteínas do capsídeo viral e posterior reconhecimento e degradação pelo proteassoma (DUAN *et al.*; 2000 DING *et al.*, 2005). Tem se evidenciado, também, que o receptor de fator de crescimento epidérmico - tirosina quinase (EGFR-PTK - proteína receptora responsável pela fosforilação de resíduos de tirosina nas proteínas), medeia a fosforilação de tirosina do capsídeo viral, o que gera uma mudança estrutural na proteína, levando-a à ubiquitinação e, posterior, reconhecimento pelo proteassoma, o que resulta na degradação das partículas de AAV2 (PETERS-SILVA *et al.*, 2011). Com isso, uma grande quantidade de vírus ubiquitinados estaria, no caminho até o núcleo, sendo reconhecidos e degradados pelo proteassoma citoplasmático, diminuindo, assim, a eficiência da transdução viral.

A ubiquitinação é catalisada por três enzimas, E1, E2 e E3. Através do reconhecimento de proteínas estranhas à célula, as enzimas levam a formação de uma ligação isopeptídica entre a carboxila do C-terminal glicina da ubiquitina (Ub) e, mais comumente, um resíduo de lisina da proteína alvo (Figura 7). O ciclo começa com a ativação do C-terminal da Ub através da enzima ativadora de Ub (E1), então, a porção ativada da Ub se liga a cisteína da enzima conjugadora E2. Em seguida a proteína E3 (enzima ligase) transfere a porção ativada de Ub da E2 para o grupo amino do substrato. As proteínas, então, modificadas, são destinadas ao complexo proteassômico 26S (WOLF, HILT, 2004; SOKRATOUS *et al.*, 2014).

O proteassoma 26S é uma protease, não lisossomal, que se constitui de dois sub-complexos, o 20S “*core particle*” (CP) e 19S partícula reguladora (RP). O sub-complexo 20S CP contém atividade proteolítica e o 19S RP fornece especificidade para o reconhecimento das cadeias multi-Ub ligadas a proteínas para degradação e translocação dos substratos para o interior da câmara catalítica localizada no proteassoma, onde as proteínas serão reduzidas, por hidrólise, à pequenos peptídeos (SEEGER, FERRELL, DUBIEL, 1997; DURAIRAJ, KAISER, 2014).





**Fig. 7. Passos enzimáticos principais da via proteolítica dependente de ubiquitina/proteassoma.** E1 – enzima ativadora de ubiquitina, E2 – enzima conjugadora de ubiquitina, E3 – ligase de ubiquitina–proteína, Ub – ubiquitina ou grupo ubiquitil (Modificado de LIN, MAN, 2013)

Com isso, uma das propostas para que o vetor escapasse da ubiquitinação, foi a substituição dos resíduos expostos de tirosina, o que removeria o alvo da fosforilação da tirosina quinase, fazendo com que o capsídeo viral não sofra modificação estrutural, escape do reconhecimento para a ubiquitinação, e, conseqüentemente, da degradação pela via proteassoma, aumentando, então, a eficiência da transdução viral (ZHONG *et al.*, 2008a).

## 1.6 - VETORES MUTANTES

A partir da proposição anterior, um estudo demonstrou que mutações direcionais em superfícies expostas de resíduos de tirosina para fenilalanina (Y-F), na região C-terminal da proteína VP3 do capsídeo viral, protegeu o vetor da degradação pelo proteassoma, já que houve uma maior eficiência de transdução do vetor mutante quando comparado ao vetor AAV2 selvagem, em cultura de tecidos e em animais (ZHONG *et al.*, 2008b; PETERS-SILVA *et al.*, 2011).

Vetores contendo mutações pontuais Y-F no capsídeo, AAV2 Y444F e Y730F, AAV9 Y446F ou AAV8 Y733F, obtiveram um aumento, de forma significativa, na eficiência de transdução em comparação a seus homólogos não mutantes (PETERS-SILVA *et al.*, 2009). Corroborando com o resultado anterior, os vetores AAV2 e AAV8 com mutações pontuais Y-



F no capsídeo, obtiveram uma melhora na eficiência de transdução em duas linhagens de célula ocular quando comparado com homólogos não mutantes (RYALS *et al.*, 2011).

Em estudo recente foi demonstrado que a mutação Y-F no capsídeo, Y731F AAV9, não só aumentou a eficiência da transdução viral, em pulmão de camundongo, como, também, não causou inflamação nem alterações histológicas ou mecânicas (MARTINI *et al.*, 2016).

Considerando os resultados positivos com a utilização de rAAV mutante no resíduo de tirosina do capsídeo, surgiu a necessidade de verificar a viabilidade de tais vetores na realização de terapia gênica pulmonar.

### **1.7 - TERAPIA GÊNICA PULMONAR**

Para o tratamento de doenças pulmonares a terapia gênica se torna uma alternativa interessante, pois além de oferecer uma área de superfície grande, as células pulmonares são facilmente acessíveis para os vetores da terapia gênica (XIA *et al.*, 2014).

O primeiro estudo feito envolvendo transferência gênica pulmonar com vetor AAV mutante, ocorreu no tratamento de fibrose cística (FC) (FLOTTE, LAUBE, 2001). Essa doença, na época, se mostrou um alvo ideal para a terapia gênica, pois é uma doença monogênica (mutação no gene regulador de condutância transmembranar de FC – CFTR) e acomete o pulmão.

Estudos utilizando AAV-CFTR demonstraram uma transferência de genes segura e dependente de dose, porém, houve um aumento de anticorpos neutralizantes AAV, o que pode explicar a baixa eficiência de transfecção nestes ensaios (AITKEN *et al.*, 2001; FLOTTE *et al.*, 2003). Outros estudos utilizando vetor pseudotipo AAV2/9 – constituído pela mistura do genoma do sorotipo 2 e do capsídeo do sorotipo 9 – para a transdução de células epiteliais do aparelho respiratório murino, demonstraram que a expressão gênica da proteína Alfa1-Antitripsina humana (hAAT) estável e prolongada (9 meses), além de não serem encontrados anticorpos neutralizantes na lavagem do fluido broncoalveolar (LIMBERIS, WILSON, 2006).

A necessidade de melhorar a eficiência de transfecção em modelos de terapia gênica no tecido pulmonar se perpetuou. Com isso nosso laboratório realizou estudos com diferentes sorotipos de AAV para identificar o melhor vetor para terapia gênica pulmonar.

Estudos prévios realizados pelo nosso laboratório demonstraram que a administração do vetor AAV2 causa leve resposta inflamatória, o que vem a afetar as vias aéreas e o parênquima pulmonar. Alterações morfométricas foram observadas nos resultados histológicos, porém não houve alteração na função pulmonar (LASSANCE *et al.*, 2008). Outro fator que prejudica a transdução do AAV2, no pulmão, é o fato de que o HSPG é

expresso em baixos níveis no tecido pulmonar, o que torna o AAV2 um vetor ruim para transferência gênica pulmonar, já que esta substância é seu receptor primário (SEILER *et al.*, 2006).

Posteriormente, o laboratório evidenciou a segurança da administração do vetor rAAV5-GFP ( $4 \times 10^{11}$  partículas) na transferência de genes para os pulmões de camundongos. Foi observado que sua administração repetida (2 doses) não induziu processo inflamatório, apoptose, nem alterações mecânicas ou morfométricas nos pulmões. Além disso, resultados das análises moleculares (RT-PCR e imunohistoquímica) mostraram que sua readministração leva à expressão sustentada do gene repórter nos pulmões dos animais tratados (nos grupos que receberam uma dose e foram analisados 3 semanas depois, e nos grupos que receberam duas doses e foram analisados 1 e 2 semanas após a readministração). Porém, quando o animal recebeu duas doses e foram analisados 3 semanas após a segunda dose houve um decréscimo de 31,9% da expressão do gene repórter, fato que pode ter ocorrido pela diminuição da quantidade de células pulmonares transfectadas pelo vetor rAAV5 (MARTINI *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o AAV8 é um vetor promissor para ser utilizado em terapia gênica de vias aéreas. O AAV8 apresenta vantagem sobre o vetor AAV2, pois apresenta menor reatividade anticorpos humanos contra AAV, além de apresentar expressão de longa duração (SEN *et al.*, 2013) e ser eficiente na entrega de genes para a retina (DENG *et al.*, 2012), hepatócitos (ZAISS, MURUVE, 2008; SEN *et al.*, 2013), neurônios (LOW, AEBISCHER, SCHNEIDER, 2013) e fígado de camundongos (GAO, VANDENBERGHE, WILSON, 2005; JACOB, WANG, 2011).

### **1.8 - ADENOVÍRUS ASSOCIADO SOROTIPO 8**

Resultados recentes de um teste clínico que utilizou o vetor AAV8 demonstraram que este vetor foi capaz de causar uma longa expressão do transgene fator IX (FIX) humano, provando sua eficácia e segurança na terapia gênica do fígado. Em consequência disso, houve melhoras clínicas nos pacientes tratados, ressaltando, assim, o potencial terapêutico deste sorotipo (NATHWANI *et al.*, 2014).

As células pulmonares expressam grandes quantidades de laminina, que é um dos ligantes do capsídeo do vetor AAV8, o que torna o pulmão um bom alvo para esse vetor. Em um experimento no qual foram comparados os sorotipos AAV2, AAV5, AAV8 e AAV9, quanto à eficiência na entrega do gene  $\alpha 1$ -antitripsina no pulmão de camundongos, via intranasal e intratraqueal, foi observado que o sorotipo 8 teve melhor desempenho (LIQUN *et al.*, 2009).

Corroborando com o estudo anterior, em experimento onde diversos sorotipos (AAV1-AAV9), através de injeção na veia da cauda de camundongos, foram instilados sistemicamente, o AAV8 foi eficiente na transdução em diferentes tecidos *in vivo*, tendo o maior nível de expressão do transgene no pulmão (ZINCARELI *et al.*, 2008).

Outro estudo, ainda, demonstrou que a entrega intratraqueal do vetor AAV8 contendo uma mutação pontual Y-F no capsídeo (AAV8 Y733F) levou a um significativo aumento na eficiência de transdução relativo a seu homólogo não mutante (MARTINI *et al.*, 2014).

Em trabalho recente foi demonstrado que vetor viral Y733F-AAV8 carreando o gene que codifica o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) foi eficiente na transferência gênica para as células do parênquima pulmonar, além disso, não causou variação da função pulmonar, alteração histológica sugestiva de inflamação e nem expressão de citocinas inflamatórias, comprovando sua viabilidade quanto a utilização na terapia gênica pulmonar (FERREIRA *et al.*, 2016).

A partir dos resultados positivos com relação a utilização do AAV8 mutante na entrega de um gene terapêutico para o pulmão, surgiu a necessidade de testar a eficiência do vetor em um modelo de doença pulmonar inflamatória.

Em estudo recente em modelo de doença pulmonar inflamatória, foi demonstrado que uma proteína, o Fator Derivado de Epitélio Pigmentado (PEDF), foi eficaz em diminuir a inflamação e o remodelamento das vias aéreas. Além de ter seu potencial, antiangiogênico, anti-inflamação e antifibrótico, demonstrado em estudos utilizando outros modelos (SHIN, SORENSON, SHEIBANI, 2013). O que torna a utilização de seu gene na terapia gênica em modelo murino de silicose (doença fibrótica e inflamatória pulmonar) uma possibilidade promissora.

## **1.9 - PEDF**

O PEDF é uma glicoproteína de 50 kDa que pertence à superfamília de inibidor de serina protease, mas que carece da atividade de inibidor de protease, essa proteína influencia na função e no controle de patologias de vários tecidos, dentre eles, o pulmão; além disso, exerce importante papel na regulação da angiogênese, inflamação e fibrose (SHIN, SORENSON, SHEIBANI, 2013), fatores chaves no desenvolvimento da silicose.

Estudos demonstraram que, por atuar regulando negativamente a expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), a proteína possui atividade antiangiogênica (BECERRA & NOTARIO, 2013). Além disso, em pesquisas recentes há indícios de que o PEDF tem a capacidade de inibir o remodelamento ventricular esquerdo, melhorando a função

cardíaca de ratos com infarto agudo do miocárdio. A injeção do PEDF inibiu a expressão de TGF- $\beta$  e de colágeno tipo III, o que, consequentemente, diminuiu a fibrose (UEDA, 2011).

Ainda, em estudo visando examinar o potencial do PEDF na proteção das células ganglionares da retina, em modelo animal de glaucoma herdado, foi observado que a transferência do gene PEDF via vetor AAV para a retina diminuiu a expressão das citocinas TNF- $\alpha$  e interleucina 8 (IL-8) em camundongos, o que sugere efeito anti-inflamatório (ZHOU *et al.* 2009).

Outro estudo demonstrou que a terapia gênica feita com adenovírus carregando o gene do PEDF bloqueou a superexpressão dos fatores pró-inflamatórios TNF, MCP-1, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e VEGF em rins diabéticos de ratos (WANG *et al.*, 2008)

Além disso, foi demonstrado o potencial antioxidante do PEDF, no tratamento de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), resultando na inibição da expressão de IL-6, induzida por TNF- $\alpha$  e mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Tal inibição ocorreu através da supressão de NADPH-oxidase (YAMAGISHI *et al.*, 2004).

A ligação do PEDF ao seu receptor (PEDFR), regula positivamente o Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomo Gamma (PPAR $\gamma$ ), conduzindo a supressão do fator nuclear-kB (NF-kB) e a redução da produção de IL-8. Além do PEDFR, o PEDF tem a capacidade de se ligar ao receptor de laminina, bastante expresso no pulmão (BECERRA & NOTARIO, 2013). Entretanto, ainda não é conhecido seu efeito no sistema pulmonar.

Em estudo recente foi demonstrado a eficácia da proteína PEDF em diminuir a inflamação e o remodelamento das vias aéreas, em modelo murino de alergia crônica (via veia da cauda) (ZHA *et al.*, 2016).

Com sua atividade anti-inflamatória, antiangiogênica e anti-fibrótica sugerida através dos estudos, foi demonstrado que o PEDF pode ser utilizado de forma promissora para o tratamento de doenças inflamatórias e fibrogênicas, como a silicose.

## 2 - JUSTIFICATIVA

A exposição ocupacional à partícula de sílica desencadeia um processo inflamatório e fibrogênico do parênquima pulmonar, mediado pela geração de ROS e RNS, liberação de citocinas, quimiocinas e fatores fibrogênicos e apoptose (M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016). Ocorre a formação de nódulos constituídos por células mononucleares e polimorfonucleares, ricos em fibras colágenas, depositadas por fibroblastos. Tal panorama resulta na diminuição da função pulmonar, troca gasosa comprometida e são observados perda de peso, dispnéia e insuficiência respiratória com o agravamento do quadro clínico. As opções de tratamento utilizadas incluem o uso de glicocorticóides e citrato de alumínio, lavado broncoalveolar e transplante pulmonar. No entanto a mortalidade provocada pela doença não é reduzida a partir desses recursos terapêuticos (LEUNG, SUN YU, CHEN, 2012).

Nesse contexto, a terapia gênica viral é opção terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias pulmonares. Dentre os vetores virais, o AAV8 demonstrou ser eficiente na transdução das vias aéreas, pois se liga ao receptor de laminina, que é expresso nas células pulmonares (LIQUN *et al.*, 2009). Assim sendo, será utilizado o vetor viral AAV8 para mediar à transferência gênica do gene PEDF para o pulmão.

O PEDF é uma glicoproteína que possui atividade antiangiogênica, anti-inflamatória e antioxidante capaz de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias e, assim, influenciar o curso de doenças pulmonares (SHIN, SORENSON, SHEIBANI, 2013).

Portanto, o presente estudo avaliou os efeitos da terapia gênica com PEDF através do vetor viral AAV8 no processo inflamatório e de remodelamento do parênquima pulmonar em modelo murino de silicose. Esse entendimento faz-se necessário visto que poderá nortear as condutas clínicas no sentido de oferecer uma abordagem terapêutica àqueles indivíduos que desenvolveram silicose.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 – OBJETIVOS GERAIS**

- O presente trabalho visa demonstrar os efeitos da terapia com gene PEDF, através do vetor viral AAV8, sobre a função, padrão inflamatório e remodelamento de vias aéreas e parênquima pulmonar em modelo murino de silicose.

#### **3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a quantidade relativa de RNAm do gene PEDF no pulmão através do RT-PCR.
- Avaliar a extensão da lesão granulomatosa do parênquima pulmonar nos animais silicóticos tratados e não tratados através da análise da fração de área de granuloma.
- Analisar a função pulmonar através da mecânica Respiratória (método de oclusão ao final da inspiração).

## **4 – MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - ANIMAIS**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob o número de referência 103/15.

Foram utilizados, no atual estudo, C57BL/6 fêmeas (20-25g), com idade entre 8 a 12 semanas, adquiridos tanto no biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular e Investigação Pulmonar do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro quanto do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas.

Os animais foram condicionados a alimentação convencional (Ração Biobase – Biotec) à vontade; hidratação com garrafa de água filtrada; mantidos com lotação máxima de 5 animais por gaiola, com exaustão de ar e controle de luz. Dimensões da gaiola: comprimento: 32cm x largura: 20cm X altura: 21cm. Após o período de aclimatização, os animais foram randomicamente alocados para o grupo controle ou grupo tratado

### **4.2 - VETOR**

Os vetores AAV8 tirosina-mutantes (mutação pontual Y-F no capsídeo, Y733F) contendo o gene que codifica o PEDF humano (hPEDF) foram gentilmente cedidos pela Dra. Hilda Petrs-Silva do laboratório de Neurogênese do IBCCF da UFRJ (PETRS-SILVA *et al.* 2009).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a transferência gênica, para o pulmão de camundongos, via vetor AAV-PEDF foi eficiente. Además, foi avaliado a expressão relativa do RNAm em 4 dias diferentes (7, 14, 21 e 28), após as análises, foi observado que o pico de expressão foi alcançado no grupo de 28 dias (FERREIRA *et al.*, 2016). Levando em consideração os resultados anteriores, foi definido que o tempo de tratamento com o AAV8-PEDF é estabelecido em, no mínimo, 28 dias.

### **4.3 - MODELO MURINO DE SILICOSE**

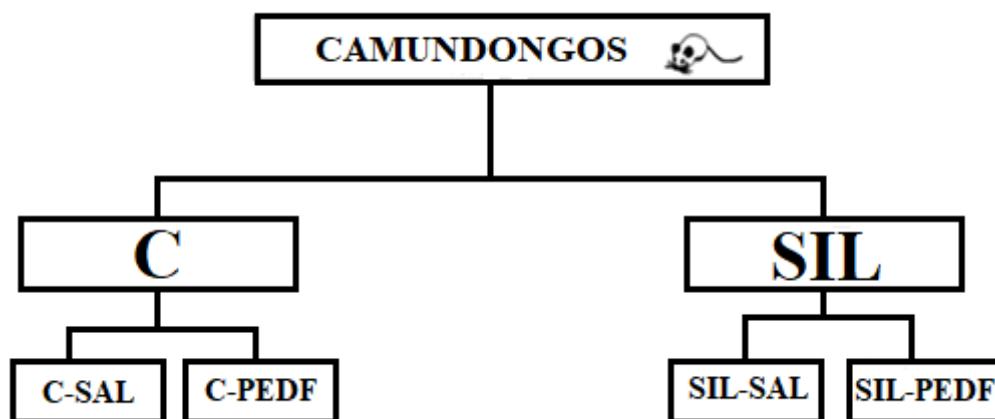
Para a instilação intratraqueal, os camundongos foram anestesiados com um anestésico inalatório (sevoflurano), colocados sobre uma mesa cirúrgica, com suas patas e seu rabo fixado na mesa através de fita adesiva, e tiveram sua traqueia exposta através de uma incisão cervical longitudinal anterior. Foi utilizado uma seringa de 1 ml para a injeção de 20 mg de sílica (SiO<sub>2</sub>, tamanho de partícula: 80% entre 1 e 5 µm; Sigma Chemical, St. Louis, MO)

suspendida em solução salina (50  $\mu$ l). Após a incisão ser realizada com fio de sutura 5,0 o animal ficou por alguns minutos sob observação e, posteriormente, retornou a sua gaiola (FAFFE *et al.* 2001).

Após 15 dias da instilação de sílica, o processo inflamatório da silicose já está estabelecido nos animais, ou seja, após 15 dias, a silicose já está desenvolvida em seus pulmões (FAFFE *et al.* 2001). Levando em consideração o dado anterior, o modelo fixado para o desenvolvimento da silicose em camundongos, no atual estudo, foi o de 15 dias contados após o dia da instilação da sílica.

#### 4.4 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

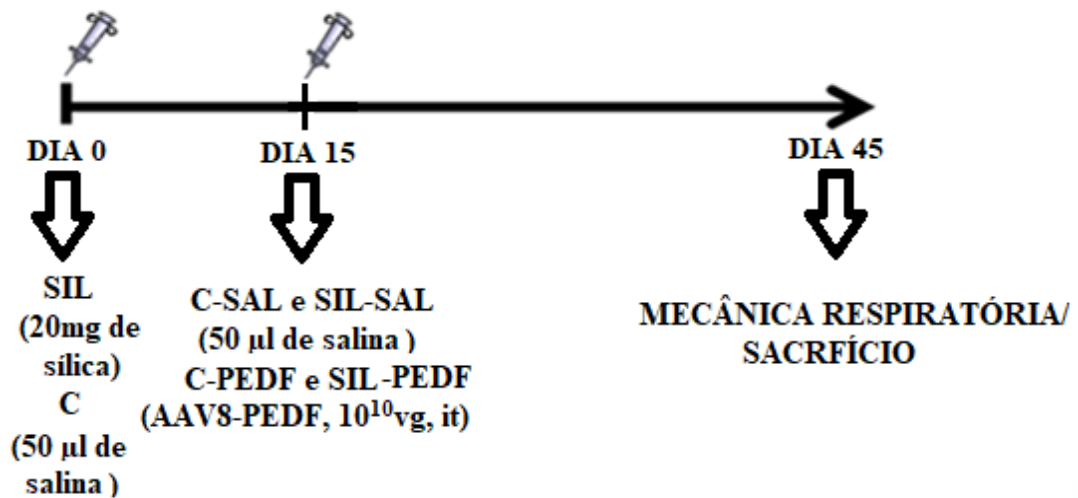
No presente estudo, foram realizados 3 modelos experimentais divididos aleatoriamente em dois grupos: animais controle (C) e animais doentes, instilados com sílica, (SIL). O grupo controle foi instilado com salina intratraquealmente (it) e subdividido em: animais controle salina, instilados apenas com salina, (50  $\mu$ l de salina, C-SAL) e animais controle instilados com o vetor carreando o gene PEDF (AAV8-PEDF), (50 $\mu$ L de vetor AAV8 carreando o gene que codifica o PEDF,  $10^{10}$  vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados via intratraqueal com sílica (20 mg em 50  $\mu$ l de salina) e subdivididos em: animal instilado com sílica e “tratado” com salina (50  $\mu$ l de salina, it, SIL-SAL) e animais instilados com sílica e, tratados com AAV8-PEDF, (50  $\mu$ l de AAV8-PEDF,  $10^{10}$  vg, it, SIL-PEDF) (figura 8).



**Fig. 8. Grupos experimentais.** Os animais do grupo controle (C) foram divididos em dois grupos: controle salina (C-SAL, 50  $\mu$ L de salina, it); controle tratado com vetor AAV8-PEDF (C-PEDF, 50  $\mu$ l,  $10^{10}$  vg, it); os animais do grupo de sílica (SIL) foram, também, divididos em dois grupos: animais desafiados com sílica (SIL-SAL, 20 mg/50  $\mu$ L de salina); Sílica tratado com vetor AAV8-PEDF (SIL-PEDF, 50  $\mu$ l,  $10^{10}$  vg, it). Os desafios e tratamentos foram realizados por via intratraqueal (it).

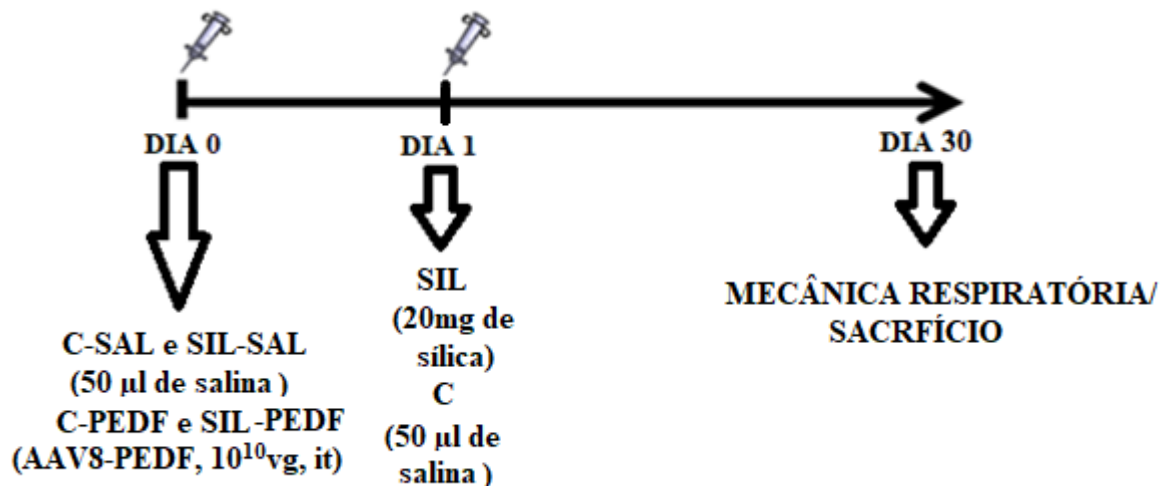


No primeiro modelo experimental (Modelo 1), 30 camundongos foram divididos aleatoriamente de acordo com os grupos citados acima. No dia 0 os animais do grupo SIL foram instilados com sílica, para iniciar o processo inflamatório e desencadear o início do desenvolvimento da silicose, enquanto que os animais do grupo C foram instilados com salina. Após 15 dias os animais dos subgrupos C-PEDF e SIL-PEDF foram instilados com o AAV8-PEDF, enquanto que os animais dos subgrupos C-SAL e SIL-SAL foram instilados com salina. No 45º dia de protocolo os animais foram ventilados mecanicamente (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) e sacrificados imediatamente após a realização da mecânica respiratória através da seção da aorta abdominal e veia cava inferior, além de terem a traqueia ocluída ao final da inspiração por um fio de algodão (figura 9).



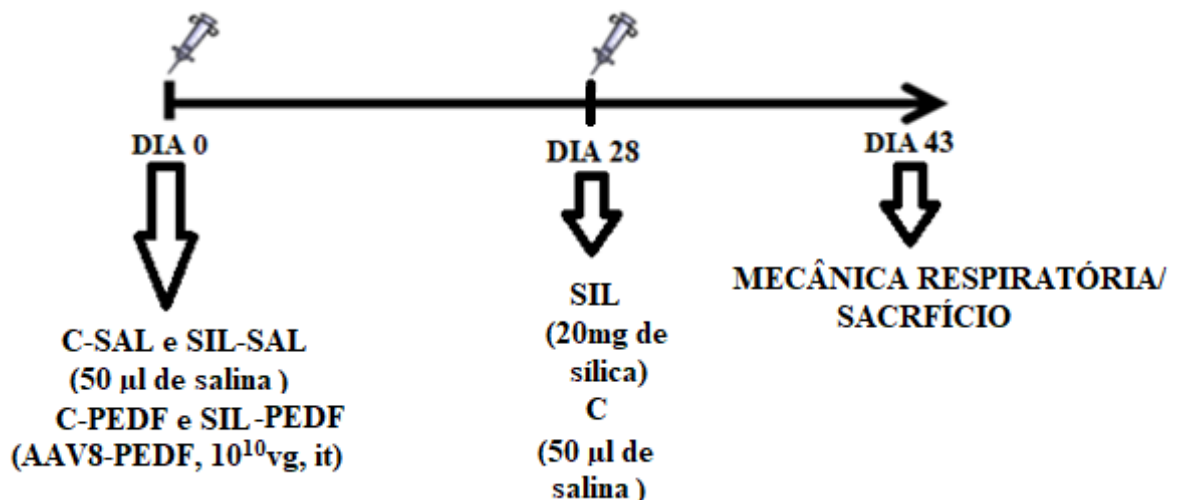
**Fig. 9. Linha do tempo Experimental.** Dia 0: Instilação de salina (50µL) ou sílica (20mg/50µL de salina); Dia 15, instilação de 50 µl de AAV8-PEDF e 50 µl de salina; Dia 45 realização da mecânica respiratória (subsequente retirada dos pulmões para análises) e sacrifício.

Para o segundo modelo (Modelo 2), 20 camundongos foram divididos nos mesmos grupos descritos acima. No dia 0 os subgrupos SIL-PEDF e C-PEDF foram instilados com AAV8-PEDF, enquanto que os animais do subgrupo C-SAL e SIL-SAL foram instilados com salina. No dia seguinte foi feita a instilação de sílica nos subgrupos SIL-SAL e SIL-PEDF, enquanto os outros animais tiveram a instilação de salina. No 31º dia de protocolo os animais foram ventilados mecanicamente (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) e sacrificados da mesma maneira descrita acima (figura 10).



**Fig. 10. Linha do tempo Experimental.** Dia 0: Instilação de 50 µl de AAV8-PEDF e 50 µl de salina; Dia 1: Instilação de salina (50µL) ou sílica (20mg/50µL de salina); Dia 30, realização da mecânica respiratória (subsequente retirada dos pulmões para análises) e sacrifício.

Na realização do terceiro modelo (Modelo 3), 25 camundongos foram divididos aleatoriamente nos mesmos grupos descritos acima. No dia 0 os animais dos subgrupos C-PEDF e SIL-PEDF foram instilados com AAV8-PEDF, e os animais dos subgrupos SIL-SAL e C-SAL foram instilados com salina. Após 28 dias os animais do grupo sílica foram instilados com sílica, enquanto que os outros animais tiveram a instilação de salina. No 43º dia de protocolo os animais foram ventilados mecanicamente (Samay VR15, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguai) e sacrificados da mesma maneira descrita acima (figura 11).



**Fig. 11. Linha do tempo Experimental.** Dia 0: Instilação de 50 µl de AAV8-PEDF e 50 µl de salina; Dia 28 Instilação de salina (50µL) ou sílica (20mg/50µL de salina); Dia 43 realizações da mecânica respiratória (subsequente retirada dos pulmões para análises) e sacrifício.

#### 4.5 - INSTILAÇÃO INTRATRAQUEAL

Neste procedimento os camundongos foram anestesiados com um anestésico inalatório (sevoflurano), colocados sobre uma mesa cirúrgica, com suas patas e seu rabo fixado na mesa através de fita adesiva, e tiveram sua traqueia exposta através de uma incisão cervical longitudinal anterior. Foi utilizado um *microsprayer* (aerolisador intratraqueal, Modelo S/M-551 1C DE IA, PennCentury Inc, Philadelphia, PA, EUA) unido a uma seringa de alta pressão (Modelo FMJ – 250, PennCentury Inc, Philadelphia, PA, EUA) para a instilação de rAAV8 ou salina. Após a incisão ser realizada com fio de sutura 5,0 o animal ficou por alguns minutos sob observação e, posteriormente, retornou a sua gaiola.

#### 4.6 - MECÂNICA RESPIRATÓRIA *IN VIVO*

Foi realizada a sedação e a anestesia dos animais com dose suficiente de diazepam (1 mg intraperitoneal - i.p - sedativo) e Tiopental sódico (20 mg/kg, i.p. – anestésico) para manter o animal em plano anestésico (supressão do reflexo córneo-palpebral) por uma hora. Os animais tiveram seus membros fixados por fita adesiva em uma mesa de acrílico, com sua barriga voltada para cima, com foco cirúrgico. Após o posicionamento cirúrgico (membros superiores a 90 graus em relação ao corpo e membros inferiores em diagonal), a traqueostomia foi realizada com introdução de jelco 20G com 32 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, com a cânula sendo fixada à traqueia por meio de fios de algodão.

O animal teve sua cânula traqueal conectada a um pneumotacógrafo para pequenos animais, descrito previamente por Mortola e Noworaj (1983) para medida de fluxo aéreo ( $V'$ ). Tal aparelho é composto por uma cânula metálica com duas saídas laterais apresentando as seguintes características: distância entre as saídas laterais = 2,1 cm; comprimento = 4,2 cm e diâmetro interno = 1,5 mm.

Aferiu-se a diferença de pressão (P) através do pneumotacógrafo pela utilização de um transdutor diferencial de pressão (UT-PDP-02, SCIREQ, Montreal, QC, Canadá). Tendo em vista que os animais de pequeno porte apresentam fluxos baixos e dimensões traqueais reduzidas, esses animais apresentam um fluxo laminar, permitindo, então, que o fluxo aéreo possa ser medido de acordo com a lei de Poiseuille, onde a diferença de pressão entre as saídas laterais do pneumotacógrafo é proporcional ao V, fazendo com que essa forma de medir fluxo aéreo seja adequada ao modelo. O volume (VT) mobilizado foi obtido por integração digital do sinal de fluxo.

Com a presença de outra saída lateral, outro transdutor diferencial de pressão (UT-PDP-300, SCIREQ, Montreal, Canadá) foi conectado a via aérea para a aferição da pressão

traqueal (Ptr). Erros foram evitados na medida de resistência ao fluxo pela inexistência de mudanças abruptas no diâmetro da traqueia até a extremidade da tubulação (CHANG; MORTOLA, 1981).

Através de um tubo “U” contendo água destilada, foi realizada a calibração dos transdutores de pressão. Antes de cada experimento foi realizada uma aferição.

O espaço morto da montagem foi de 0,1 ml. Foi aferido o peso do conjunto de equipamentos utilizados entre a via aérea do animal e o ventilador (pneumotacógrafo, conexões de borracha, tubo em “T” e cânula traqueal), vazio e cheio de água, para computar o espaço morto. Com a diferença de peso foi-se calculado o volume de água, permitindo, então, ser definido o volume do espaço morto do sistema. Massa de modelar, que também teve seu peso aferido, foi utilizada junto com demais equipamentos para fechar as saídas e encher o conjunto de água.

Após ter a musculatura paralisada com brometo de vecurônio (5 µg/kg i.v.), os animais tiveram a ventilação artificial instituída por um ventilador mecânico para pequenos animais (Samay VR15, Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai) acoplado ao pneumotacógrafo através da outra extremidade. A ventilação controlada com volume corrente (VT) de 0,2 ml e frequência respiratória de 100 incursões respiratórias por minuto (irpm), fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>) de 0,21 e relação Inspiração: Expiração de 1:2 foi instituída como modo ventilatório.

Após a adaptação ao respirador, foi realizada uma incisão cirúrgica na linha média do abdômen, na altura da extremidade inferior do esterno dos animais. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, e, em seguida, lateralmente, seguindo o bordo inferior das costelas até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. Após a abertura da cavidade abdominal, o diafragma pode ser visualizado, com isso, ele é perfurado e seccionado segundo a mesma orientação utilizada na cavidade abdominal. No instante anterior a perfuração do diafragma, a pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O foi instalada. A utilização da PEEP é muito importante pois evita o desenvolvimento de atelectasias resultantes da retirada da parede torácica e o colapso alveolar. Após o processo anterior, a parede torácica é removida por cortes longitudinais em seus dois lados.

O ventilador precisa, previamente, ser ajustado para quando solicitado, gerar uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Precisa-se tomar cuidado, especialmente, na manutenção do volume (VT = 0,2 ml) e fluxo (V' = 1 ml/s), para que se mantenham constantes em todos os animais, visando evitar efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (KOCHI, 1988a, 1988b).

Os parâmetros da mecânica respiratória foram obtidos através do método da oclusão ao final da inspiração.

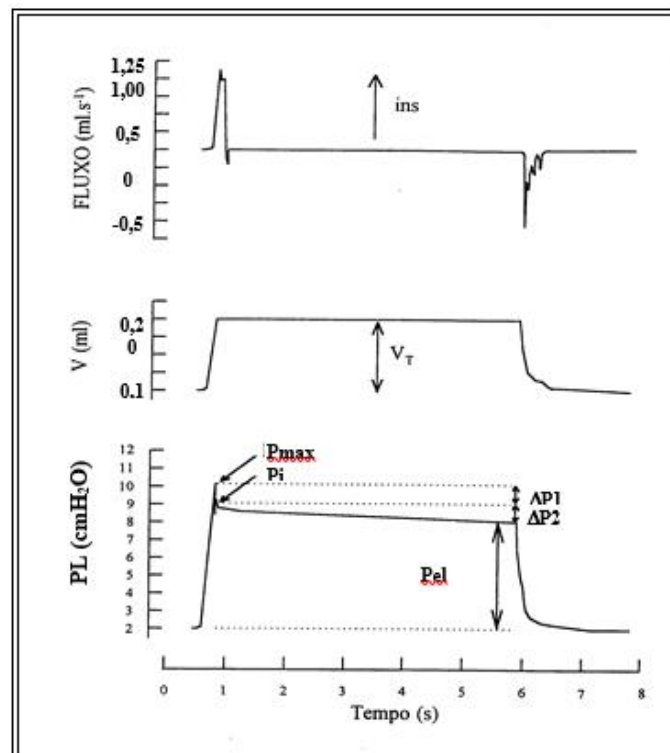
#### 4.6.1 - MÉTODO DE OCLUSÃO AO FINAL DA INSPIRAÇÃO

Com esse método temos a possibilidade de analisar os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão (BATES, 1985a, 1985b, 1988, 1989; KOCHI, 1988a, 1988b).

A pressão traqueal ( $P_{tr}$ ) equivale a pressão transpulmonar (PL) quando o tórax do animal se encontra aberto. Sob fluxo constante, a oclusão das vias aéreas por cinco segundos ao final da inspiração, causa uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ( $P_i, L$ ), fazendo com que, imediatamente depois, o decaimento da pressão se torne mais lento, tendo em sua porção terminal, um platô. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el}, L$ ). A diferença entre a pressão máxima inicial ( $P_{max}, L$ ) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $\Delta P_i, L$ ), representa a diferença de pressão ( $\Delta P_1, L$ ), que caracteriza a queda rápida inicial e corresponde ao componente viscoso pulmonar, ou seja, reflete a pressão necessária para vencer a resistência do pulmão (BATES, 1988, 1989; KOCHI, 1988a; 1988b). A pressão dissipada necessária para vencer o componente viscoelástico (*stress relaxation*) e/ou inhomogêneo (*pendelluft*) do tecido pulmonar é refletida pela segunda variação de pressão ( $\Delta P_2, L$ ), que por sua vez, é representada pela queda lenta do  $P_i, L$  ao platô ( $P_{el}, L$ ) (Figura 12). A elastância estática do pulmão ( $Est, L$ ) é calculada pela divisão da  $P_{el}, L$  pelo  $V_T$ . As fórmulas a seguir foram utilizadas na análise da mecânica respiratória:

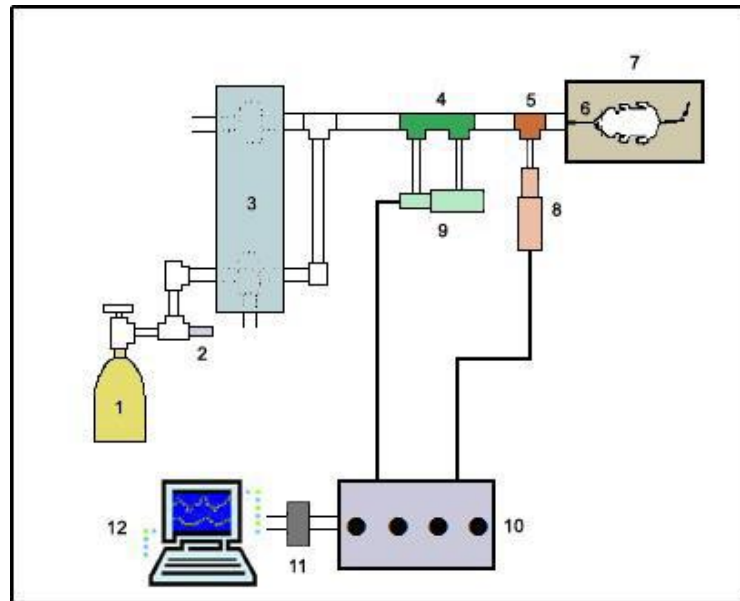
$$(1) \Delta P_1 = P_{max} - P_i \quad (2) \Delta P_2 = P_i - P_{el} \quad (3) Est = P_{el} / V_T$$

O aparelho utiliza uma válvula que o tempo de fechamento definido (10 ms) é utilizado para realizar a oclusão. Pelo fato de o fechamento não ser instantâneo, o fluxo nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, o que propicia a existência de um pequeno volume. O fluxo citado é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, conseqüentemente, da  $P_i, L$  e da  $P_{el}, L$  (Figura 12).



**Fig. 12. Método de oclusão ao final da inspiração.** Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume (V) e pressão transpulmonar (PL) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 ml e fluxo aéreo de 1 ml/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na PL ( $\Delta P1$ ) que corresponde a  $P_{max} - P_i$ , pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ( $\Delta P2$ ), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representado pela pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{el}$ ). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O.

Cada animal teve registrado 10-12 ciclos pelo método de oclusão ao final da inspiração. Os transdutores que foram conectados ao pneumotacógrafo e ao tubo traqueal registraram os sinais de  $V''$  e PL, respectivamente. Os sistemas de registro da PL demonstraram estabilidade em respostas de frequência de até 20 Hz. Os sinais colhidos foram condicionados [Scireq, Scientific Respiratory Equipment Inc. (SC-24), Montreal, Canadá], filtrados, convertidos a sinais digitais por um conversor analógico-digital de 12-bits (DT-2801A, Data Translation, Malboro, EUA) e amostrados a uma frequência de 200 Hz. Os sinais foram armazenados em microcomputador para, através do programa ANADAT (RHT-InfoData, Montreal, Canadá), os dados serem analisados. A montagem experimental está ilustrada na Figura 13.



**Fig. 13: Montagem experimental para medição da mecânica respiratória.** 1- Cilindro de ar comprimido; 2- Rotâmetro de agulha; 3- Ventilador de fluxo inspiratório constante com duas válvulas solenóides; 4- Pneumotacógrafo; 5- Peça T para medição de pressão nas vias aéreas; 6- Cânula traqueal; 7- Mesa cirúrgica; 8- Transdutor diferencial de pressão traqueal; 9- Transdutor diferencial de pressão para medição de fluxo; 10- Scireq-24; 11- Conversor analógico-digital de 12 bits; 12- Microcomputador.

Diferentes fluxos de ar foram aplicados ao sistema para aferir a resistência total do equipamento ( $R_{eq}$ ), incluindo a cânula traqueal (até fluxos de 26 ml/s, bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), com registro das variações de pressão ( $P$ ) ocorrendo concomitantemente. Uma vez que  $R_{eq} = P / V'$ , a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva  $P \times V'$ . A pressão resistiva do equipamento ( $= R_{eq} \times V'$ ) e a pressão resistiva dos pulmões serão subtraídas de forma que os resultados representem as propriedades mecânicas intrínsecas. A medição de resistência ao fluxo terá erros evitados pela inexistência de mudanças abruptas no diâmetro do circuito (da traquéia até a extremidade do pneumotacógrafo) (CHANG; MORTOLA, 1981).

#### 4.7 - REMOÇÕES DOS PULMÕES

Após finalizar a coleta dos dados da mecânica respiratória, o terço inferior do abdômen do animal foi aberto por seção cirúrgica transversal e 1 ml de heparina (2000 U) diluída em 0,8 ml de salina foi injetado ventrículo esquerdo e, após 1 minuto, foram sacrificados através da seção da aorta abdominal e veia cava inferior, além de terem a traqueia ocluída ao final da inspiração por um fio de algodão com uma PEEP = 2 cmH<sub>2</sub>O.

Com uma pinça hemostática, a porção abdominal do esôfago foi identificada e isolada. Além disso, houve a liberação das vias aéreas através da dissecação das estruturas do pescoço. Com uma tração suave para cima, a pinça que segurava o esôfago foi separando-o das

estruturas aderidas a parede torácica posterior. Com todas as estruturas individualizadas, houve o seccionamento da traqueia acima do local ocluído e, posteriormente, o esôfago e o coração foram separados dos pulmões e vias aéreas com uma leve tração. Da mesma forma feita com a traqueia, os brônquios fontes direito e esquerdo foram ocluídos por um fio de algodão e, após uma seção acima do fio, foram separados os pulmões direito e esquerdo, mantendo o volume expiratório final. O lobo esquerdo do pulmão é congelado em nitrogênio líquido imediatamente após sua separação e armazenado no freezer -80.

## **4.8 - HISTOLOGIA PULMONAR**

### **4.8.1 - FIXAÇÃO E PREPARO DAS LÂMINAS PARA MICROSCOPIA**

O lobo direito do pulmão foi retirado e mantido em solução de paraformaldeído 4% na geladeira por 48 h. Após esse período, o material foi desidratado progressivamente através de imersão em soluções com concentração crescente de etanol como discriminado abaixo:

- 1) etanol 70%, clorofórmio 22,5% e ácido acético 7,5%, a - 20°C durante 1 h;
- 2) etanol 80%, clorofórmio 15% e ácido acético 5%, a - 20°C durante 1 h;
- 3) etanol 90%, clorofórmio 7,5% e ácido acético 2,5%, a - 20°C durante 1 h;
- 4) etanol 100%, sendo mantidos a - 20°C por 1 h.

Depois da desidratação, o material foi mergulhado em Xilol 1 e 2 por 1 h cada um e, em seguida, embebido em parafina 1 e 2 por 1 h cada, para que possam ser realizados cortes histológicos com 5 µm de espessura, através do micrótomo (Leica RM2235). Para que, então, fossem fixados na lâmina, os cortes foram levados a estufa, a uma temperatura de 56 a 58 °C,.

As lâminas contendo os cortes pulmonares foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) segundo seus aspectos quantitativos.

Quanto à fração de área de granuloma, foi quantificada a fração de área do parênquima pulmonar ocupada por granulomas.

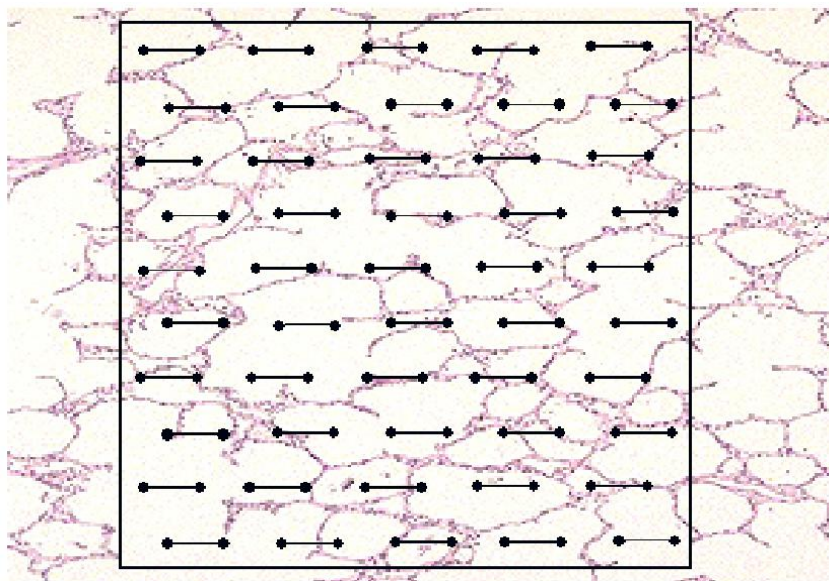
Os valores finais foram expressos como média ± erro padrão (EPM).

### **4.8.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

A análise quantitativa foi realizada através da técnica convencional de contagem de pontos (point-counting) (WEIBEL, 1990), utilizando-se um retículo acoplado a ocular do microscópio, contendo um sistema de referência de 100 pontos e 50 segmentos de reta dispostos em paralelo (Figura 14).



Para a quantificação da fração de área de granuloma, foram analisados vinte campos aleatórios e não coincidentes de cada lâmina, em um aumento de 20x. Em cada campo aleatório não coincidente, eram contados os pontos que caíam em uma área contendo granuloma. Para tal, foram ignorados a primeira linha de pontos e os quatro pontos mais externos da esquerda, totalizando 86 a serem levados em conta [número correspondente ao total de pontos (100) subtraído pelos 14 pontos da extremidade do retículo]. Com isso, ao final da análise de todos os campos, os pontos contados eram somados e, com o resultado da soma, a porcentagem é gerada em cima do número total de pontos (86 pontos por campo, sendo 20 campos, temos um total de 1720 pontos) (GUNDERSEN et al., 1988).



**Fig. 14. Retículo de pontos.** Retículo com 100 pontos e 50 linhas utilizado para análise histológica de morfometria e celularidade pulmonar.

## 4.9.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 4.9.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Amostras do lobo esquerdo do pulmão previamente congelados foram homogeneizadas e purificadas através do ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega, Wisconsin, EUA). Os tecidos pulmonares foram rompidos com Buffer LBA (adicionado de 1-thioglicerol) e colocado no homogenizador de tecido com uma bid dentro do tubo contendo a amostra. Após a homogeneização do tecido, adicionar volume igual de RNA dilution buffer (RDB) e incubar por 1 minuto, passados 1 minuto, centrifugar a temperatura ambiente por 3 minutos a 10.000 x g e, em seguida, transferir o sobrenadante para um tubo novo. O líquido coletado foi misturado ao isopropanol e transferido para a minicoluna ReliaPrep™ para ser centrifugado a 12.000 x g por 1 minuto. Descartado o líquido que passou

pela coluna, a coluna é devolvida ao tubo e é adicionado o RNA wash solution (diluído em etanol), que foi centrifugada a 12.000 x g por 30 s. Após esta etapa, o líquido que passou é, novamente, descartado. Na etapa seguinte adicionar a mix incubadora DNase I (contendo yellow core buffer, MnCl<sub>2</sub> e enzima DNase I) na membrana da coluna e incubar por 15 minutos. Após a incubação adicionar column wash solution a coluna e centrifugar a 12.000 x g durante 15 segundos. Para lavar a membrana da coluna é adicionado novamente o RNA wash solution e centrifugado a 12.000 x g por 30 segundos. O RNA foi ressuscitado em 50 µl de água livre de RNase em um novo tubo coletor.

Após a extração, a concentração das amostras de RNA total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm (Thermo Scientific NanoDrop, EUA). Uma leitura no comprimento de onda a 280 nm também foi realizada na solução de RNA e a razão entre os comprimentos de onda 260 e 280 nm foi realizada para determinar o grau de pureza da solução de RNA. As soluções com relações abaixo de 1,8 e acima de 2,1 foram consideradas impróprias para uso, devido à contaminação com proteínas.

#### **4.9.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA**

A síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) foi realizada através do High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Appliedbiosystems, ThermoFisher Scientific).

A fita única de cDNA foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total extraído do pulmão dos animais. Primeiramente é necessário padronizar a concentração das amostras para 1 µg/10µl. Para cada 1 µg de RNA utiliza-se 10 µl de 2x RT máster mix (contendo 10X RT buffer, 25X dNTP mix – 100mM -, 10X RT random primers, transcriptase reversa, e água livre de nucleasse), o qual contém os reagentes necessários para que o RNA extraído seja transcrito em cDNA. Após a preparação de 10 µl do mix (no gelo), é adicionado ao tubo 10 µl da amostra de RNA. A solução foi incubada por 10 min a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e finalizando com 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi estocado a - 20°C até que fosse realizada a PCR.

#### **4.9.3 PCR EM TEMPO REAL (RT-PCR)**

O cDNA, obtido anteriormente, foi utilizado como molde na PCR. O acúmulo da quantidade relativa de RNAm do gene PEDF humano (SERPIN, Qiagen, Valencia, CA) tiveram a análise molecular realizada através da técnica de PCR em tempo real (*Real Time PCR*) na presença do GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), que contém todos os

componentes requeridos para a realização do PCR, exceto a amostra de DNA e o primer para o gene alvo. A quantificação do RNAm dos genes foi realizada através da análise da razão entre os valores correspondentes ao gene estudado pelo seu respectivo controle interno *Acidic ribosomal phosphoprotein P0* (36B4, com sequência de oligonucleotídeos Forward: CAACCCAGCTCTGGAGAAAC; Reverse: GTTCTGAGCTGGCACAGTGA). Todos os experimentos da PCR em tempo real foram realizados em máquinas da Mastercycler epgradient S (Hamburg, Alemanha).

Foram realizadas amplificações das sequências específicas de RNAm em placas de 96 poços contendo um volume final de 15  $\mu$ l, dos quais 7,5  $\mu$ l de GoTaq® qPCR, 1  $\mu$ l de cDNA, Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA) e 0,4  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo sense e antisense. Após a desnaturação inicial à 95° C por 10 min, foram seguidos os seguintes parâmetros para os genes estudados: 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min. Para se monitorar a quantidade de produto amplificado, a medida da fluorescência do SYBER foi medida por ciclo durante a ciclagem. Para ter certeza de que o produto amplificado foi o produto de interesse, foi realizada uma curva de dissociação (curva de *melting*), no final de todo o programa de ciclagem. As amostras de cDNA foram amplificadas em duplicata, além de conter uma amostra em ausência de transcriptase reversa (RT-), que foi incubada e nomeada como controle negativo. A quantidade relativa do RNAm de cada gene foi calculada pela diferença entre o gene estudado e seu respectivo controle endógeno (36B4).

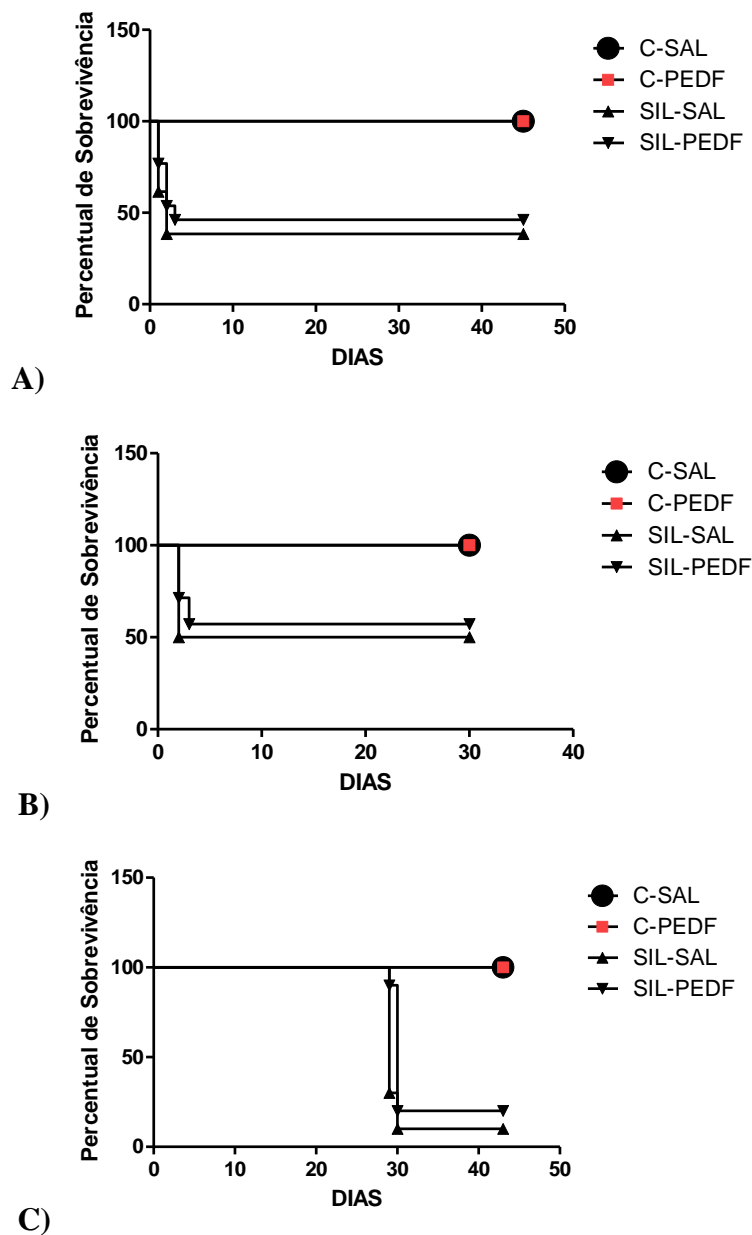
#### **4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5® ,para Windows® (V 3.0), para a análise dos dados obtidos. Foi feita a análise de variância entre os grupos – One Way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Houve transformação arcoseno em parâmetros apresentados em forma percentual, na intenção de que a distribuição se torne próxima do normal, permitindo, assim, a realização dos testes de variância (ZAR, 1996). O grau de significância foi considerado de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 – MORTALIDADE

A instilação de sílica, em todos os modelos experimentais (modelo 1 - vetor AAV8-PEDF instilado 15 dias depois da instilação de sílica, modelo 2 - vetor AAV8-PEDF instilado 1 dia antes da instilação de sílica e modelo 3 - vetor AAV8-PEDF instilado 28 dias antes da instilação de sílica), gerou uma alta taxa de mortalidade entre 24 e 48h após a instilação de sílica. Porém pode ser notado que, no modelo 3, os animais do subgrupo SIL-PEDF apresentaram mortalidade menor que a do SIL-SAL, além de morrerem 24h depois. (Figura 15).

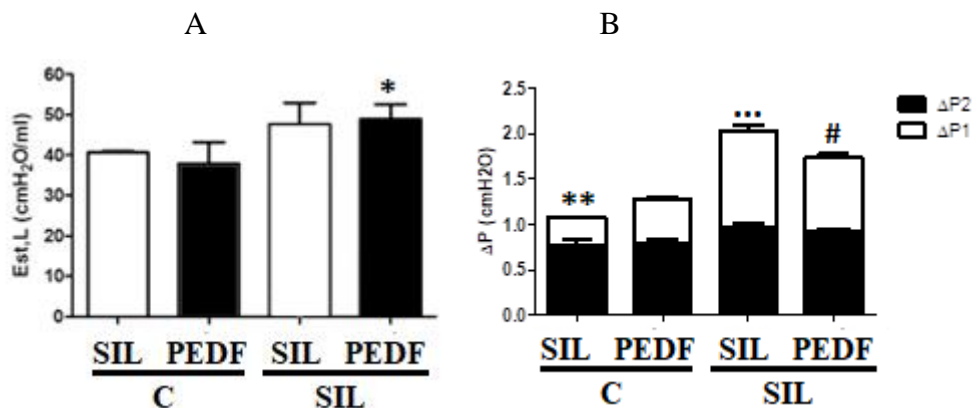


**Fig. 15. Curva de Kaplan-Meier** – A) Realizado em 30 animais do Modelo 1 (apenas 15 sobreviveram), B) 20 animais do Modelo 2 (apenas 13 sobreviveram) e C) 25 animais do Modelo 3 (apenas 8 sobreviveram).

## 5.2 – MECÂNICA RESPIRATÓRIA

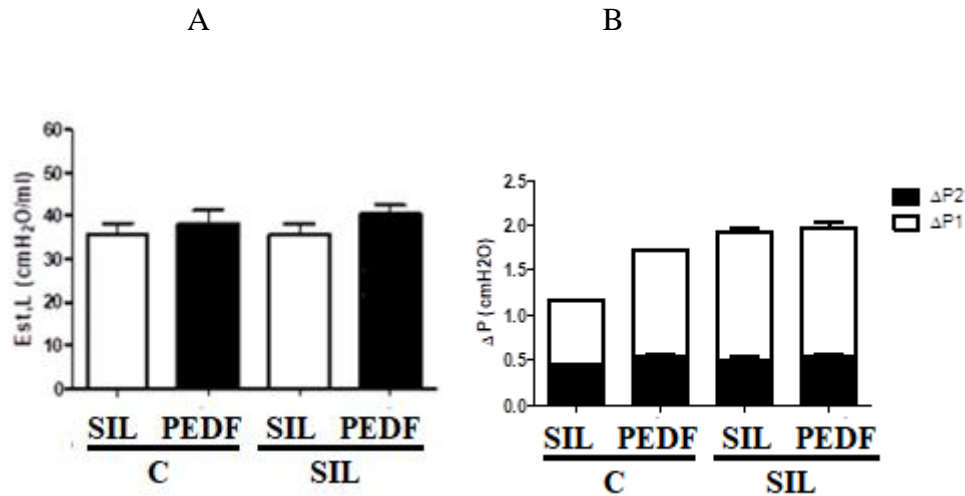
Com o objetivo de avaliar os efeitos da instilação com o gene PEDF na função pulmonar de camundongos silicóticos, os parâmetros: Est,L,  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$  foram analisados in vivo.

Observou-se no Modelo 1 uma diferença na Est,L quando comparados os subgrupos do grupo controle e sílica, o que sugere que a sílica foi desenvolvida, porém, quando observados grupos SIL-SAL e o grupo SIL-PEDF, não foi observado diferença significativa entre eles. (Figura 16A) Além disso, podemos observar na figura 16-B que os subgrupos do grupo controle apresentaram um valor  $\Delta P_1$  mais baixos que os subgrupos sílica, ademais uma pequena redução de  $\Delta P_1$  pode ser observada quando comparados os grupos SIL-PEDF e SIL-SAL, entretanto, não há diferença significativa entre os grupos. O mesmo padrão é observado na comparação do  $\Delta P_{tot}$ , porém o  $\Delta P_2$  não apresentou diferença entre os grupos experimentais (Figura 16).



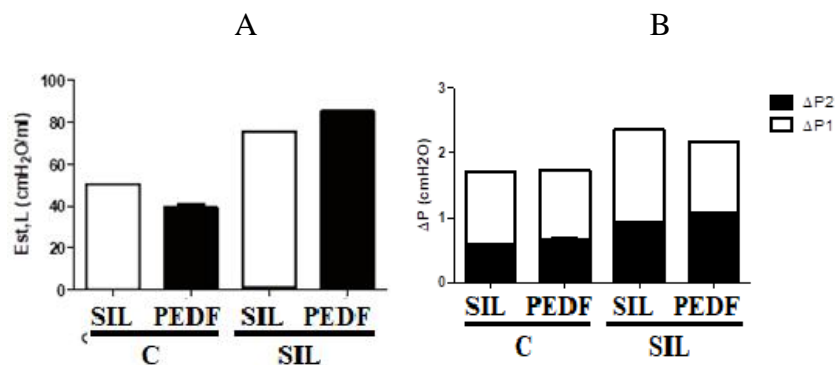
**Fig. 16. Mecânica respiratória – Modelo 1-** A) Elastância estática (Est,L); B) Variações de pressão necessárias para vencer os componentes resistivos ( $\Delta P_1$ ), viscoelásticos/inomogeneos pulmonares ( $\Delta P_2$ ); a altura total das colunas representa  $\Delta P_{tot}$ . Grupo controle salina (50  $\mu$ l de salina, intratraquealmente, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50 $\mu$ l de vetor AAV8 carregando o gene que codifica o PEDF, 10<sup>10</sup> vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados via intratraqueal com sílica, no dia 0, (20 mg) e receberam salina (50  $\mu$ l de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 15, (50  $\mu$ l de AAV8-PEDF, 10<sup>10</sup> vg, it, SIL- PEDF) sofrendo sacrifício no dia 45. As estatísticas quanto a  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$  foram feitas separadamente. Os valores são médias  $\pm$  SEM de 4 animais por grupo. Para Est,L, \* vs C-PEDF. Para  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_{tot}$  \*\* vs SIL-SAL, \*\*\* vs C-PEDF, # vs C-PEDF,  $p > 0,05$ .

Os parâmetros de mecânica (Est,  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$ ) do Modelo 2 não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 17). Entretanto, devido ao pequeno número de animais, a diferença estatística não pôde ser calculada.



**Fig. 17. Mecânica respiratória – Modelo 2** - A) Elastância estática (Est,L); B) Variações de pressão necessárias para vencer os componentes resistivos ( $\Delta P_1$ ), viscoelásticos/inomogêneos pulmonares ( $\Delta P_2$ ); a altura total das colunas representa  $\Delta P_{tot}$ . Grupo controle salina (50  $\mu$ l de salina, intratraquealmente, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50  $\mu$ L de vetor AAV8 carregando o gene que codifica o PEDF,  $10^{10}$  vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados via intratraqueal com sílica, no dia 1, (20 mg) e, antes disso, receberam salina (50  $\mu$ l de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 0, (50  $\mu$ l de AAV8-PEDF,  $10^{10}$  vg, it, SIL-PEDF) e foram sacrificados no dia 30. As estatísticas quanto a  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$  foram feitas separadamente. Os valores não são estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 3 animais por grupo.

Os valores obtidos nas análises de Est,L,  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$  do Modelo 3 demonstram diferença entre os subgrupos do grupo controle e os subgrupos do grupo silicótico, sugerindo o desenvolvimento da silicose. Entretanto, devido ao pequeno número de animais, a diferença estatística não pôde ser calculada, com isso, novos experimentos devem ser realizados para elucidar o efeito da terapia gênica via AAV8-PEDF (figura 18).



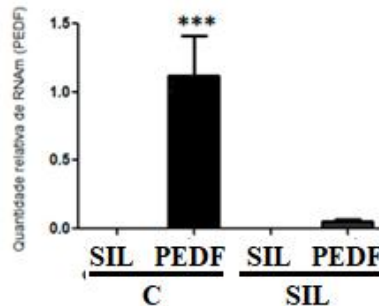
**Fig. 18. Mecânica respiratória – Modelo 3** - a) Elastância estática (Est,L); b) Variações de pressão necessárias para vencer os componentes resistivos ( $\Delta P_1$ ), viscoelásticos/inomogêneos pulmonares ( $\Delta P_2$ ); a altura total das colunas representa  $\Delta P_{tot}$ . Grupo controle salina (50  $\mu$ l de salina, intratraquealmente, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50  $\mu$ L de vetor AAV8 carregando o gene que codifica o PEDF,  $10^{10}$  vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados via intratraqueal com sílica, no dia 28, (20 mg) e, antes disso, receberam salina (50  $\mu$ l de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 0, (50  $\mu$ l de AAV8-PEDF,  $10^{10}$  vg, it, SIL-PEDF) e foram sacrificados no dia 43. As estatísticas quanto a  $\Delta P_1$ ,  $\Delta P_2$  e  $\Delta P_{tot}$  foram feitas separadamente. Os valores não são estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 2 animais por grupo.

## 5.3 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE PELA TÉCNICA DE RT-PCR

### 5.3.1 - RT-PCR hPEDF

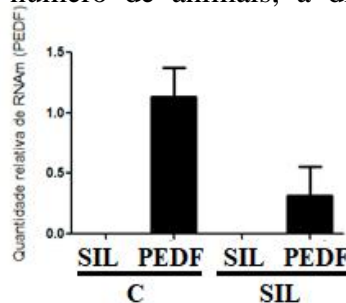
A expressão do gene que codifica o PEDF humano foi observada somente nos animais que receberam o PEDF exógeno, sendo nula a expressão do gene nos grupos CTRL e SIL-SAL, os quais receberam apenas salina.

Observou-se uma diminuição da quantidade relativa de RNAm, do gene hPEDF, do grupo SIL-PEDF em relação ao grupo C-PEDF, sugerindo uma baixa eficiência na transferência gênica. (Figura 19)



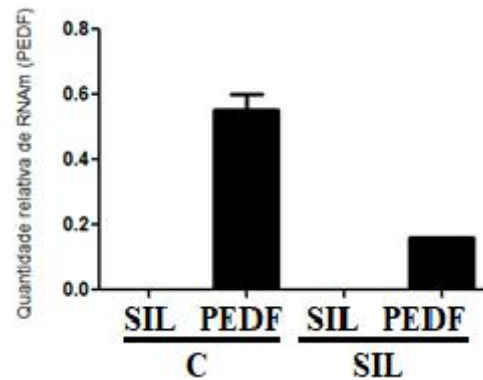
**Fig. 19. PCR em tempo real – Modelo 1** - Gráfico representativo da média das razões entre os valores densitométricos arbitrários dos genes hPEDF/36B4. Grupo controle salina (50 µl de salina, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50µL de vetor AAV8 carregando o gene que codifica o PEDF, 10<sup>10</sup> vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados com sílica, no dia 0, (20 mg) e receberam salina (50 µl de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 15, (50 µl de AAV8-PEDF, 10<sup>10</sup> vg, it, SIL- PEDF) sendo sacrificados no dia 45. Foi analisada a quantidade de RNAm transcrito (PEDF). Os valores são médias ± SEM de 4 animais por grupo. \*\*\* vs C-SAL, SIL-SAL E SIL-PEDF, p>0,05.

Ao analisar os níveis relativos de RNAm do gene hPEDF dos Modelos 2 e 3 notou-se uma diminuição da expressão no grupo SIL-PEDF em relação ao grupo C-PEDF (figura 20 e 21). Porém, no modelo 3, foi observado a melhor proporcionalidade de expressão entre o subgrupo SIL-PEDF e C-PEDF quando comparada aos mesmos subgrupos dos modelos 2 e 3. Entretanto, devido ao pequeno número de animais, a diferença estatística não pôde ser calculada.



**Fig. 20. PCR em tempo real – Modelo 2-** Gráfico representativo da média das razões entre os valores densitométricos arbitrários dos genes hPEDF/36B4. Grupo controle salina (50 µl de salina, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50µL de vetor AAV8-PEDF, 10<sup>10</sup> vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados com sílica, no dia 1, (20 mg) e receberam salina (50 µl de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 0, (50 µl de AAV8-PEDF, 10<sup>10</sup> vg, it, SIL- PEDF) sendo sacrificados no dia 30. Foi analisada a quantidade de RNAm transcrito (PEDF). Os valores não são estatisticamente diferentes (p>0,05). Os valores são médias ± SEM de 3 animais por grupo.



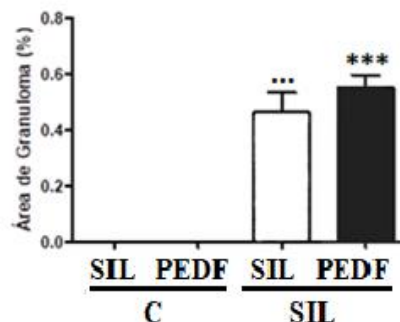


**Fig. 21. PCR em tempo real – Modelo 3-** Gráfico representativo da média das razões entre os valores densitométricos arbitrários dos genes hPEDF/36B4. Grupo controle salina (50 µl de salina, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50µL de vetor AAV8 carregando o gene que codifica o PEDF,  $10^{10}$  vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados com sílica, no dia 1, (20 mg) e receberam salina (50 µl de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 0, (50 µl de AAV8-PEDF,  $10^{10}$  vg, it, SIL- PEDF) sendo sacrificados no dia 30. Foi analisada a quantidade de RNAm transcrito (PEDF). Os valores não são estatisticamente diferentes ( $p>0,05$ ). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 2 animais por grupo.

#### 5.4 ÁREA DE GRANULOMA

Para dar suporte anatômico aos resultados de função respiratória, foi analisada a porcentagem da área do parênquima pulmonar que foi afetada por granulomas formados pela interação com a partícula de sílica.

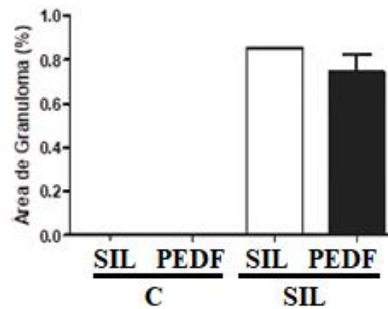
Observamos no Modelo 1 a ausência de granulomas nos grupos controles, demonstrando a ausência da doença nos animais controle, além disso, nos grupos SIL-SAL e SIL-PEDF foi observada a presença de granulomas, ultrapassando os 50% da área do parênquima pulmonar, porém não foi observado diferença entre os grupos silicóticos (figura 22).



**Fig. 22. Área de granuloma – Modelo 1 -** Grupo controle salina (50 µl de salina, intratraquealmente, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50µL de vetor AAV8 carregando o gene que codifica o PEDF,  $10^{10}$  vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados via intratraqueal com sílica, no dia 0, (20 mg) e receberam salina (50 µl de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 15, (50 µl de AAV8-PEDF,  $10^{10}$  vg, it, SIL- PEDF) sendo sacrificados no dia 45. Foi analisado as frações de área do pulmão ocupadas por alvéolos colapsados ou normais (lâminas em duplicata). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 4 animais por grupo. \*\*\* vs C-SAL e C-PEDF, \*\* vs C-PEDF e C-SAL,  $p>0,05$ .



Devido a limitações técnicas a análise da área de granuloma do Modelo 2 não foi realizada. Nota-se no Modelo 3 que o parênquima pulmonar dos grupos C-SAL e C-PEDF não foi afetado (0% de área de granuloma), ou seja, não há doença. Quando analisados os grupos SIL-SAL e SIL-PEDF, pode ser visto o desenvolvimento da doença, com o granuloma chegando aos 80% da área do parênquima pulmonar (figura 23). Porém, devido ao pequeno número de animais, a diferença estatística não pôde ser calculada.



**Fig. 23. Área de granuloma – Modelo 3** - Grupo controle salina (50 µl de salina, intratraquealmente, it, C-SAL), grupo controle PEDF (50µL de vetor AAV8 carreando o gene que codifica o PEDF,  $10^{10}$  vg, it, C-PEDF). Os animais do grupo sílica foram instilados via intratraqueal com sílica, no dia 28, (20 mg) e, antes disso, receberam salina (50 µl de salina, it, SIL-SAL) ou PEDF, no dia 0, (50 µl de AAV8-PEDF,  $10^{10}$  vg, it, SIL-PEDF) sendo sacrificados no dia 43. Foi analisado as frações de área do pulmão ocupadas por alvéolos colapsados ou normais (lâminas em duplicata). Os valores não são estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ). Os valores são médias  $\pm$  SEM de 2 animais por grupo.

## 6 – DISCUSSÃO

A silicose é a pneumoconiose mais incidente no mundo, sendo a doença respiratória ocupacional que mais causa invalidez. A partícula da sílica contém algumas características que são “pré-requisitos” para o desencadeamento da doença, dentre elas, a piezoelectricidade, além disso, o tempo e intensidade de exposição são fundamentais para o desenvolvimento da doença (TERRA FILHO e SANTOS, 2006). A prevenção da doença é realizada através de uso de equipamentos de proteção individual (EPI's) e medidas de controle de emissão de poeira contendo sílica, porém, ainda assim, a doença é muito prevalente no mundo, sendo um dos países mais afetados, o Brasil. Até hoje não foi desenvolvido um tratamento eficaz contra a doença, nenhum foi capaz de minimizar as alterações ultraestruturais características da mesma.

O quadro crônico da doença, em humanos, ocorre através de exposições à partícula de sílica em baixas concentrações por longos períodos de tempo, tal exposição resulta em uma forte resposta inflamatória e, posteriormente, fibrose pulmonar. Os primeiros sintomas aparecem após o parênquima pulmonar do indivíduo já estar comprometendo sua função respiratória, o que acontece após anos de exposição. A fibrose é progressiva, e resulta na redução da capacidade pulmonar total, da capacidade de difusão e da complacência pulmonar (GREENBERG et al., 2007). Porém, estudos em camundongos, evidenciaram que apenas uma exposição a partícula de sílica desencadeia o desenvolvimento de características morfo-funcionais da silicose, sendo necessários 7 dias para o desenvolvimento de resposta inflamatória e 15 dias para observar alterações histológicas compatíveis com fibrose pulmonar, em modelo de instilação intratraqueal com 20 mg de sílica, ressuspensos em 50 $\mu$ L (FAFFE *et al.*, 2001, ZHAO *et al.*, 2013, LEE *et al.*, 2013).

Como a silicose ainda não apresenta um tratamento efetivo desenvolvido, incessantes estudos continuam sendo feitos para tal desenvolvimento, e algumas terapias vêm mostrando resultados positivos, dentre elas, a terapia gênica (M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016).

No tratamento da silicose, a terapia gênica pode agir regulando, deletando ou adicionando uma sequência gênica que aja no processo inflamatório e (ou) fibrótico resultante da deposição da partícula de sílica nos alvéolos pulmonares, visando diminuí-los ou para-los. Para isso, é necessário achar o vetor ideal para carrear esse gene para o núcleo das células pulmonares. Dentre os vetores, virais e não virais, os vírus, por já obterem, evolutivamente, a capacidade de encapsidar seu material genético, invadir as células e fazer seu gene ser

produzido por essas células, como parte do processo natural de infecção, eles são considerados os melhores vetores para a utilização na terapia gênica (MISRA, 2013).

O vírus adeno-associado (AAV), por ser pouco imunogênico, apresenta vantagem na sua utilização quando comparados com outros vetores virais. Além disso, seu sorotipo 8, o AAV8, apresenta tropismo natural por células pulmonares (LU, 2004, LIQUN et al, 2009; MARTINI, 2014). Porém, apesar do AAV apresentar baixa imunogenicidade, a administração do vetor AAV2 no pulmão gerou leve resposta inflamatória, porém, não foi suficiente para induzir modificações significativas na função respiratória (LASSANCE et al, 2008). Porém, em estudo recente de nosso laboratório foi demonstrado, através da mecânica respiratória, que a administração do AAV8, com mutação pontual Y-F no capsídeo - Y733F, garreando GFP (analisados com 7, 14, 21 e 28 dias), após sua instilação, não gerou nenhum dano ao pulmão, pois as elastância do pulmão dos animais tratados não diferiram do grupo controle, além de não ser encontrado alterações morfológicas indicativas de inflamação (FERREIRA *et al.*, 2016). Tais resultados sugerem que o vírus AAV8 mutado (M-AAV8) pode ser utilizado como potencial vetor para transferência de genes na terapia gênica do pulmão, o que o torna um bom vetor para ser utilizado no desenvolvimento de uma terapia para a silicose.

O Fator Derivado do Epitélio Pigmentado (PEDF) vem se mostrando uma proteína promissora para a utilização de tratamentos em modelo murino de inflamação pulmonar. Em um estudo realizado recentemente foi demonstrado que o PEDF foi capaz de reduzir a inflamação e o remodelamento das vias aéreas em modelo murino de asma (ZHA et al, 2016). Além disso foi demonstrado que o PEDF exerce importante papel na regulação da angiogênese, inflamação e fibrose (SHIN, SORENSON, SHEIBANI, 2013). Tais fatores são fundamentais para o desenvolvimento da silicose. Com isso, pode ser comprovado seu potencial para o tratamento de doenças inflamatórias e fibrogênicas, como a silicose.

Em estudos prévios do nosso grupo foi demonstrada eficiência da transdução viral do AAV8-PEDF em pulmão de camundongo. No estudo foi analisado a expressão gênica de PEDF, mecânica respiratória e parâmetros morfométricos e celulares do pulmão nos dias 7, 14, 21 e 28. As análises foram realizadas tanto nos animais controle quanto nos animais tratados com vetor AAV8-PEDF. Foi observado em apenas uma semana de instilação, o acúmulo de RNAm do transgene, indicando um início precoce, o que sugere que sua característica auto complementar do DNA (scAAV), quando as duas fitas complementares se associam para formar uma fita dupla de DNA, gera uma rápida expressão (FERREIRA *et al.*, 2016), além disso foi visto que a expressão se mantinha pelos 28 dias, alcançado neste, seu pico de expressão, correspondendo ao esperado (YOKOI et al, 2007; BUIE et al, 2010).

Ademais, foi visto que os grupos que receberam o vetor não demonstraram diferença estatística com os grupos controle, quando analisadas a função pulmonar, morfometria e celularidade, sugerindo segurança na sua administração (FERREIRA *et al.*, 2016).

Baseando-se em resultados prévios, a estratégia terapêutica foi desenvolvida em 3 modelos diferentes: um tratamento pós instilação de sílica (AAV8-PEDF instilado 15 dias depois da sílica); um tratamento iniciado um dia antes da instilação de sílica (AAV8-PEDF instilado 1 dia antes da instilação de sílica) e um pré tratamento (AAV8-PEDF instilado 28 dias antes da sílica). Com isso, pode-se avaliar a eficácia do tratamento em 3 situações clínicas diferentes, o tratamento após o desenvolvimento da doença, um tratamento um pouco antes da exposição (por alguém que precisasse se expor a partículas sem muito tempo para se planejar) e um tratamento bem antes da exposição a sílica, utilizado para a prevenção contra a doença, pois quando exposto a sílica, o vetor já terá alcançado seu pico de expressão.

As modificações do parênquima pulmonar, como o desenvolvimento de granulomas, que a exposição a sílica causa, possuem ligação com as alterações da função respiratória. Em modelo murino de silicose é descrito o aumento da elastância estática de resistência tecidual, além de posterior aumento na histeresividade associado ao tempo de lesão, como descritos por Faffe e Zin 2009. Alterações essas que apresentam correlação, também, com a inflamação e o remodelamento do parênquima pulmonar. A elastância e a resistência tecidual tem seu aumento diretamente relacionados a deposição de colágeno (FAFFE *et al.*, 2001).

No primeiro modelo, a instilação de AAV8-PEDF e salina foi realizada no dia 15, pois em nosso modelo de indução de silicose a doença leva 15 dias para se desenvolver, com isso, estamos analisando o efeito do tratamento sendo feito após o desenvolvimento da doença. A análise da mecânica respiratória e finalização do procedimento do modelo experimental são feitas após 30 dias, da instilação, pois, no dia 28, há o pico de expressão do vetor AAV8-PEDF, tendo assim, tecnicamente, atingido seu limite de expressão e realizado seu máximo efeito terapêutico.

A instilação de sílica nesse modelo causou uma alta taxa de mortalidade nas primeiras 24 e 48 horas após a instilação, o que pode ser explicado pela alta taxa de exposição a partícula de sílica, o que poder ter causado, além do entupimento de algumas vias respiratórias, uma resposta inflamatória muito forte gerada por uma distribuição desigual das partículas de sílica no pulmão, deixando a concentração muito alta em determinados locais, levando a óbito os animais.

Neste modelo, a instilação de sílica provocou alterações histológicas no pulmão, como a presença de granulomas, o que é compatível com estudos prévios que validam nosso modelo

experimental (BORGES et al., 2001, FAFFE et al., 2001). A histologia apresentou um aumento na área de granuloma do grupo tratado SIL-PEDF quando em comparação com o grupo doente SIL-SAL, fato que pode ser explicado pela instilação viral ter sido após o estabelecimento da doença, com isso, o número de células viáveis para a infecção se torna baixa, pois, no processo de inflamação da silicose, morte celular tecidual é causada através da citotoxicidade direta da sílica, geração de oxidantes, apoptose e liberação de metaloproteinases no parênquima (M.L. PACHECO, E. BANDEIRA, M.M. MORALES, 2016), fazendo com que a transdução e a expressão do vetor e transgene, respectivamente, tenham sua eficiência muito reduzida, o que vem a impedir um efeito significativo do gene PEDF no processo silicótico.

Como consequência das modificações histológicas pulmonares, o grupo SIL-SAL do modelo 1 apresentou um aumento na elastância pulmonar (Est,L) em comparação com o grupo controle. Em corroboração com os resultados histológicos, não foi observada diferença na Est,L do grupo tratado SIL-PEDF em comparação com o grupo doente SIL-SAL. Apesar de não se ter visto melhora na Est,L, a terapia conseguiu reduzir  $\Delta P1$  e  $\Delta P_{tot}$  no grupo SIL-PEDF em relação ao grupo SIL-SAL, em contrapartida os valores de  $\Delta P2$  não apresentaram diferença.

Ainda no primeiro modelo, foi apresentada diferença significativa na quantidade relativa de RNAm entre o grupo controle C-PEDF e o grupo tratado SIL-PEDF. No subgrupo SIL-PEDF houve um acúmulo de RNAm irrisório, dado que corrobora com todos os resultados da mecânica respiratória, pois com o difícil acesso do vírus a células pulmonares e um aumento no processo inflamatório impedem que o gene seja entregue com eficiência e, posteriormente, seja expresso.

Na análise do modelo 2, foi realizada a instilação do vetor um dia antes da instilação da sílica, partícula desencadeadora da silicose. Foi analisado se o vetor, sendo instilado um dia antes do início da doença, teria um maior êxito na transdução viral. A mecânica respiratória e o sacrifício foram realizados 30 dias após a instilação do vetor pelo mesmo motivo citado no modelo anterior. A análise histológica do modelo ainda não pôde ser realizada por um problema técnico.

Assim como no primeiro modelo, o modelo 2 apresentou alta taxa de mortalidade após 24 e 48h da instilação de sílica. Como o vetor foi instilado um dia antes da instilação de sílica, o gene do PEDF não conseguiu ser expresso, significativamente, nesse curto espaço de tempo, fazendo com que ele não consiga realizar seu papel terapêutico. Com isso, os efeitos citados no modelo anterior não são anulados, o que leva a óbitos desses animais.

Na análise da elastância pulmonar (Est,L), do segundo modelo, não foi observada diferença entre os grupos experimentais. Fato que sugere que a sílica não tenha funcionado e causado o processo inflamatório no pulmão, com isso, dados serão repetidos para verificar se houve algum erro na coleta. Além disso, os valores de  $\Delta P1$  e  $\Delta P_{tot}$  se tornaram maiores no subgrupo SIL-PEDF do que no subgrupo SIL-SAL, com todos os valores de  $\Delta P2$  sem apresentar diferença significativa entre nenhum grupo, fato que pode ter ocorrido pelo animal não ter desenvolvido a doença da forma esperada, como sugerido pelo resultado da Est,L, dessa forma, não surgindo as diferenças na função pulmonar que eram esperadas com o desenvolvimento da doença, resultando em valores muito parecidos entre animais silicóticos e animais controle, apresentando uma variação pouco evidente apenas no valor de  $\Delta P1$ .

Ainda no segundo modelo, foi observada diferença quanto a quantidade relativa de RNAm entre o subgrupo C-PEDF e o subgrupo SIL-PEDF, havendo um aumento no acúmulo de RNAm do subgrupo SIL-PEDF quando em comparação com o mesmo subgrupo do modelo 1. Concomitantemente, o valor do subgrupo C-PEDF do modelo 2 se manteve semelhante ao do modelo 1, sugerindo um aumento da eficiência da transdução viral e posterior expressão do gene. Tal fato pode ser explicado pela instilação do vetor ter acontecido um dia antes da sílica, ou seja, ter acontecido antes do desenvolvimento de qualquer reação inflamatória decorrente da sílica, o que possibilita a presença de todas as células viáveis e baixa imunogenicidade do vetor.

No terceiro modelo foi avaliado o quão eficaz seria o pré-tratamento para a sílica, pois com o vetor sendo instilado 28 dias antes, temos o pico de expressão logo no dia da indução de silicose, fazendo com que a silicose seja induzida no período em que o tratamento pode ser mais eficaz pela concentração de proteína produzida. Após 15 dias, período necessário para o desenvolvimento da silicose, a mecânica respiratória e o posterior sacrifício foram realizados.

No terceiro modelo, apesar da alta taxa de mortalidade, foi observado que os animais SIL-PEDF morreram, somente, 24h após os animais SIL-SAL, o que pode evidenciar um papel protetor da proteína PEDF. Como o vetor foi instilado 28 dias antes, seu pico de expressão foi alcançado antes que houvesse a instilação, fazendo com que já houvesse expressão da proteína e ela pudesse exercer um papel protetor.

Foi observado, assim como no primeiro modelo, que a instilação de sílica provocou alterações histológicas no pulmão, como a presença de granulomas. O subgrupo tratado, SIL-PEDF, apresentou uma diminuição de sua área de granuloma quando em comparação com o subgrupo doente SIL-SAL, dado que, como não apresenta um número experimental satisfatório, o modelo não apresenta dados estatísticos, o que apenas indica uma tendência de

que o tratamento reduza a geração de granulomas, corroborando com resultados de outros trabalhos que demonstram o potencial terapêutico da terapia gênica e potencial da proteína PEDF para tratar doenças inflamatórias e fibrogênicas (ZHA et al, 2016).

Resultados preliminares sugeriram um aumento na elastância pulmonar (Est,L) do grupo SIL-SAL em comparação com os grupos controle. Em razão do baixo número experimental, não pôde ser determinada diferença significativa, na Est,L, entre os grupos. Ainda na mecânica respiratória desse modelo, foi observada uma redução dos valores de  $\Delta P1$  e  $\Delta P_{tot}$  no subgrupo SIL-PEDF em comparação com o subgrupo SIL-SAL, sendo que, no valor de  $\Delta P1$ , o subgrupo SIL-PEDF igualou aos valores dos grupos controles, porém, como no modelo 1, o mesmo não aconteceu nos valores de  $\Delta P2$ , havendo, na verdade, um aumento no mesmo.

No modelo 3 o acúmulo de RNAm foi menor tanto no grupo C-PEDF quanto no grupo SIL-PEDF quando em comparação com os outros modelos. Porém obteve a melhor proporcionalidade de expressão entre o subgrupo SIL-PEDF e C-PEDF, sugerindo uma melhor eficiência na entrega do gene. A maior eficiência pode ser explicada pela instilação do vetor ter sido realizada 28 dias antes da instilação de sílica, ou seja, houve tempo de o vetor alcançar o pico de expressão antes que a doença viesse a ser causada, resultando em uma maior expressão do gene, e um possível efeito terapêutico mais eficiente. Porém também foi observado uma diminuição em ambos os valores (C-PEDF e SIL-PEDF) quando comparados aos demais modelos, o que, talvez, possa ser explicado por uma possível queda na expressão gênica do PEDF, já que, este, é o modelo onde o vetor é instilado com um maior tempo precedendo a análise. O fato pode ser explicado, também, através do desencadeamento de morte de algumas células, que estariam expressando o gene do PEDF, pelo processo inflamatório da silicose.

Com tais resultados conseguimos as análises do modelo 1 foram fechadas, porém o modelo 2 ainda terá dados repetidos e análises terminadas, para que possa finalizar todos os dados e ter uma análise mais fidedigna. O terceiro modelo, com resultados preliminares, demonstrou necessidade de mais ensaios e aumento do número experimental.

Este trabalho apresenta algumas limitações. A primeira é sobre o desenho experimental, que limita a terapia gênica a uma dose, não sendo possível analisar o efeito de uma readministração do vetor, o que possibilitaria avaliar a resposta imunológica à uma readministração e o efeito sobre o acúmulo de RNAm, conseqüentemente, sobre ação do gene PEDF. Além disso, não foi possível ser avaliado a necessidade de um tratamento heterólogo, ou seja, a necessidade da utilização de outro subtipo mutado de AAV para o

carreamento do gene PEDF em uma segunda dose, fato que poderia ser necessário através do surgimento de uma resposta imunológica mais forte ao AAV8-PEDF na sua readministração. Além disso, o baixo número de animais, causado pela alta taxa de mortalidade, resultou na impossibilidade de geração de dados estatisticamente significativos. Com isso, os resultados se tornam inconclusivos, o que os tornam apenas sugestivos. A partir disso a repetição dos modelos 2 e 3, modelos com menores números experimentais, se torne necessária para determinar o efeito da terapia gênica com PEDF em modelo murino de silicose.



## **7- CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou as repercussões da transferência do gene PEDF humano, através do vetor viral Y733F-AAV8, sobre a função pulmonar e a histologia pulmonar em modelo murino de silicose. A administração do M-AAV8-PEDF foi eficiente na entrega do gene para as células do pulmão em grupos não silicóticos. Porém, foi observada baixa transdução do vetor viral para o tecido pulmonar dos animais silicóticos. Supõe-se, que o processo inflamatório decorrente da silicose, causou dano tecidual, o que dificultou a transdução viral, impedindo a entrega do gene PEDF nas células pulmonares, resultando em baixa expressão no tecido pulmonar, conseqüentemente, impedindo a proteína de exercer um possível papel na melhora da função pulmonar. Além disso, no modelo 2 e 3 os resultados não foram conclusivos, nos indicando apenas tendências nos resultados, fato ocorrido pelo baixo número experimental dos modelos. Por essa razão, repetições dos modelos serão necessárias para elucidar melhor o efeito da terapia gênica com o PEDF em modelo murino de silicose.

## **8 – PERSPECTIVAS FUTURAS**

Como perspectivas futuras do estudo, pretende-se finalizar a análise do modelo 2, fazendo a contagem de fração da área de granuloma e revisar os dados da mecânica respiratória do modelo 2. Também pretende-se repetir o modelo 3 para aumento do número de amostras e reavaliação do RT-PCR. Além disso, pretende-se realizar um modelo de tratamento de silicose com proteína pura com injeção na jugular.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. *et al.* Gene therapy with plasmids encoding IFN- $\beta$  or IFN- $\alpha$ 14 confers long-term resistance to HIV-1 in humanized mice. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48): p.78412-78420.
- ABU-SHAMS, K; FANLO, P; LORENTE, M.P. Silicosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2005; 28 (Supl. 1): 83-89.
- AIRES, Margarida de Mello. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- AITKEN, M.L., MOSS, R.B., WALTZ, D.A., DOVEY, M.E., TONELLI, M.R., MCNAMARA, S.C., *et al.* A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Hum Gene Ther*, 12: 1907-1916, 2001.
- AKACHE, B.; *et al.* The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. *J Virol*,80(19):9831-9836, 2006.
- ALBERTS B.; *et al.* trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga; *et al.* *The Cell* – 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004.
- AL-JAMAL, R; WALLACE, W.A; HARRINSON D.J. Gene therapy for chronic obstructive pulmonary disease: twilight or triumph?. *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Mar;5(3):333-46.
- AMER, M.H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther.* 2014 Sep 10;2:27.
- ASOKAN, A.; *et al.* Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol*,80(18):8961-8969, 2006.
- AURICCHIO, A.; *et al.* Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest.* 110(4):499-504, 2002.
- BALAKRISHNAN, B AND JAYANDHARAN, G.R. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Current Gene Therapy*; 2014; p.1-15.
- BANKS, D. E.; CHENG, Y. H.; WEBER, S. I.; MA, J. K. Strategies for the treatment of pneumoconiosis. *Occupational Medicine, Philadelphia*, v. 8, n. 1, p. 205-232, 1993
- BARBOZA, C.E.G; WINTER D.H, SEISCENTO, M ; SANTOS, U.P; FILHO, M.T. Tuberculose e silicose: epidemiologia, diagnóstico e quimioprofilaxia. *J Bras Pneumol.* 2008;34(11):959-966.
- BARTLETT, J.S.; WILCHER, R.; SAMULSKI, R.J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol*,74(6):2777-2785, 2000.
- BATES, J.H., ABE, T., ROMERO, P.V., SATO, J. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. *J Appl Physiol*, 1989; 67(1):488-492.
- BATES, J.H., DECRAMER, M., CHARTRAND, D., ZIN, W.A., BODDENER, A., MILIC-EMILI, J. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. *J Appl Physiol*, 1985a; 59(3):732-737.
- BATES, J.H., LUDWIG, M.S., SLY, P.D., BROWN, K., MARTIN, J.G., FREDBERG, J.J. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. *J Appl Physiol*, 1988; 65(1):408-414.
- BATES, J.H., ROSSI, A., MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol*, 1985b; 58(6):1840-1848.
- BECERRA, P.S. AND NOTARIO, V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*; 13(4): 258–271; 2013.
- BENNETT, J. *et al.* AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med.* 2012 Feb 8;4(120):120ra15.
- BORGES, V.M. *et al.* Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med.* 2001 Jul 16;194(2):155-64.
- CAO, W. *et al.* Chlamydial plasmid-encoded protein pORF5 induces production of IL-1 $\beta$  and IL-18 via NALP3 inflammasome activation and p38 MAPK pathway. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(11): 20368–20379.

- CASTRANOVA, V.; KANG, J. H.; MOORE, M. D.; PAILES, W. H.; FRAZER, D. G.; SCHEWEGIER-BERRY, D. Inhibition of stimulant-induced activation of phagocytic cells with tetrandrine. *Journal of Leukocyte Biology*, new York, v. 50, n. 4, p. 412-422, 1991
- CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environmental Health Perspectives*, v. 108, n. August 1999, p. 675-684, 2000.
- CHANG, H.K., MORTOLA, J.P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. *J Appl Physiol*, 1981; 51(1):218-225.
- CHOI, V.W.; MCCARTY, D.M.; SAMULSKI, R.J. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*. 5(3):299-310, 2005.
- COHEN, R.A.; PATEL, A.; GREEN, F.H. Lung Disease Caused by Exposure to Coal Mine and Silica Dust. *Semin Respir Crit Care Med*; 2008 Dec;29(6): p.651-61.
- CRAIGHEAD, J. E.; AKIEY, n. J.; GOUID, I. B.; IIBBuS, B. I. characteristics of tumors and tumor cells cultures from experimental asbestos-induced mesotheliomas in rats. *The American Journal of Pathology*, Philadelphia, v. 129, n. 3, p. 448-462, 1987.
- DA-SILVA, A.L; *et al.* DNA nanoparticle-mediated thymulin gene therapy prevents airway remodeling in experimental allergic asthma. *J Control Release*. 2014 Apr 28;180:125-33.
- DAVIS, G. S. The Pathogenesis of Silicosis: State of the Art. *CHEST*. 89: 3 marches, 1986.
- DAYA, S.; BERNS, K.I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *ClinMicrobiol*. 21(4):583-93, 2008.
- DENG, W.T. *et al.* Tyrosine-Mutant AAV8 Delivery of Human MERTK Provides Long-Term Retinal Preservation in RCS Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; April 2012; p. 1804-1904.
- DING, W.; *et al.* Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther*. 12(11):873-80, 2005.
- DOUAR, A.M.; *et al.* Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol*. 75(4):1824-33, 2001.
- DUAN, D.; *et al.* Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest*. 105(11):1573-87, 2000.
- DUAN, D.; *et al.* Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol*; 72(11):8568-8577, 1998.
- DURAIRAJ, G; KAISER, P. The 26S Proteasome and Initiation of Gene Transcription; *biomolecules*; september 2014; p.827-847
- FAFFE, D.S. *et al.* Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. *Journal of Applied Physiology* Published, 1 April 2001, Vol. 90 no. 4, 1400-1406.
- FERREIRA, D.P.; *et al.* Impacto da transdução do hPEDF via vetor viral adenoassociado sorotipo 8 no pulmão de camundo. Tese (mestrado em biofísica). Centro de Ciência e Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 85 F. 2016.
- FLORES, C. Exposição ocupacional à sílica: como reconhecer e controlar?. *Saber SST*, 2016. Disponível em: <http://www.saudeesegurancaotrabalho.org/silica-cristalina-amorfa-silicose/>. Acesso em: dez. 2017.
- FLOTTE, T.R., LAUBE, B.L. Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest*,120(3 Suppl):124S-131S, 2001.
- FLOTTE, T.R., ZEITLIN, P.L., REYNOLDS, T.C., HEALD, A.E., PEDERSEN, P., BECK, S., *et al.* Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2) -CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Hum Gene Ther*, 14: 1079-1088, 2003.
- FRIEBE, A. *et al.* Immunomodulatory effects of inactivated parapoxvirus ovis (ORF virus) on human peripheral immune cells: induction of cytokine secretion in monocytes and Th1-like cells. *J Virol*. 2004 Sep;78(17):9400-11.
- GAO, G.; VANDENBERGHE L.H.; WILSON, J.M. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5:285-297, 2005.

- GAO, G.P., ALVIRA, M.R., WANG, L., CALCEDO, R., JOHNSTON, J., WILSON, J.M. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18):11854-9, 2002a.
- GARDLIK, R.; *et al.* Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med SciMonit.* 11(4): RA110-21, 2005.
- GONÇALVES, M.A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2:43, 2005.
- GOODMAN G. B.; KAPIAN, P. D.; DTACHURA, I.; CASTRANOVA, V.; PAIIES, W. H.; IAPP, n. 1. Acute silicosis responding to corticosteroid therapy. *Chest*, Chicago, v. 101, n. 2, p. 366-370, 1992.
- GORITZKA, M. *et al.* Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J Exp Med.* 2015 May 4;212(5):699-714.
- GOSH, A. AND DUAN, D. Expanding Adeno-associated Viral Vector Capacity: A Tale of Two Vectors. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews - Vol. 24; 2007; P.165-178.*
- GREENBERG, M. I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: a review. *Disease-a-Month*, Chicago, v. 53, n. 8, p. 394-416, 2007.
- GRIESENBACH, U.; GEDDES, D.M.; ALTON, E.W. Gene therapy for cystic fibrosis: an example for lung gene therapy. *Gene Ther.* 11 Suppl 1: S43-50, 2004.
- GUNDERSEN, H.J., BENDTSEN, T.F., KORBO, L., MARCUSSEN, N., MOLLER, A., NIELSEN, K., NYENGAARD, J.R., PAKKENBERG, B., SORENSEN, F.B., VESTERBY, A., ET AL. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 1988; 96(5):379-394.
- GUNDERSEN, H.J.; *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*; 96(5):379-394, 1988.
- HANSEN, J.; *et al.* Impaired intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2 vectors limits efficient transduction of murine fibroblasts. *Jvirol.* 74(2):992-6, 2000.
- HANSEN, J.; QING, K.; SRIVASTAVA, A. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *Jvirol.* 75(9):4080-90, 2001.
- HASTIE, E. AND SAMULSKI, R.J. Recombinant adeno-associated virus vectors in the treatment of rare diseases. *Expert Opin Orphan Drugs.* 2015; 3(6): p.675-689.
- HILT, W.; WOLF, D. *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis.* Landes Biosciences / Eureka.com. U.S.A, 2000.
- HNIZDO, E.; MURRAY, J. Risk of pulmonary tuberculosis relative to silicosis and exposure to silica dust in South African gold miners. *Occupational and Environmental Medicine*, London, v. 55, n. 7, p. 496-502, 1998.
- HNIZDO, E.; SIUIS-CREMER, G. K.; ABRAMOWITZ, J. A. Emphysema type in relation to silica dust exposure in South African gold miners. *The American Review of Respiratory Disease*, Baltimore, v. 143, n. 6, p. 1241-1247, 1991
- HNIZDO, E.; VAIYATHAN, V. chronic obstructive pulmonary disease due to occupational exposure to silica dust: a review of epidemiological and pathological evidence. *Occupational and Environmental Medicine*, London, v. 60, n. 4, p. 237-243, 2003.
- HUSAIN, S.R. *et al.* Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer Gene Therapy*; 2015; 22, p.554-563.
- HYUN-JOO, NAM. Structure of Adeno-Associated Virus Serotype 8, a Gene Therapy Vector. *JOURNAL OF VIROLOGY*, p. 12260-12271 Vol. 81, No. 22, 2007.
- Introdução à genética / GRIFFITHS, J. F. A.; *et al.* Trad. Paulo A. Motta. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- JACOB, S. F.; WANG, L. Adeno-associated viral vectors for correction of inborn errors of metabolism: progressing towards clinical application. *Curr Pharm Des*
- JOHNSON, J.S; *et al.* Mutagenesis of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Protein VP1 Uncovers New Roles for Basic Amino Acids in Trafficking and Cell-Specific Transduction. *JOURNAL OF VIROLOGY*; Sept. 2010; p. 8888-8902.

- JOSHI, G.N; KNECHT D.A. Silica phagocytosis causes apoptosis and necrosis by different temporal and molecular pathways in alveolar macrophages. *Apoptosis*. 2013 Mar;18(3):271-85.
- JULKUNEN I. *et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. Cytokine Growth Factor Rev. 2001 Jun-Sep;12(2-3):171-80.*
- KASHIWAKURA, Y.; *et al.* Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol*,609-614, 2005.
- KENNEDY, M. C. Aluminium powder inhalations in the treatment of silicosis pottery workers and pneumoconiosis of coal-miners. *British Journal of Industrial Medicine*, london, v. 13, n. 2, p. 85-101, 1956.
- KOBZIK, I. lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 155, n. 1, p. 367-376, 1995.
- KOCHI, T., OKUBO, S., ZIN, W.A., MILIC-EMILI, J. Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. *J Appl Physiol*, 1988a; 64(6):2636-2646.
- KOCHI, T., OKUBO, S., ZIN, W.A., MILIC-EMILI, J. Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. *J Appl Physiol*, 1988b; 64(1):441- 450.
- LANEY, A.S. AND WEISSMAN, D.N. Respiratory Diseases Caused by Coal Mine Dust. *J Occup Environ Med*; 2014 ;56 Suppl 10: S18-22.
- LASSANCE, R.M.; *et al.* Does the use of recombinant AAV2 in pulmonary gene therapy damage lung function? *Respir Physiol Neurobiol*,160(1):91-98, 2008.
- LEE, E. *et al. Overexpression of apolipoprotein A1 in the lung abrogates fibrosis in experimental silicosis. PLoS One.* 2013;8(2):e55827.
- LEUNG, C.C.; YU, I.T.S; CHEN, W. Silicosis. *Lancet*; 2012 May ;379(9830): p.2008-2018.
- LIMBERIS, M.P., WILSON, J.M. Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(35):12993-8, 2006.
- LIMBERIS, M.P.; *et al.* Transduction efficiencies of novel AAV vectors in mouse airway epithelium in vivo and human ciliated airway epithelium in vitro. *Mol Ther*.17(2):294-301, 2009.
- LIQUN, W. R; *et al.* Recombinant AAV serotype and capsid mutant comparison for pulmonary gene transfer of alpha-1-antitrypsin using invasive and noninvasive delivery. *Mol Ther*.17(1):81-7, 2009.
- LOW, K; AEBISCHER, P; SCHNEIDER, B.L. Direct and retrograde transduction of nigral neurons with AAV6, 8, and 9 and intraneuronal persistence of viral particles. *Hum Gene Ther.* 2013 Jun;24(6):613-29.
- LU, Y. Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review. *Stem Cells*.13(1):133-45, 2004.
- MAH, C.; *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J Virol.* 72(12):9835-43, 1998.
- MANNINO, R.J.; GOULD - FOGERITE, S. Liposome mediated gene transfer. *Biotechniques.* 6(7):682-90, 1988.
- MARTINI, S.V. *et al.* Does the use of recombinant AAV5 in pulmonary gene therapy lead to lung damage? *Respir Physiol Neurobiol.* 168(3):203-9, 2009.
- MARTINI, S.V. *et al.* Tyrosine Mutation in AAV9 Capsid Improves Gene Transfer to the Mouse Lung. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:544-553.
- MARTINI, S.V.; *et al.* Single Tyrosine Mutation in AAV8 Vector Capsid Enhances Gene Lung Delivery and Does Not Alter Lung Morphofunction in Mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, pp. 681-690, 2014
- MENCK, C.M.; VENTURA, A.M. "Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica". *REVISTA USP*, São Paulo, n.75, p. 50-61, setembro/novembro, 2007.
- MENDONZA, C; BARREIRO, P. BENITEZ, L; SORIANO, V. Gene therapy for HIV infection. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Mar;15(3):319-27.
- MENDOZA, C. *et al.* Gene therapy for HIV infection. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Mar;15(3):319-27.

- MICHELIN, M.A. *et al.* Helper T lymphocyte response in the peripheral blood of patients with intraepithelial neoplasia submitted to immunotherapy with pegylated interferon- $\alpha$ . *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 10;16(3):5497-509.
- MINGOZZI, F; HIGH, K.A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood.* 2013 Jul 4;122(1):23-36.
- MISRA, S. Human Gene Therapy: A Brief Overview of the Genetic Revolution. *J Assoc Physicians India.* 2013 Feb;61(2): p.127-33.
- MORALES, M.M. Terapias avançadas: célula tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo, Atheneu, p. 105-119, 2007.
- MORTOLA, J.P., NOWORAJ, A. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. *J Appl Physiol*, 1983; 55(1 Pt 1):250- 253.
- MOSS, J.A. Gene therapy review. *Radiol Technol*; 2014; p. 155-184.
- MOSSMAN, B. T.; CHURG, A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, New York, v. 157, n. 5 Pt 1, p. 1666-1680, 1998.
- MOSSMAN, B.T. AND GLENN, R.E. Bioreactivity of the crystalline silica polymorphs, quartz and cristobalite, and implications for occupational exposure limits (OELs). *Crit Rev Toxicol*; 2013 Sep;43(8): p.632-60.
- NAM, H.J.; *et al.* Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector. *J Virol*81(22):12260-71, 2007.
- NARDI, N. B. ; TEIXEIRA, L. A. ; SILVA, E. A. Terapia gênica: Ciência Saúde Coletiva. 7:109-16, 2002.
- NATHWANI, A.C. *et al.* Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med*; 2014 November 20; 371(21):1994–2004.
- NATHWANI, A.C.; *et al.* Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365:2357-2365, 2011.
- NGOSA, K. AND NAIDOO, R.N. The risk of pulmonary tuberculosis in underground copper miners in Zambia exposed to respirable silica: a cross-sectional study. *BMC Public Health*; 2016; p.1-7
- NONNENMACHER, M AND WEBER, T. Adeno-Associated Virus 2 Infection Requires Endocytosis through the CLIC/GEEC Pathway. *Cell Host Microbe*; 2011 December; P.563–576.
- OLIVEIRA, M. “A revolução da terapia genética”. *Revista Isto É*, São Paulo, p. 68, 30 de janeiro, 2013.
- OPIE, S.R.; *et al.* Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *J Virol.*;77(12):6995-7006, 2003.
- PACHECO, M.L. Silicosis: Mechanisms Of Action Of Silica Particle In Lung Tissue, *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 4, n. único, p. 36-43, 2012
- PACHECO, M.L.; BANDEIRA, E; MORALES, M.M. Cell-Based Therapy for Silicosis. *Stem Cells International*, 2016 Feb; 9 pages.
- PASULA, R. *et al.* Airway Delivery of Silica Increases Susceptibility to Mycobacterial Infection in Mice: Potential Role of Repopulating Macrophages. *J Immunol.* 2009 June 1; 182(11): p.7102–7109.
- PETERS, J.; CEJKA, Z.; HARRIS, J. Structural features of the 26S Proteasome Complex. *J Mol Biol* 234, 932, 1993.
- PETERS, J.M.; HARRIS, J.R.; FINLEY, D. Ubiquitin and the biology of the cell. Plenum Press, New York and London, pp. 1-472, 1998.
- PETERS-SIVA, H; *et al.* Novel Properties of Tyrosine-mutant AAV2 Vector in the Mouse Retina. *Molecular Therapy* (vol. 19 no. 2), feb. 2011, p.293–301.
- PETRS-SILVA, H.; *et al.* High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine- mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther.*17(3):463-71, 2009.
- PETRS-SILVA, H.; *et al.* Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther.*19(2):293-301, 2011.
- PFEIFER, C.; *et al.* Adeno-associated virus serotype 9-mediated pulmonary transgene expression: effect of mouse strain, animal gender and lung inflammation. *Gene Ther.*18(11):1034-42, 2011.

- QING, K.; *et al.* Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94(20):10879-84, 1997.
- QING, K.; *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol.*
- QING, K.; *et al.* Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med*,71-77, 1999.
- RABINOWITZ, J.E.; *et al.* Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol.* 76(2):791-801, 2002.
- RAMOS, P. A via proteolítica dependente de ubiquitina\ proteassoma. *Química, artigo*, 57-63, 1995.
- RAVI, L.I. *et al.* A systems-based approach to analyse the host response in murine lung macrophages challenged with respiratory syncytial virus. *BMC Genomics.* 2013 Mar 18;14:190.
- REY-RICO, A. AND CUCCHIARINI, M. Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomater*; 2016 Jan; p.1-10
- RUSSELL, D.W.; KAY, M.A. Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood.* 94(3):864-74, 1999.
- RYALS, R.C; *et al.* Quantifying transduction efficiencies of unmodified and tyrosine capsid mutant AAV vectors in vitro using two ocular cell lines. *Molecular vision*; april 2011; p.1090-1102
- SANTIAGO-ORTIZ, J.L. AND SCHAFFER, D.V. Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy. *J Control Release*; 2016 Oct; P.240:287
- SCADUTO, A.A.; WANG, J.C. Gene therapy applications for lumbar fusion surgery. *Operative Techniques in Orthopaedics*.10: 325-331, 2000.
- SCHULTZ, B.R.; CHAMBERLAIN, J. S. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol Ther.* 16(7):1189-99, 2008.
- SEEGER, M.; FERRELL, K.; DUBIEL, W. The 26S Proteasome: A Dynamic Structure. *Mol Biol Rep* 24, 83, 1997.
- SEILER, M.P.; *et al.* Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. *Hum Gene Ther.*17(1):10-9, 2006.
- SEN, D. *et al.* Targeted Modifications in Adeno-Associated Virus Serotype 8 Capsid Improves Its Hepatic Gene Transfer Efficiency In Vivo. *HUMAN GENE THERAPY METHODS* 24: April 2013; P.104–116.
- SHARMA, A. *et al.* Gene therapy for haemophilia (Review). *Cochrane Database Syst Ver*; 2016; p1-18.
- SHARMA, S. K.; PANDE, J. n.; VERMA, K. Effect of prednisolone treatment in chronic silicosis. *The American Review of Respiratory Disease*, Baltimore, v. 143, n. 4 Pt 1, p. 814-821, 1991.
- SHIN, E.S.; SORENSON, C.M, SHEIBANI, N, PEDF expression regulates the proangiogenic and proinflammatory phenotype of the lung endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2014; 306: L620–L634.
- SILVA, A.L.; *et al.* Nanoparticle-based therapy for respiratory diseases. *An Acad. Bras Cienc.* 85(1):137-146, 2013.
- SIRNINGER, J.; *et al.* Functional characterization of a recombinant adeno-associated virus 5-pseudotyped cystic fibrosis transmembrane conductance regulator vector. *Hum Gene Ther*; 15(9):832-841, 2004.
- SKUBIS-ZAGADLO, J; STACHURSKA, A.; MALECKI, M. VECTOROLOGY OF ADENO-ASSOCIATED VIRUSES (AAV). *DEV. PERIOD MED*; 2013; p.202-206.
- SKUBIS-ZEGADLO, J; STACHURSKA, A; MALECKI, M. Vectrology of adeno-associated viruses (AAV). *Med Wieku Rozwoj.* 2013 Jul-Sep;17(3):202-6.
- SOKRATOUS, K; *et al.* The role of ubiquitin-binding domains in human pathophysiology. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2014; 51(5): p.280–290.
- STEENLAND, K. AND WARD, E. Silica: A Lung Carcinogen. *CA CANCER J CLIN* 2014; 64:63–69.
- SUMMERFORD, C.; BARTLETT, J.S.; SAMULSKI, R.J. Alphavbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med.*5(1):78-82, 1999.



- SUMMERFORD, C.; SAMULSKI, R. J. Membrane – associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 72(2):1438-45, 1998.
- SUMNER-JONES, S.G.; *et al.* Long-term persistence of gene expression from adeno-associated virus serotype 5 in the mouse airways. *Gene Ther.*13(24):1703-13, 2006.
- TANAKA, K.; TSURUMI, C. The 26S Proteasome: Subunits and Functions. *Mol Biol Rep* 24, 3, 1997.
- TEAGLE, A.R.; BIRCHALL, J.C.; HARGEST, R. Gene Therapy for Pyoderma Gangrenosum: Optimal Transfection Conditions and Effect of Drugs on Gene Delivery in the HaCaT Cell Line Using Cationic Liposomes. *Skin Pharmacol Physiol.* 2016;29(3):119-29.
- TERRA FIIHO, M.; SANTOS, P. Silicosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 32, Suppl 2, p. S41-S47, 2006.*
- THRASHER, A.J; WILLIAMS, D.A. Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency. *Molecular Therapy*, May 2017, Pages 1132-1141.
- TRASHER, A.J. AND WILLIAMS, D.A. ASGCT 20th Anniversary Special Issue of Molecular Therapy: Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency. *Mol Ther.* 2017 May 3;25(5): p.1132-1141.
- TSENG, Y.S AND AGBANDJE-MCKENNA, M. Mapping the AAV capsid host antibody response toward the development of second generation gene delivery vectors. *Frontiers of immunology*; january 2014; p. 1-11.
- TSUCHIYA, K.; TOYOSHIMA, M.; KAMIYA, Y.; NAKAMURA Y.; BABA, S.; SUDA, T. Non-smoking Chronic Obstructive Pulmonary Disease Attributed to Occupational Exposure to Silica Dust. *Intern Med.* 2017;56(13):1701-1704.
- UEDA, S.; *et al.* Administration of Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibits Left Ventricular Remodeling and Improves Cardiac Function in Rats with Acute Myocardial Infarction. *The American Journal of Pathology, Vol. 178: 591-598; 2011.*
- VANGOZZI, A. *et al.* Evaluation of the transcriptional status of host cytokines and viral genes in the trachea of vaccinated and non-vaccinated chickens after challenge with the infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.* 2016;45(1):106-13.
- WAGNER, T.A. Combining Cell and Gene Therapy to Eradicate HIV. *AIDS Patient Care STDS.* 2016 Dec;30(12): p.534-538.
- WERNER, J.M. *et al.* Ribavirin improves the IFN- $\gamma$  response of natural killer cells to IFN-based therapy of hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2014 Oct;60(4):1160-9.
- WIRTH, T. AND YLA-HERTTUALA, S. History of gene therapy. *Gene.* 2013 Aug 10;525(2): p.162-169.
- WOLF, D.H.; HILT, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta.* 1695(1-3):19-31, 2004.
- WU, Z.; ASOKAN, A.; SAMULSKI, R.J. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther.*14(3):316-27, 2006.
- XIA, E. *et al.* Lung gene therapy—How to capture illumination from the light already present in the tunnel. *Genes Dis*; 2014 September; 1(1): 40–52.
- XIAO, P.J; SAMULSKI, R.J. Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. *J Virol.* 2012 Oct;86(19):10462-73.
- YAMAGISHI, S. *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Aug;37(2):497-506.
- YAN, Z. *et al.* Distinct Classes of Proteasome-Modulating Agents Cooperatively Augment Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 and Type 5-Mediated Transduction from the Apical Surfaces of Human Airway Epithelia; *JOURNAL OF VIROLOGY*, Mar. 2004, p. 2863–2874.
- YAN, Z.; *et al.* Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol.* 76(5):2043-53, 2002.
- YOKOI, K. *et al.* Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jul;48(7):3324-8.

- YOUNG, S.M.J.R.; *et al.* Roles of adeno - associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. *JVirol.* 74(9):3953-66, 2000.
- YOUNG, S.M.J.R.; SAMULSKI, R.J. Adeno-associated virus (AAV) site- specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(24):13525-30, 2001.
- ZAISS, A.K.; MURUVE, D.A. Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* 15:808-81, 2008.
- ZHA, W. *et al.* Administration of Pigment Epithelium-Derived Factor Inhibits Airway Inflammation and Remodeling in Chronic OVA-Induced Mice via VEGF Suppression. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2016 Mar; 8(2): 161–169.
- ZHAO M.-M., Cui J.-Z., Cui Y., *et al.* Therapeutic effect of exogenous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation on silicosis via paracrine mechanisms in rats. *Molecular Medicine Reports.* 2013;8(3):741–746. doi: 10.3892/mmr.2013.1580.
- ZHONG, L.; *et al.* A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. *Mol Ther.*15(7):1323-30, 2007.
- ZHONG, L.; *et al.* Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci USA.*105(22):7827-32, 2008 (b).
- ZHONG, L.; *et al.* Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression. *Virology.* 381(2):194-202, 2008 (a).
- ZHOU, X.; *et al.* Anti-inflammatory effect of pigment epithelium-derived factor in DBA/2J mice. *M. Vision,* 15:438-450; 2009.
- ZINCARELLI, C.; *et al.* Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.*16(6):1073-80, 2008.
- ZOLOTUKHIN, S. *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy,* 1999, 6, 973–985.