



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Expressão heteróloga da glicoproteína do vírus da raiva por meio de vírus recombinantes

Yasmin Marcaccini Guide

Orientador: Prof. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Brasília, fevereiro de 2020

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Expressão heteróloga da glicoproteína do vírus da raiva por meio de vírus recombinantes

Yasmin Marcaccini Guide

Orientador: Prof. Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biologia Molecular.

Brasília, 2020

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Fernando Araripe Gonçalves Torres com apoio financeiro do CNPq.

Banca Examinadora

Professor Tatsuya Nagata
Universidade de Brasília

Professora Larissa Fernandes Matos
Universidade de Brasília

Professora Ildinete Silva Pereira
Universidade de Brasília

*“A flor que desabrocha na adversidade é a
mais rara e mais bela de todas.”*

- Fa Zhou

(MULAN..., 1998)

Dedico essa conquista a todos os professores que já tive e que me tornaram o que sou hoje, a todos que me apoiaram nessa jornada de alguma forma e principalmente aos meus pais, por todo o valor que sempre deram e me transmitiram a respeito da minha educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos na minha vida e pela companhia que sempre me fez ao longo dos obstáculos que encontrei.

Agradeço aos meus avós, tios-avôs e tias-avós que, vivos ou não, marcaram minha vida de maneira tão permanente através dos seus valores, sua perseverança, esforço, honestidade e simplicidade. Sei que, mesmo longe, vocês olham por mim todos os dias.

Agradeço aos meus pais por tudo que sempre fizeram por mim, por todo o esforço, por todos os sacrifícios e coisas que abriram mão em nome de algo melhor para mim e para o meu irmão. Vocês são minha maior inspiração e orgulho e espero ficar ao menos 0,1% mais parecida com vocês com o passar dos anos.

Agradeço a todos os professores que já tive, dos quais me lembro – todos – com muito carinho. Vocês me transformaram no que sou hoje e espero poder ser alguém de quem vocês possam se orgulhar um dia.

Agradeço ao professor Fernando por ter dado uma chance a uma caloura de Biotecnologia e ter me apresentado o mundo da Biologia Molecular e da Engenharia Genética. Acabou se tornando minha área favorita no curso, e tive a chance de aprender muitas coisas novas. Agradeço também a oportunidade que me confiou com esse mestrado e por não ter desistido de mim.

Agradeço às professoras Lídia e Janice por serem verdadeiras mães-científicas para mim, com todo o carinho, cuidado e paciência com que me ensinaram e me acompanharam na bancada, além do apoio e disponibilidade para meus desabafos.

Agradeço aos técnicos da BioMol e da Biofísica, dona Fátima, dona Ivonildes, Thompson, José e seu Chiquinho, por tudo o que me ensinaram, por todos os perrengues de que me livraram e por todas as gentilezas que me fizeram. A vida laboratorial seria impossível sem vocês.

Agradeço aos professores, alunos e demais membros do Laboratório de Biologia Molecular, em especial à professora Talita por tudo o que fez por mim ao longo do meu mestrado; aos professores Andreia e Marcelo pela ajuda com cultura de células de mamífero e *western blotting*; à Manuela do Lab 1 por ter feito muito mais por mim do que eu acho que merecia e esperava; a Rosana, Gabi e Lulu do Lab 5 pela companhia na sala de cultura e por todos os galhos que já quebraram para mim; ao professor Hugo pela companhia nos feriados e finais de semana e por toda ajuda e sugestões gastronômicas ou laboratoriais.

Principalmente, agradeço aos membros atuais do Lab 2 e aos que já não se encontram mais, como os doutores Luiza, Myrna, Maritza, Viviane, Tiago, Daniel, Túlio e Marciano; os doutorandos Chris, Vanessa, CataLinda, Roberta, Ana Laura, Igor, Jake, Francisco e Pedro; as mestras Carol e Dani; a mestranda mais amada do lab: Cecília; e aos alunos de graduação Marina (minha parceira no crime), Jujuba, Sam, Barbie, Jojo e Pedro. Agradeço por tudo o que aprendi com cada um de vocês, pela paciência que tiveram comigo, por terem salvado minha vida inúmeras vezes nos perrengues laboratoriais, pelo apoio e companhia que me fizeram.

Agradeço aos membros da banca pela paciência e disponibilidade em corrigir o meu trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho e essa etapa na minha vida. Mesmo não citados, não foram esquecidos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO	20
A doença	20
O vírus.....	24
Vacinas.....	27
JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	32
OBJETIVOS E METAS	33
ESTRATÉGIAS	35
Estratégia 1: Adenovírus	35
Construção dos cassetes ERA-Adv- <i>spc</i> A e R.....	35
Construção de adenovírus recombinantes	37
Expressão e identificação da proteína de interesse	40
Estratégia 2: Lentivírus	40
Construção de lentivírus recombinante	40
Expressão e identificação da proteína de interesse	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
Estratégia 1: adenovírus	44
Construção dos cassetes ERA-Adv- <i>spc</i> A e R.....	44
Construção de adenovírus recombinante.....	46
Estratégia B: lentivírus	53
Construção do cassete pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA.....	53
Construção do cassete pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD	56
Produção de lentivírus recombinantes.....	59
Expressão e identificação da proteína recombinante	62
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	66
MATERIAIS E MÉTODOS	68
1. Materiais	68
2. Métodos	85

2.1.	Cultivo de microrganismos	85
2.2.	Preparo de células bacterianas competentes por choque térmico	85
2.3.	Transformação bacteriana por choque térmico	86
2.4.	Preparação de DNA plasmidial em baixa escala (Miniprep)	86
2.5.	Digestão	87
2.6.	Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose	87
2.7.	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	88
2.8.	Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose	88
2.9.	Clonagem independente de ligação (Tecnologia In-Fusion)	89
2.10.	Preparo de células bacterianas competentes por eletroporação	89
2.11.	Transformação bacteriana por eletroporação	89
2.12.	Recombinação homóloga mediada por recombinases virais (<i>Recombineering</i>).....	90
2.13.	Extração de DNA total de bactéria.....	90
2.14.	Clonagem por extremidades coesivas do tipo TA.....	91
2.15.	Precipitação de DNA.....	91
2.16.	Preparação de DNA plasmidial em média escala (Midiprep)	92
2.17.	Descongelamento de células de mamífero	92
2.18.	Manutenção e propagação de células de mamífero.....	92
2.19.	Contagem de células de mamífero	93
2.20.	Curva de morte de blasticidina.....	93
2.21.	Teste de toxicidade a Polybrene.....	93
2.22.	Transfecção de células de mamífero, coleta de vírus e determinação da titulação viral	94
2.23.	Ensaio de eficiência de transfecção por β -galactosidase.....	94
2.24.	Transdução e desenvolvimento de linhagens estáveis e congelamento de células de mamífero	94
2.25.	Precipitação de proteínas por TCA	95
2.26.	Preparação de extrato intracelular de células de mamífero.....	95
2.27.	Quantificação de proteínas totais	95
2.28.	Deglicosilação de proteínas.....	96
2.29.	Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 96	
2.30.	Coloração de gel de poliacrilamida por azul de Comassie.....	97

2.31. <i>Western blotting</i>	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da partícula viral e disposição dos genes no genoma do vírus da raiva.	26
Figura 2. Sequência do cassete ERA.	35
Figura 3. Sequência do gene de resistência a espectinomicina (spc) presente no plasmídeo pSPEC-phi.	36
Figura 4. Representação esquemática da montagem dos cassetes a serem introduzidos no vetor adenoviral.	37
Figura 5. Disposição das regiões de homologia dos cassetes ERA-Adv-spc-A e ERA-Adv-spc-R em relação ao vetor adenoviral.	37
Figura 6. Mapa do vetor comercial adenoviral utilizado neste trabalho.	38
Figura 7. Região de anelamento dos primers para confirmação da recombinação.	39
Figura 8. Mapa do vetor comercial lentiviral utilizado neste trabalho.	41
Figura 9. Representação esquemática da montagem dos cassetes a serem introduzidos no vetor lentiviral.	42
Figura 10. Produto de PCR resultante da amplificação do gene spc (A) e sua representação gráfica (B).	44
Figura 11. A: Mapa do vetor pUC-ERA contendo a correta inserção do gene spc. B: Digestões do DNA plasmidial de colônia selecionada para avaliar a correta inserção do gene.	45
Figura 12. Amplificação do cassete ERA-Adv-spc-R e purificação do cassete ERA-Adv-spc-A após digestão do vetor pUC-ERA-spc-A com EcoRV.	46
Figura 13. A: Sítios de restrição do plasmídeo pAd/CMV/V5-GW/lacZ para as enzimas HindIII e NotI. B: Midiprep do vetor pAd/CMV/V5-GW/lacZ e digestões com as respectivas enzimas.	47
Figura 14. Mapa de restrição do vetor adenoviral e das duas construções elaboradas nesta plataforma para as enzimas HindIII e XhoI.	48
Figura 15. Análise de colônias, por digestão com HindIII, obtidas após a recombinação.	49
Figura 16. Análise de colônias, por digestão com XhoI, obtidas após a recombinação.	49
Figura 17. Amplificação do cassete ERA-Adv-spc por PCR de colônia.	50
Figura 18. Perfil esperado e perfil encontrado em digestões do DNA plasmidial de duas colônias da placa de recombinering.	51
Figura 19. Perfis de restrição do vetor pRedET e de colônias com as construções pAd-ERA-spc-A e pAd-ERA-spc-R para a enzima HindIII.	51
Figura 20. Purificação do produto de PCR para geração do cassete ERA-LV.	53
Figura 21. Análise do perfil de restrição de clones transformantes para o vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA.	54
Figura 22. Análise do perfil de restrição de nova miniprep dos cinco clones transformantes para o vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA por extração com fenol-clorofórmio.	54

Figura 23. Padrão de digestão da construção pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA com inserções correta e invertida do cassete ERA-LV no vetor pLenti6.3/V5-TOPO® e perfil encontrado após extração de DNA por midiprep.....	55
Figura 24. Produtos de PCR para a amplificação dos fragmentos 1 e 2.	56
Figura 25. Produtos da overlap extension PCR dos fragmentos 1 e 2.	57
Figura 26. Confirmação da identidade da banda coletada na purificação do produto da overlap extension PCR.	57
Figura 27. Análise da correta clonagem do vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD em colônia previamente confirmada.	58
Figura 28. Imagens de microscopia de células HEK 293FT saudáveis (A) e mortas após transfecção em presença de meio DMEM contendo antibióticos (B).	59
Figura 29. Imagens de microscopia de células HEK293FT 48 horas após a transfecção.	59
Figura 30. Gráfico da curva de tolerância a blasticidina pela linhagem HEK 293A. ...	61
Figura 31. Regressão linear com os valores dos pontos da curva de tolerância a blasticidina pela linhagem HEK293A.	61
Figura 32. Titulação das construções lentivirais.	62
Figura 33. Géis de SDS-PAGE com os sobrenadantes das diferentes multiplicidades de infecção da construção ERA-LV.	63
Figura 34. Western blotting com os sobrenadantes de diferentes multiplicidades de infecção da construção ERA-LV.	63
Figura 35. Gel de SDS-PAGE (A) e western blotting (B) para análise da produção da glicoproteína G em células infectadas com a construção ERA-LV.	64
Figura 36. Gel de SDS-PAGE (A) e western blotting (B) para análise da produção da glicoproteína G em células infectadas com a construção ERA-CBD.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados para a construção dos cassetes de expressão da glicoproteína G por meio de adenovírus.....	71
Tabela 2. Oligonucleotídeos para confirmação da correta inserção dos cassetes no genoma adenoviral.....	72
Tabela 3. Oligonucleotídeos para a montagem dos cassetes utilizados em vetores lentivirais	73

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

μF	micro Farad
μg	micrograma
μL	micro litros
APB	Alkaline Phosphatase Buffer
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	albumina sérica bovina
CBD	domínio de ligação à celulose
CBH1	celobiohidrolase I
CMV	citomegalovírus
CNPV	vírus da varíola aviária
CP	controle positivo
Cre	recombinase Cre
Cre-lox	sistema que envolve a recombinase Cre e os sítios loxP
DNA	cido desoxirribonucleico
E	early, regiões ou genes expressos na fase inicial da replicação do adenovírus
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FBS	soro fetal bovino
<i>g</i>	unidade de aceleração
GARC	Aliança Global para o Controle da Raiva
HAdV-5	adenovírus sorotipo 5 humano
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HRP	peroxidase de rábano silvestre
IgG	imunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosideo
kb	quilobases
kDa	quilo Dalton
LB	meio Luria-Bertani
LED	diodo emissor de luz
M	molar
mA	miliampre
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MOI	multiplicidade de infecção
nAChR	receptor nicotínico de acetilcolina
NBT	azul de nitrotetrazólio
NCAM	molécula de adesão celular neuronal
ng	nanograma
nm	nanmetro
OD ₆₀₀	densidade óptica a 600nm
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	peso por volume
p75 ^{NTR}	receptor de neutrofina de baixa afinidade

pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEP	profilaxia pós exposição
pg	picograma
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVC	policloreto de vinila
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RIPA	tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SAD	cepa <i>Street Alabama Dufferin</i>
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SNC	sistema nervoso central
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
Tm	temperatura de <i>melting</i>
V	volt
v/v	volume por volume
VACV	vírus vaccínia
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
Ω	ohm

RESUMO

A raiva é uma das zoonoses virais mais letais do mundo, provocando cerca de 59.000 mortes humanas todos os anos. O vírus da raiva, pertencente à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, possui um RNA senso negativo. É transmitido principalmente por quirópteros e carnívoros, por meio do contato da saliva dos animais infectados com feridas na pele ou mucosas. Após o período de incubação, o vírus leva a um quadro de encefalite aguda, resultando em morte em 99% dos casos. A principal forma de combate à doença adotada pela Organização Mundial da Saúde tem sido a vacinação, em especial, a de animais domésticos. Dentre as formas de prevenção da doença, a vacina oral recombinante tem sido considerada uma proposta interessante, visto que permite a vacinação de animais silvestres na forma de dispersão de iscas. É também uma alternativa mais favorável no mercado de animais de estimação, além de não apresentar riscos quanto à patogenicidade residual. Não havendo um produto nacional para esse fim, procurou-se produzir, neste trabalho, a glicoproteína G do vírus da raiva, que reveste o capsídeo do vírion, para ser utilizada como antígeno na produção de vacinas orais recombinantes. Para tanto, utilizamos células de mamífero como plataforma de expressão, dado o padrão de glicosilação complexo do antígeno. Foram testados dois carreadores virais, um adenovírus e um lentivírus, visando a expressão transiente da proteína e também o desenvolvimento de linhagens produtoras estáveis. O lentivírus, baseado no vírus da imunodeficiência humana tipo 1, apresenta o gene da glicoproteína clonado sob controle do promotor CMV. Adicionalmente, foi feita uma outra construção via *overlap extension* PCR a fim de produzir a glicoproteína fusionada a um domínio de ligação à celulose, visando facilitar a formulação de iscas baseadas nesse polímero. A produção de partículas virais foi realizada na linhagem 293FT, com posterior quantificação destas e transdução da linhagem 293A para verificar a produção da glicoproteína, com análise do sobrenadante e do conteúdo intracelular por SDS-PAGE e *western blotting* 72h após a infecção. Foram identificadas uma ou mais proteínas na faixa de 65 kDa, que corresponderam ao tamanho esperado para a glicoproteína, que pôde ser identificada também no *western blotting*. Contudo, bandas semelhantes apareceram nos controles negativos, sendo necessária a otimização do protocolo. Já o adenovírus, baseado no sorotipo 5 humano, disponível em um vetor comercial, teria parte da região E3 substituída pelo cassete da glicoproteína G através da técnica de *recombineering*, utilizando o gene que confere resistência a espectinomicina

como marca de seleção. Com a confirmação da correta inserção e posterior remoção da marca pelo sistema Cre-Lox, o sistema seria induzido em células de mamífero, com a produção de partículas virais infectantes e a confirmação da produção da proteína feita por *western blotting*. No entanto, não foi possível obter clones através da técnica de *recombineering*, considerada a mais adequada para clonagem em uma região desfavorável, fazendo-se necessária a formulação de uma nova estratégia. O trabalho foi pioneiro na expressão heteróloga associada a carreadores virais dentro do grupo de pesquisa, podendo ser utilizado como referência para otimização em projetos futuros.

ABSTRACT

Rabies is one of the most lethal viral zoonoses in the world, leading to about 59,000 human deaths each year. The rabies virus, which belongs to the family *Rhabdoviridae*, genus *Lyssavirus*, has a negative sense RNA. It is transmitted mainly by chiropterans and carnivores, through the contact of saliva of infected animals with skin or mucosal wounds. After the incubation period, the virus leads to acute encephalitis, resulting in death in 99% of cases. The main way of fighting the disease adopted by the World Health Organization has been vaccination, especially that of domestic animals. Among the forms of disease prevention, the recombinant oral vaccine has been considered an interesting proposal, since it allows the vaccination of wild animals in the form of bait dispersion. It is also a more favorable alternative in the pet market, in addition to presenting no risks regarding residual pathogenicity. In the absence of a national product for this purpose, the aim was to produce, in this work, the glycoprotein G of the rabies virus, which covers the capsid of the virion, to be used as an antigen in the production of oral recombinant vaccines. For that, we used mammalian cells as an expression platform, given the complex glycosylation pattern of the antigen. Two viral vectors, an adenovirus and a lentivirus, were tested, aiming at the transient expression of the protein and also the development of stable producing strains. The lentivirus, based on the human immunodeficiency virus type 1, presents the cloned glycoprotein gene under the control of the CMV promoter. Additionally, another construction was made via overlap extension PCR in order to produce the glycoprotein fused to a cellulose binding domain, aiming to facilitate the formulation of baits based on this polymer. The production of viral particles was performed in the 293FT cell line, with subsequent quantification and transduction of the 293A cell line to verify the glycoprotein production, with analysis of the supernatant and intracellular content by SDS-PAGE and western blotting 72h after infection. One or more proteins were identified in the 65 kDa range, which corresponded to the expected size for the glycoprotein, which could also be identified in western blotting. However, similar bands appeared in the negative controls, making it necessary to optimize the protocol. The adenovirus, based on human serotype 5, available in a commercial vector, would have part of the E3 region replaced by the glycoprotein G cassette through the recombineering technique, using the gene that confers resistance to spectinomycin as a selection mark. With the confirmation of the correct insertion and subsequent removal

of the mark by the Cre-Lox system, the construct would be induced in mammalian cells, with the production of infectious viral particles and the confirmation of the production of the protein made by western blotting. However, it was not possible to obtain clones using the recombineering technique, considered the most suitable for cloning in an unfavorable region, making it necessary to formulate a new strategy. The work was a pioneer in heterologous expression associated with viral vectors within the research group, and can be used as a reference for optimization in future projects.

INTRODUÇÃO

A doença

A raiva é uma zoonose causada por um vírus da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, sendo uma das doenças virais mais letais no mundo, com taxa de mortalidade de quase 100%. Menções sobre a raiva são feitas desde o século 8 A.C., na *Ilíada* de Homero, que descreveu a doença com um termo antigo *lyssa*, que significa loucura, e hoje dá o nome ao gênero ao qual pertence o vírus. Aristóteles, no século 4 A.C., chegou a cogitar que a doença se manifestava após mordidas (BAER, 2007). Diversos relatos feitos por povos antigos mostram o impacto e o medo causado pela raiva. No entanto, foi só no século 19 que a primeira vacina antirrábica foi produzida (DIETZSCHOLD; FABER; SCHNELL, 2003).

A raiva pode se manifestar clinicamente de duas formas: a furiosa, também chamada clássica, conhecida pelo aumento da agitação e da agressividade, bem como o aparecimento da hidrofobia; e a parálitica, que acontece em cerca de 20% dos casos, onde a letargia, dormência e, por fim, a paralisia caracterizam o quadro, sendo mais comumente confundida com outras doenças, como síndrome de Guillain-Barré, tularemia, pasteurelose, dentre outras (MANI et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). As duas formas podem, ainda, manifestar-se alternadamente em um mesmo paciente e, embora com muitos outros diferentes sintomas, acabam por levar aquele acometido pela doença ao coma e morte (FOOKS et al., 2017).

A forma de transmissão mais comum envolve o contato da saliva de animais infectados com feridas abertas, quer profundas ou superficiais. Foram relatados, mais raramente, casos de transmissão por transplante de órgãos de doadores não diagnosticados (ZHANG et al., 2018) e por formação de aerossol (JOHNSON; PHILLPOTTS; FOOKS, 2006), em que a alta carga viral e a exposição de mucosas têm um papel crítico no estabelecimento da infecção.

Uma vez dentro do corpo, o vírus se dirige de maneira retrógrada, através das junções neuromusculares, ao sistema nervoso central (SNC), onde se beneficia de um ambiente imunologicamente privilegiado (LEWIS; FU; LENTZ, 2000; XIANG et al.,

1995). De lá, ele se espalha para as glândulas salivares, fechando o ciclo de transmissão da doença, e também pelo resto do corpo, de forma que, quando atinge novamente seu sítio de entrada, é findado o período de incubação e os primeiros sintomas clínicos se manifestam (FOOKS et al., 2017). O período de incubação pode variar de 2 semanas a 3 meses, a depender da carga viral e da proximidade da lesão em relação à cabeça. Essa é a etapa em que é administrada a profilaxia pós-exposição (PEP), cujas chances de sucesso caem rapidamente a medida que o tempo passa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018a). Uma vez que os sintomas clínicos se manifestam, a letalidade é de quase 100%, uma vez que os protocolos testados não possuem boa reprodutibilidade, de modo que, atualmente, existem apenas 15 casos de sobreviventes, que sofrem com sequelas neurológicas severas (JACKSON, 2016).

A alta adaptabilidade do vírus faz com que seja encontrado em diversos hospedeiros, geralmente quirópteros e mesocarnívoros, como cachorros, raposas, gambás, coiotes, guaxinins e morcegos. Ainda, mais raramente, o vírus atinge outras espécies que não são seus hospedeiros ideais, isto é, que não são capazes de completar o ciclo. É o caso de humanos, gado, cavalos e esquilos, dentre outros. Essa passagem entre diferentes espécies é considerada a responsável pela diferenciação entre os vírus desse gênero, além de suas próprias variantes dentro de um mesmo vírus, o que representa um desafio na busca de um tratamento único que consiga abranger todos os diferentes tipos virais (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; FOOKS et al., 2017).

Cachorros respondem, globalmente, por 99% dos casos de contração de raiva em humanos, chegando a ser uma verdadeira epidemia em alguns países, como é o caso da Índia, em que são os transmissores em 95% dos casos (BRUNKER; MOLLENTZE, 2018; SUDARSHAN et al., 2007). Programas de vacinação de animais de estimação erradicaram os casos de raiva em centros urbanos da Europa, Estados Unidos e Canadá, e reduziram significativamente os casos em países em desenvolvimento. No entanto, a raiva silvestre é um problema em todo o globo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018a). Ainda que países como Bélgica e França tenham criado zonas livres da raiva em seus territórios por meio de dispersão de vacinas na forma de iscas, o que faz dessa estratégia uma boa opção para ser reproduzida no resto do mundo, o controle e vacinação de morcegos ainda é um problema sem solução, além de uma ameaça, pelo seu risco potencial de reintrodução da raiva nessas regiões e, conseqüentemente, nos centros urbanos (FREULING et al., 2013; PASTORET; BROCHIER, 1999).

Morcegos também são fonte de preocupação em outras regiões do mundo, principalmente no continente americano, em que há também espécies hematófagas. Estas se encontram principalmente na América do Sul, onde o medo de morcegos leva também a um problema ambiental. Das mais de 1000 espécies de morcegos, apenas 3 se alimentam de sangue, sendo que apenas uma delas, *Desmodus rotundus*, alimenta-se preferencialmente de sangue humano (JOHNSON; ARÉCHIGA-CEBALLOS; AGUILAR-SETIEN, 2014). No entanto, por desconhecimento, muitos morcegos de outras espécies são mortos sem representarem real ameaça nessas condições, mesmo havendo amparo legal, como é o caso do Brasil, em que todas as espécies, à exceção da mencionada, são protegidas por lei.

Morcegos tem um papel importante como agentes polinizadores de atividade noturna e possuem um papel vital no controle de pragas. No entanto, é necessário cautela: ao contrário do que se acredita, a raiva afeta tanto morcegos insetívoros e frugívoros quanto os hematófagos (MOCHIZUKI et al., 2012). São a natureza aérea e os hábitos reclusos dos morcegos que tornam tão desafiadora a questão da sua vacinação. Além disso, muitos dos parâmetros para aferir resposta imune em outras espécies não podem ser utilizados com morcegos, e mesmo a progressão da doença se manifesta em um padrão diferente dos outros animais (CONSTANTINE, 2009).

A intervenção do homem na natureza também é responsável pela expansão da raiva. Estudos que analisaram a expansão do vírus relataram que barreiras naturais, como cadeias de montanhas e corpos hídricos, parecem ser um empecilho para o vírus. No entanto, quando a intervenção humana constrói formas de atravessar essas barreiras, como no caso de pontes, a raiva acompanha a migração humana (BRUNKER et al., 2015; HORTON et al., 2015). Além disso, com a ocupação de áreas florestadas de forma insustentável, animais selvagens tem seu habitat tomado e passam a interagir com as fronteiras, isto é, regiões rurais, periferias de centros urbanos, dentre outros, sendo, por vezes, tomados como animais de estimação, reintroduzindo a raiva nesses ambientes.

Como agravante, essas regiões, muitas vezes, não contam com a infraestrutura necessária para o diagnóstico da doença e acesso logístico ao tratamento. Na eventualidade de que tal estrutura exista, essas populações marginalizadas com baixo grau de instrução tendem a não procurar um centro de saúde por desconhecerem a doença e seus riscos e, quando procuram, não possuem o poder aquisitivo necessário

para pagar pelo tratamento, como é o caso na África e na Ásia, onde o tratamento custa entre 40 e 50 dólares, mas grupos mais afetados costumam ganhar de 1 a 2 dólares por pessoa por dia (NGUGI et al., 2018).

Ainda, a raiva gera cerca de 59000 mortes por ano e, deste total, cerca de 40 a 50% dos óbitos são de crianças menores de 15 anos. Isso se dá tanto pelo desconhecimento da doença e inabilidade de crianças em fase de desenvolvimento de comunicarem claramente aos responsáveis a origem de machucados quanto pela interação espontânea e imprudente com animais, que faz com que sejam mordidos com maior frequência. A baixa estatura faz também com que as lesões estejam mais próximas da cabeça, diminuindo o já curto tempo para intervenção médica (SHEN et al., 2017). A situação tende a se agravar quando se leva em consideração o aumento de movimentos antivacina voltados também para animais de estimação, o que leva ao reaparecimento da raiva nas cidades.

Além dos aspectos ambientais e sociais, a raiva também causa impacto econômico: seja pelo controle de animais polinizadores, como discutido anteriormente, como pelo de animais que possuem um importante papel no controle de pragas, o que afeta, em ambos os casos, a produção de alimentos. Ainda, a existência de animais hematófagos e de animais predadores infectados tem impacto também na pecuária. No Brasil, perdem-se cerca de 40000 cabeças de gado por ano em virtude da raiva (HEINEMANN et al., 2002).

A raiva é, portanto, uma doença negligenciada. Os números mencionados, já preocupantes, são ainda, infelizmente, subestimados: acredita-se que, pela semelhança com outras doenças, pela ausência de ferramentas de diagnóstico e caracterização dos vírus e de monitoramento uniforme ao redor do globo, o número de mortes seja ainda maior. A exemplo disto, apenas a Índia registra cerca de 20000 casos por ano (HAMPSON et al., 2015).

No Brasil, entre 2000 e 2017, foram registrados 188 casos de raiva humana, com maior incidência em homens (66,5%). Refletindo os impactos sociais da doença mencionados anteriormente, crianças menores de 15 anos representam quase metade dos casos e moradores de áreas rurais respondem por 67% dos casos totais. Em termos de distribuição, as regiões Nordeste e Norte foram as mais afetadas nesse período e regiões de fronteira com a Bolívia e o Peru registraram 4 casos de raiva humana. No

entanto, o país tem progredido no combate à doença, visto que 85,6% dos casos ocorreram entre 2000 e 2009, contra 14,4% entre 2009 e 2017, com coeficiente de incidência, para cada 100.000 habitantes, caindo de 0,0842, entre 2000 e 2005, para 0,0098 entre 2012 e 2017. Em termos de transmissão, os cães foram os principais vetores em quaisquer períodos, representando entre 40,7% e 46,6% dos animais transmissores. Os morcegos, antes representando quase metade dos casos entre 2000 e 2008, responderam por 29,6% entre 2009 e 2017. No entanto, surtos de transmissão provocados por esses animais, como entre 2004 e 2005, que somam 85,1% dos casos totais de transmissão por quirópteros entre 2000 e 2017, devem ser constantemente monitorados para evitar novas ocorrências. O surgimento de novos casos com transmissão por outros animais silvestres, como macacos, cachorros-do-mato e raposas é também um problema a ser combatido (VARGAS; ROMANO; MERCHÁN-HAMANN, 2019).

Dadas todas as questões mencionadas anteriormente, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e a Aliança Global para o Controle da Raiva (GARC) desenvolveram uma campanha mundial de colaboração para a erradicação da raiva causada por cães até 2030, com foco no incentivo de pesquisas para melhor caracterização dos vírus e seus comportamentos durante a infecção, visando desenhar novas estratégias de tratamento, e para o desenvolvimento de vacinas mais abrangentes, de menor custo de fabricação, de mais fácil estocagem, com menor número de reforços necessários e, preferencialmente, em vias de administração mais bem toleradas pela população e igualmente práticas quando se tratando de outros animais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018b).

O vírus

A doença é causada pelo vírus da raiva (RABV), pertencente ao gênero *Lyssavirus*, que se subdivide em 3 diferentes grupos filogenéticos. Os demais vírus do gênero também são capazes de causar doenças com sintomas semelhantes (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018). Eles têm como característica o formato de suas partículas semelhante ao de um projétil, sendo o vírus da raiva (RABV) a espécie mais

estudada. Essa espécie faz parte do grupo 5 da classificação de Baltimore, isto é, tem como material genético uma fita única de RNA não segmentada e de senso negativo, de aproximadamente 12 kb, que codifica para apenas 5 proteínas. Essas proteínas são conhecidas por letras únicas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase dependente de RNA (L, devido ao grande tamanho de seu gene em relação ao genoma) (Figura 1).

A proteína N possui um papel na proteção do material genético da ação de ribonucleases, além de auxílio no empacotamento (LUO et al., 2007). Também associada ao empacotamento, a proteína P é, além disso, um importante cofator para a proteína L e atua como chaperona para a proteína N, impedido que esta se ligue ao RNA da célula hospedeira (MAVRAKIS et al., 2006). Estudos mostraram também sua capacidade de associação com a dineína, o que poderia explicar o transporte retrógrado do vírus através dos axônios em direção ao sistema nervoso central, tornando esta proteína uma das responsáveis pela patogenicidade do vírus, o que corrobora com seu papel também na inibição do sistema de interferon pela célula hospedeira (JACOB et al., 2000; RAUX; FLAMAND; BLONDEL, 2000; VIDY; CHELBI-ALIX; BLONDEL, 2005). Estas proteínas, em associação também com a polimerase L e o genoma viral, constituem o complexo ribonucleoproteico, que assume a forma de uma hélice.

Esse complexo é revestido por uma membrana fosfolipídica derivada da célula hospedeira, onde se encontram as outras duas proteínas do vírion: M, na parte interna, e G, na parte externa. Além de ajudar na compactação do complexo, a proteína M tem um importante papel na regulação negativa da transcrição viral. Ao impedir a máxima expressão dos genes virais, a proteína M garante a viabilidade celular, atrasando a resposta imune que poderia ocorrer antes de o vírus se dirigir ao cérebro. Além disso, a proteína M é responsável pelo balanço entre transcrição e replicação viral, impedindo o desvio excessivo para uma das outras opções, facilitando a produção de novos vírions (FINKE; CONZELMANN, 2003). Ela é também responsável, além da já mencionada interação com o complexo ribonucleoproteico, pela interação com a proteína G, auxiliando no empacotamento.

A glicoproteína G, formada por cerca de 500 aminoácidos e com tamanho aproximado de 65 kDa, possui três sítios de N-glicosilação e é classificada como uma proteína transmembrana do tipo I, isto é, possui uma região voltada para a face externa do vírus, de 440 aminoácidos, uma região transmembrana, de 21 aminoácidos, e a

região voltada para a face interna do vírus, de 44 aminoácidos (Uniprot: P03524) (GUPTA et al., 2005). A glicoproteína organiza-se em trímeros no retículo endoplasmático, formando algo semelhante a espinhos por todo o envelope viral. Tem como função a associação a receptores celulares, garantido a entrada do vírion na célula. Não se sabe ao certo quais receptores seriam o alvo da glicoproteína G, mas os mais citados são o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), a molécula de adesão celular neuronal (NCAM) e o receptor de neutrofina de baixa finidade (p75^{NTR}) (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

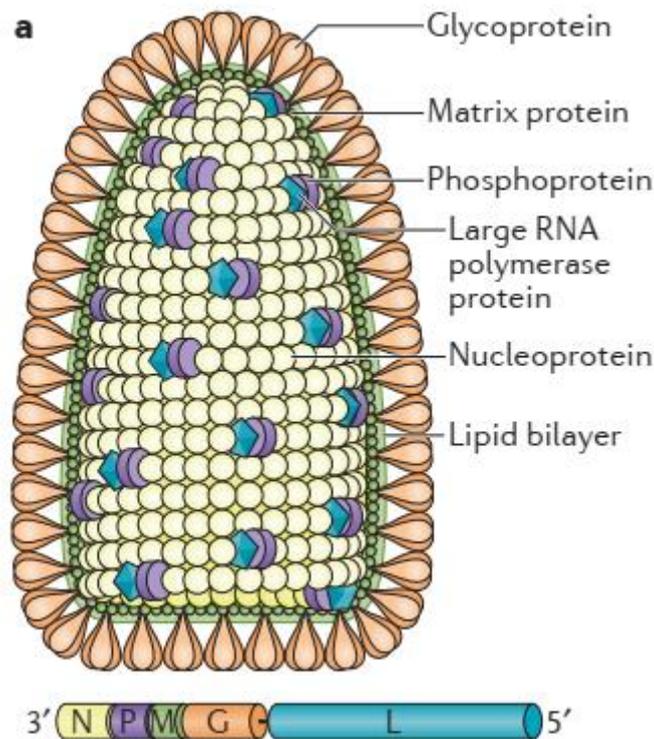


Figura 1. Representação gráfica da partícula viral e disposição dos genes no genoma do vírus da raiva. As cores utilizadas para destacar os genes correspondem às cores utilizadas para destacar suas proteínas. Retirado de FOOKS et al., (2017)

A glicoproteína do vírus da raiva comprovadamente gera resposta imune, o que a torna uma das proteínas mais utilizadas em vacinas contra a doença (WIKTOR et al., 1973). No entanto, a expressão da proteína em sua totalidade parece ser um fator importante, visto que trabalhos que geraram uma versão solúvel da glicoproteína, sem os últimos 58 aminoácidos na porção C-terminal, induziram a produção de anticorpos neutralizantes em níveis mais baixos (DIETZSCHOLD et al., 1983). Sua porção citoplasmática parece ter também um papel na montagem de novos vírions, já que células infectadas com vírus compostos por uma versão da proteína com essa região

deletada tiveram problemas no empacotamento viral (MEBATSION; KONIG; CONZELMANN, 1996). Assim como a proteína M, a glicoproteína G parece ter um papel na viabilidade celular através do balanço de apoptose e sobrevivência de neurônios (CHRISTOPHE et al., 2003).

Quer pela infecção e amplificação de seu material genético em células musculares antes de atingir junções neuromusculares, quer pelo acúmulo direto de vírions na fenda sináptica, quer pela infecção de neurônios sensoriais, o vírus tem sua entrada nas células nervosas mediada por sua glicoproteína G através de um processo de pinocitose mediada por clatrina (PICCINOTTI; WHELAN, 2016). Este, então em vesículas endossomais, é transportado ao longo do axônio de forma retrógrada através de microtúbulos, com o auxílio da proteína motora dineína. Ao chegar ao soma, a membrana viral se funde às vesículas endossomais pela diminuição do pH dentro destas, o que causa uma mudança conformacional na glicoproteína, permitindo que o nucleocapsídeo ou complexo ribonucleoproteico seja liberado dentro da célula.

Esses complexos servem como molde para a transcrição e replicação celular pelo complexo formado entre as proteínas L e P. O acúmulo de proteínas virais, cuja expressão é regulada por regiões espaçadoras não transcritas, gera corpos de inclusão, chamados corpúsculos de Negri, que são uma característica marcante da doença e utilizados para seu diagnóstico. Quando os níveis de proteínas virais, em especial da proteína N ultrapassam certo limite, uma mudança conformacional da proteína P altera a atividade da polimerase L, que passa a ter uma atividade de replicação, ao invés de transcricional. Assim, são produzidas fitas de RNA de senso positivo, também associadas em complexos ribonucleoproteicos que passam a servir de molde para a produção do genoma viral que, por sua vez, se associa à proteína de matriz, que compacta a hélice do nucleocapsídeo. Por fim, a proteína de matriz se associa à glicoproteína G, que se acumula na membrana plasmática após ser produzida no retículo endoplasmático rugoso e passar pelos processos de glicosilação, gerando novos vírions que passam aos próximos neurônios (ALBERTINI; RUIGROK; BLONDEL, 2011).

Vacinas

Por seu ajuste fino e manutenção da viabilidade celular, o vírus da raiva evita a geração precoce de resposta imune pelo corpo do hospedeiro. Essa resposta, quando gerada mais cedo e associada ao aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, mostrou-se bem-sucedida no *clearance* viral (GNANADURAI; FU, 2016). Chegar a este quadro tem sido o objeto de estudo de pesquisas voltadas para o tratamento da raiva. Atualmente, quando uma pessoa não vacinada contrai a doença e procura atendimento médico, é iniciada a profilaxia pós-exposição, que consiste na administração de imunoglobulinas e vacinação, com outras três doses de reforço, independente de quando ocorreu a mordida, enquanto pessoas vacinadas recebem apenas a vacina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018a).

A primeira vacina contra a raiva surgiu no século 19, com Louis Pasteur, que injetou um preparado celular de medula espinhal de coelho infectado, que foi concentrado progressivamente em ar estéril, em um paciente que havia sido mordido. A primeira injeção foi feita com vírus inativado, enquanto as demais passavam progressivamente por períodos mais curtos de concentração, aumentando a dose de vírus ainda capazes de infecção com o passar do tempo (BORDENAVE, 2003). Essa vacina, embora promissora, apresentava desvantagens: a quantidade de partículas infecciosas era, por vezes, tão alta que o paciente contraía a doença através da vacina; além disso, a alta demanda tornava o uso de coelhos na produção das vacinas insuficiente. Posteriormente, um protocolo de inativação utilizando fenol, somado ao uso de cérebros de cabras e ovelhas infectadas, parecia ter resolvido o problema. No entanto, a alta concentração de mielina no preparado causava, como efeito colateral, encefalite e morte. Isso foi minimizado com o uso de modelos animais com menor teor de mielina, como camundongos recém-nascidos e embriões de galinha (HICKS; FOOKS; JOHNSON, 2012).

No entanto, as vacinas com cepas atenuadas utilizadas atualmente surgiram com a implementação da cultura de tecidos na produção de vacinas. A primeira linhagem utilizando células humanas foi obtida nos anos 70 a partir de uma cepa já adaptada a células primárias de rim de hamster. Esse protocolo de adaptação, desenvolvido primeiramente por Pasteur, consistia em passagens sucessivas em células de uma mesma linhagem até a fixação do período de desenvolvimento dos sintomas da doença por parte das células. O mesmo método foi aplicado a outras cepas do vírus da raiva. A cepa SAD (*Street Alabama Dufferin*), por exemplo, teve seu vírus isolado de um cão

raivoso no Alabama, e foi adaptado primeiramente em células de rato, seguido também de células de rim de hamster. Três cientistas passaram o vírus, ainda, por células de embriões de galinha e de rim suíno, gerando uma cepa capaz de infectar espécies alvo do vírus, mas incapaz de causar a doença em outras espécies não tradicionais. A cepa, utilizada neste trabalho, leva o nome dos três pesquisadores: Evelyn-Rokitnicki-Abelseth, ou ERA (BAER, 2017).

Com o advento de técnicas mais sofisticadas de biologia molecular, o uso de vacinas recombinantes aumentou o espectro de possibilidades no desenvolvimento de novas formas de tratamento. Vacinas recombinantes, por definição, têm seu antígeno produzido isoladamente por expressão heteróloga em outra plataforma que não a fonte original. Esse método apresenta como vantagem a ausência de patogenicidade residual e a possibilidade de diferentes combinações ou mesmo desenvolvimento de novas proteínas (KNOWLES et al., 2009; SOBEY et al., 2013). É o caso, por exemplo, de uma glicoproteína G híbrida, formada tanto pelo vírus da raiva como pelo vírus Mokola, com o intuito de desenvolver imunidade a vírus de dois grupos filogenéticos distintos dentre os lyssavírus (JALLET et al., 1999).

A expressão de antígenos na superfície de vírus não parentais é também uma estratégia utilizada atualmente. Vacinas contra a raiva dentro dessa categoria já foram desenvolvidas utilizando, por exemplo, os vírus vaccínia (VACV) (WIKTOR et al., 1984), adenovírus sorotipo 5 humano (HAdV-5) (YAROSH et al., 1996) e da varíola aviária (CNPV) (CADOZ et al., 1992). A escolha do carreador viral depende de uma série de fatores, tais como: ubiquidade do vírus, tropismo viral, expressão transiente ou não do antígeno, medidas de biossegurança para os vírus utilizados, capacidade de recombinação com outras espécies, dentre outros.

O adenovírus sorotipo 5 humano (HAdV-5), utilizado neste trabalho, pertence ao grupo 1 da classificação de Baltimore, isto é, tem DNA fita dupla linear não segmentada como material genético. Esse vírus possui tropismo por células da mucosa, tornando-o um bom candidato para vacinas recombinantes administradas por via oral (SANTOSUOSSO; MCCORMICK; XING, 2005). Diferentemente do vírus da raiva, o adenovírus é capaz de um controle temporal da expressão de seus genes. Isso se dá pela presença tanto de promotores reconhecidos pela célula hospedeira quanto pela presença de promotores reconhecidos pela polimerase viral. Os primeiros estão associados a regiões que contém genes expressos na primeira fase do ciclo reprodutivo do vírus,

como o da própria polimerase viral que, por sua vez, passa a reconhecer os promotores das regiões expressas mais tardiamente. Assim, o genoma do adenovírus se subdivide em regiões nomeadas de acordo com a fase em que são expressas, sendo as iniciais denominadas por E (*early*) e as tardias por L (*late*).

O sistema utilizado neste trabalho conta com a deleção de quase toda região E3 do adenovírus, que tem um papel na modulação da resposta imune, sendo, portanto, considerada não essencial para a replicação. Deleções de regiões não essenciais são necessárias, visto que estes vírus são capazes de empacotar apenas 105% do seu tamanho original (BETT; PREVEC; GRAHAM, 1993). O sistema conta, ainda, como medida de biossegurança, com deleções dos genes *E1a* e *E1b* necessários para a replicação do vírus. Dessa forma, a menos que sejam cultivados em linhagens celulares que possuam esses genes integrados em seu genoma, não são capazes de se reproduzir na natureza.

A utilização do adenovírus para apresentação da glicoproteína G como antígeno apresenta como desvantagem a necessidade de produção e purificação constantes do vírus em linhagens adaptadas, além de uma etapa de concentração do vírus para adequação da dose por vacina. Isto porque o vírus, na ausência dos genes *E1a* e *E1b* em seu próprio genoma e em linhagem celulares não modificadas, é incapaz de se replicar no corpo do hospedeiro, levando a uma expressão transiente do antígeno. Em contrapartida, a utilização de lentivírus permite o desenvolvimento de linhagens produtoras estáveis e integração no genoma das células hospedeiras. Parte do grupo 6 da classificação de Baltimore, os lentivírus são retrovírus, isto é, possuem RNA fita simples de senso positivo como seu material genético, conhecidos por seus longos períodos de incubação, motivo pelo qual levam esse nome (*lenti*, do latim lento). Com a introdução do material genético e proteínas virais dentro da célula, o vírus se encaminha para o núcleo, onde se utiliza de uma transcriptase reversa, uma DNA polimerase dependente de RNA, para gerar uma fita simples de DNA de senso negativo que, por sua vez, é introduzida no genoma da célula hospedeira — um processo aleatório, mas que ocorre preferencialmente em sítios transcricionalmente ativos — por uma integrase viral. O sistema utilizado neste trabalho é baseado no vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), composto por 4 plasmídeos com regiões de homologia ausentes entre si, sem os quais a replicação viral não é possível (LIFE TECHNOLOGIES, 2010).

Este trabalho visa expressar a glicoproteína G do vírus da raiva de duas diferentes formas: por expressão transiente, através da apresentação da glicoproteína utilizando o adenovírus sorotipo 5 humano; e pela apresentação da glicoproteína através de células infectadas por lentivírus que tenham seu material genético integrado no genoma, com o desenvolvimento de linhagens estáveis produtoras da glicoproteína. Tais propostas foram pensadas visando desenvolver, futuramente, uma vacina oral recombinante contra a raiva de origem nacional voltada para o uso em animais.

JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A raiva é uma zoonose de origem viral com uma taxa de mortalidade altíssima, ainda que as primeiras formas de tratamento tenham surgido há 2 séculos. Os enormes impactos sociais, ambientais e econômicos causados por ela fazem da raiva uma doença negligenciada e uma emergência pediátrica, quando quase 50% das vítimas são crianças de até 15 anos. Esta é uma realidade para muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, que não possui nenhum produto de origem nacional para o controle da doença. Assim, este trabalho almeja avançar no processo de transferência de tecnologia de produtos já criados no exterior para o Brasil, visando à produção de vacinas recombinantes orais nacionais.

OBJETIVOS E METAS

Neste trabalho, o objetivo principal foi o de realizar a expressão heteróloga do gene codificador da glicoproteína G do vírus da raiva em células de mamífero por meio de dois carreadores virais com o intuito de produzir vacinas orais recombinantes. Para tal, foram propostas as seguintes metas:

Adenovírus:

- 1) Amplificar o gene *spc* e inseri-lo no cassete previamente sintetizado via clonagem por in-Fusion, criando a construção ERA-Adv-*spc*-A, com posterior purificação do cassete;
- 2) Amplificar a construção ERA-Adv-*spc*-A, substituindo as regiões de homologia com o auxílio de *primers*, gerando a construção ERA-Adv-*spc*-R, com posterior purificação do cassete;
- 3) Transformar a linhagem DH10B de *E. coli* com os plasmídeos pAd/CMV/V5-GW/*lacZ* e pRED/ET;
- 4) Introduzir os cassetes ERA-Adv-*spc*-A e ERA-Adv-*spc*-R na linhagem transformada via *recombineering*;
- 5) Retirar o gene *spc* por meio do sistema *Cre-Lox*;
- 6) Linearizar o vetor adenoviral com a enzima PacI e transfectar a linhagem 293A;
- 7) Coletar e titular adenovírus recombinantes;
- 8) Analisar as proteínas adenovirais por SDS-PAGE e *western blotting*.

Lentivírus:

- 1) Remover as regiões de homologia com o vetor adenoviral via PCR, gerando o cassete ERALV;
- 2) Amplificar, a partir do cassete ERALV, dois fragmentos, visando fusionar o gene da glicoproteína G do vírus da raiva à porção do gene da celobiohidrolase I de *Trichoderma reesei* que corresponde ao domínio de ligação a celulose (CBD);
- 3) Gerar o cassete ERACBD a partir da união dos dois fragmentos, amplificados anteriormente, via *overlapping PCR*;

- 4) Gerar os vetores de expressão pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA e pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD através da clonagem do tipo TA;
- 5) Transformar células da linhagem Stbl3 de *E. coli* com os vetores de expressão;
- 6) Selecionar clones com vetores sem recombinações indesejáveis;
- 7) Cotransfectar a linhagem 293FT com os vetores de expressão e vetores responsáveis pela replicação e empacotamento viral;
- 8) Coletar e titular lentivírus recombinantes;
- 9) Realizar a transdução da linhagem 293A para análise da produção da glicoproteína via SDS-PAGE e *western blotting*, além de seleção de linhagens produtoras estáveis;

ESTRATÉGIAS

Estratégia 1: Adenovírus

Construção dos cassetes ERA-Adv-*spc* A e R

O cassete ERA-Adv, contendo o gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva, foi sintetizado a partir da sequência da cepa ERA (Evelyn Rokitnicki Abelseth) (GenBank: [AF406693.2](#)), largamente utilizada em vacinas contra a raiva, com 50 pares de base (pb) de homologia com uma porção da região E3 do adenovírus sorotipo 5 humano flanqueando o gene (Figura 2). O gene que confere resistência a espectinomicina (*spc*), a ser inserido no sítio de BglII do cassete ERA, foi sintetizado previamente pelo grupo de pesquisa (Figura 3).

```
GATATCCTGTAAACGCCACCGTCTTCACCCGCCCAAGCAAACCAAGGCCAACCTTACgacATGGTTCCCTCAGGCTCTCCT
GTTTGTACCCCTTCTGGTTTTTCCATTGTGTTTTGGGAAATTCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGA
GCCCCGATTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGATAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTGACGGGTC
TCCTACATGGAACCTAAAGTTGGATACATCTTAGCCATAAAAAATGAACGGGTTCACTTGACACAGGCGTTGTGACGGAGGC
TGAACCTACACTAACTTCGTTGGTTATGTCACAACCACGTTCAAAGAAAGCATTTCGCCCAACACCAGATGCATGTA
GAGCCCGGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCCTGACTACCCGCTGG
CTTCGAACGTAAAAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATC
CCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAGCGGGAAGTGTCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCCAGATT
ACACCATTTGGATGCCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGTATCC
AAAGGGAGTGAGACTTGGCGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCTATATAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAACTCAAGTTATG
TGGAGTTCTAGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCG
ATCAGTTGTGAACCTGCACGACTTTCGCTCAGACGAAATTGACACCTTGTGTAGAGGAGTTGGTCAGGAAGAGAGAG
GAGTGTCTGGATGCAC TAGAGTCCATCATGACAACCAAGTCAAGTGTGAGTTTTCAGACGCTCAGTCATTTAAGAAAACCTGT
CCCTGGGTTTGAAAAGCATATACCATATTCAACAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAAGTCAAGACTT
GGAATGAGATCCTCCCTTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGAGGTGTATCCTCATGTGAACGGGTTGTTTTTCAAT
GGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTT
GGAATCCTCGGTTATCCCTTGTGCACCCCTGGCAGACCCGCTTACCCTTTTCAAGGACGGTGACGAGGCTGAGGATT
TTGTTGAAGTTACCTTCCCGATGTGCACAATCAGGTCTCAGGAGTTGACTTGGGTCTCCCGAACTGGGGGAAGTATGTA
TTACTGAGTGCAGGGGCCCTGACTGCCTTGATGTTGATAATTTTCCCTGATGACATGTTGTAGAAGAGTCAATCGATCAGA
ACCTACGCAACTCAATCTCAGAGGGACAGGGAGGAGGTGTGAGTCACTCCCAAAGCGGGAAGATCATATCTTCATGGG
AATCACACAAGAGTGGGGGTGAGACCAGACTGTGAGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAA
CCCGGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACCGGGGTTCCGGTC
CCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGGTTTCTTCCCTTTTCCCCACCC
ACCCCCAAGTTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTAGACGCA
GGGCAGCGCCGAGCAACAGCGCATGAATCAAGAGCTCCAAGATATC
```

Figura 2. Sequência do cassete ERA. Em amarelo, a sequência do gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva. Em azul, o terminador da timidina quinase do vírus herpes simples. Em laranja, 50 nucleotídeos de homologia com a região E3 do adenovírus sorotipo 5 humano. Destacado em vermelho e letras minúsculas, parte do contexto Kozak otimizado para mamíferos (GACATG). Destacado em vermelho, o sítio de BglII para a inserção do gene de resistência a espectinomicina (*spc*). Sublinhados, os sítios de EcoRV para a liberação do cassete do vetor pUC-ERA e posterior recombinação *in vivo* em bactéria.

GATATCATCAAGAAGGTCTGGTCATGACGTTAACTGCTTCATCTTCTTCCCGCATAACTT
CGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATCATGCCTCCTCTAGACCAGCCAGGACAGAAA
TGCCTCGACTTCGCTGCTGCCCAAGGTTGCCGGGTGACGCACACCGTGGAAACGGATGAA
GGCACGAACCCAGTGGACATAAGCCTGTTCCGGTTCGTAAGCTGTAATGCAAGTAGCGTAT
GCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCAGCGGTGGTAACGGCGCAGTGGC
GGTTTTTCATGGCTTGTTATGACTGTTTTTTTTGGGGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAA
GCAGCAAGCGCGTTACGCCGTGGGTGCATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTAC
GCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGA
AGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTT
GCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATAT
TGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACCGCGCAGCTTTGATCAA
CGACCTTTTGAAAACCTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGT
CACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCA
ATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGA
CATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCC
AGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGA
AACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCT
TACGTTGTCCCGCATTGGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCCG
TGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAG
ACAGGCTTATCTTGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGA
ATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAACCCCTCGAGCCA
CCCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTACGCGTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
AGAAAAGATCAAAGGATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGAAATTC
GTCCAGCGCAGACGCTGAAAGCGATCAACGCCTCTTTACAGCGGAGTGCATGATATC

Figura 3. Sequência do gene de resistência a espectinomicina (*spc*) presente no plasmídeo pSPEC-phi. Em azul, a região que codifica para o gene *spc*. Em amarelo, sítios loxP para posterior excisão da marca pelo sistema Cre-Lox. Flanqueando os sítios loxP, em vermelho, regiões de homologia com o gene *pyrF* de *E. coli*. Regiões promotora e de poliadenilação do gene *spc* representados em verde e rosa, respectivamente.

Foram desenhados oligonucleotídeos (*primers*) para a amplificação do gene *spc* flanqueado por sítios loxP, contendo 15 pares de base de homologia com o cassete ERA. Com a amplificação e purificação do inserto, foi feita a linearização com BglII do vetor contendo o cassete ERA (pUC-ERA) e, posteriormente, a clonagem do inserto por In-Fusion e transformação de *E. coli* por choque térmico. A seleção foi feita por resistência a espectinomicina e a comprovação da correta inserção do gene *spc* por análise de restrição, gerando assim o cassete ERA-Adv-*spc*-A (Figura 4). Por fim, o vetor final pUC-ERA-*spc*, contendo o cassete ERA-Adv-*spc*-A, foi digerido com EcoRV e o cassete purificado para ser utilizado posteriormente na técnica de *recombineering*. Novos *primers* (ERA-F e ERA-R) foram desenhados a fim de trocar a região de homologia com o vetor adenoviral, diminuindo a deleção de parte do vetor original após da recombinação (Figura 5). A amplificação foi feita via PCR, utilizando o cassete ERA-Adv-*spc*-A como DNA molde, gerando assim o cassete ERA-Adv-*spc*-R (Figura 4), que foi posteriormente purificado. A disposição das regiões de homologia em relação ao vetor adenoviral pode ser observada na Figura 5.

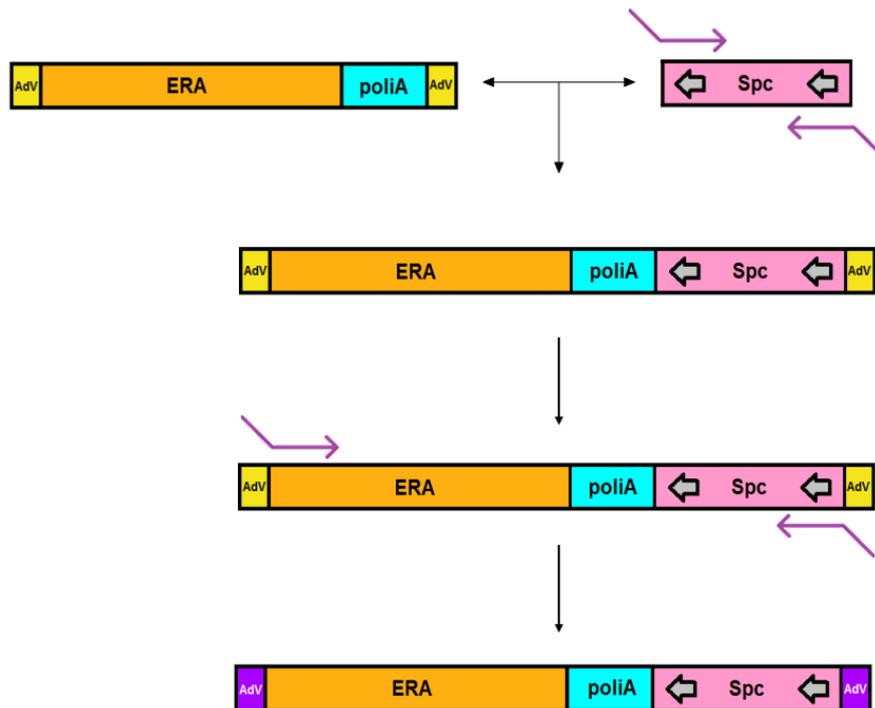


Figura 4. Representação esquemática da montagem dos cassetes a serem introduzidos no vetor adenoviral. A amplificação do gene *spc* foi feita por PCR e sua inserção no cassete ERA-Adv por clonagem In-Fusion, gerando o cassete ERA-Adv-*spc*-A. Este foi utilizado como DNA molde para gerar um novo produto de PCR, substituindo as regiões de homologia com o vetor adenoviral, resultando no cassete ERA-Adv-*spc*-R.

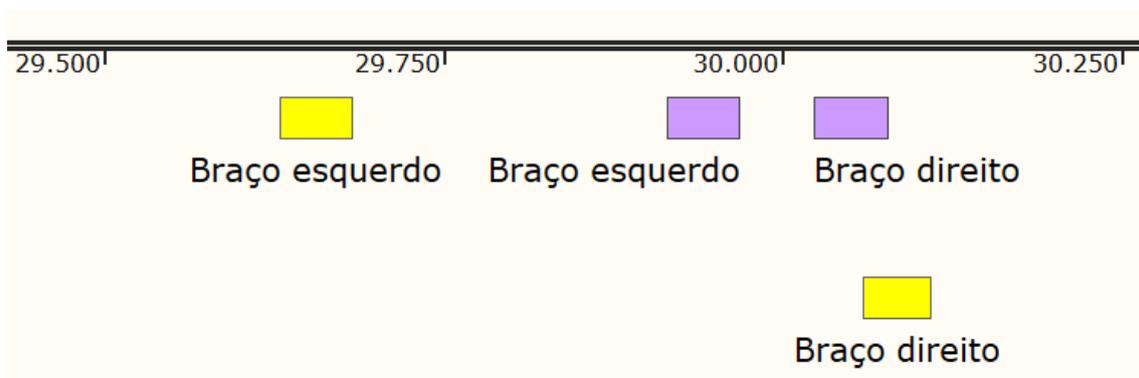


Figura 5. Disposição das regiões de homologia dos cassetes ERA-Adv-*spc*-A e ERA-Adv-*spc*-R em relação ao vetor adenoviral. As regiões de homologia com o vetor adenoviral que flanqueiam o cassete ERA-Adv-*spc*-A são representadas em amarelo, com 376pb de distância entre si. As do cassete ERA-Adv-*spc*-R, com 55pb de distância, são representadas em roxo. Em linhas duplas pretas, parte da região E3 do vetor adenoviral. Representação esquemática feita no programa SnapGene.

Construção de adenovírus recombinantes

O genoma do adenovírus sorotipo 5 humano (HAdV-5) foi obtido através do vetor comercial pAd/CMV/V5-GW/*lacZ*, que é utilizado como controle positivo de transfecção no kit ViraPower™ Adenoviral Gateway™ Expression Kit da empresa

Invitrogen. Uma vez que o intuito deste trabalho é o de inserir os cassetes ERA-Adv-*spc* A e R na região E3 do vírus, considerada não essencial para a viabilidade viral, o vetor comercial pAd/CMV/V5-DEST do mesmo kit, utilizado para a expressão heteróloga adenoviral em células de mamífero, não pôde ser utilizado, visto que possui o gene suicida *ccdB* como controle de clonagem inicialmente proposta pelo kit. O vetor pAd/CMV/V5-GW/*lacZ*, além da ausência do gene *ccdB*, contém o gene *lacZ*, que poderá ser usado para facilitar a titulação viral posteriormente (Figura 6).

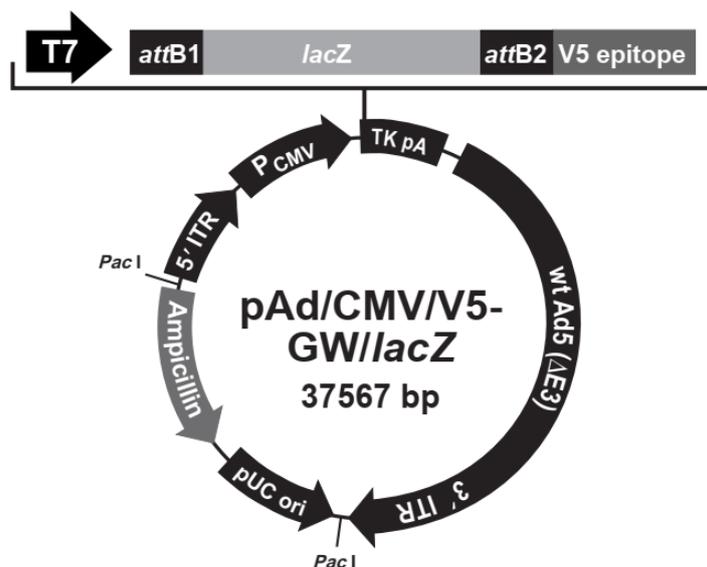


Figura 6. Mapa do vetor comercial adenoviral utilizado neste trabalho. Retirado do manual MAN0000302 da empresa Invitrogen.

Para a inserção dos cassetes na região E3 do vírus, foi feita uma recombinação *in vivo* pela técnica de *recombineering* através do kit Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kit da empresa Gene Bridges. Para tal, a linhagem DH10B de *E. coli* foi transformada com o vetor pRedET — que contém as recombinases RecE e RecT do profago Rac — por eletroporação, visto que esse plasmídeo possui uma origem de replicação termosensível. Com a seleção em tetraciclina de colônias transformadas, uma colônia foi escolhida para o preparo de células eletrocompetentes, uma vez que uma nova transformação, após indução do vetor pRedET com L-arabinose, seria necessária para inserir o vetor adenoviral e um dos cassetes anteriormente mencionados, promovendo, assim, a recombinação em *E. coli*. Foram separados dois inóculos para o controle positivo e dois para cada construção. Um inóculo de cada foi induzido com L-arabinose com concentração final de 0,3 a 0,4% (p/v) ao chegar na densidade óptica (OD_{660nm}) de 0,3. A indução se deu por 1 hora e, posteriormente, foi seguido o protocolo para preparo

de células eletrocompetentes. Os demais inóculos atuaram como controle negativo do experimento. Aos controles positivos, foi adicionado um cassete, fornecido pelo kit, para inserção no genoma de *E. coli*, contendo canamicina como marca de seleção, e, às construções, foram adicionados o vetor pAd/CMV/V5-GW/*lacZ* e o cassete ERA-Adv-*spc* A ou R. Após o choque, o tempo de recuperação a 37 °C pode se estender de 1 h a 4 h. O controle positivo, com e sem L-arabinose, foi plaqueado em meio com canamicina e as construções, com e sem indução, em meio com ampicilina e espectinomicina. A confirmação da correta inserção do cassete do vetor viral se daria por análise de restrição e por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Tabela 2 e Figura 7).

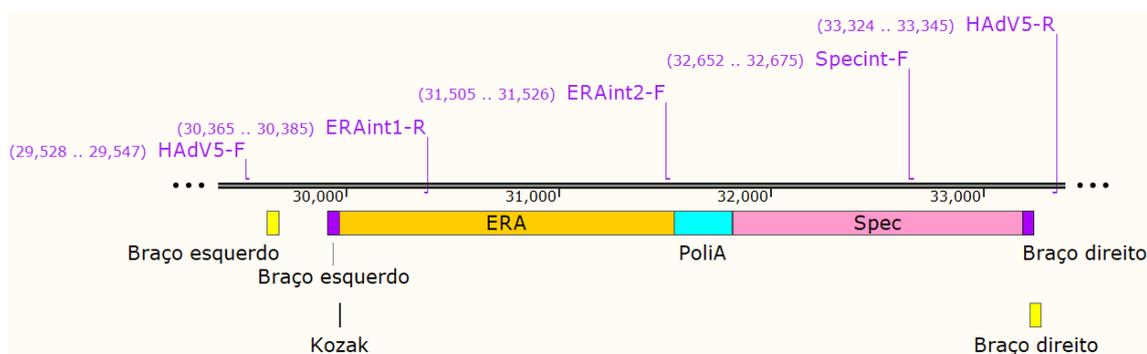


Figura 7. Região de anelamento dos primers para confirmação da recombinação. Linhas pretas duplas representam parte do genoma do adenovírus sorotipo 5 humano, na região E3. Em amarelo e roxo, as regiões de 50 pb de homologia entre o vetor e os cassetes ERA-Adv-*spc*-A e ERA-Adv-*spc*-R. Em alaranjado, o gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva. Em azul, a região de poliadenilação. Em rosa, o gene *spc* que confere resistência a espectinomicina. Em vermelho, o contexto Kozak otimizado para mamíferos. Escrito em roxo, os primers utilizados para confirmação, bem como região de anelamento e sentido. Representação esquemática feita no programa SnapGene.

Em seguida, uma colônia de cada construção (pAd-ERA-*spc*-A e pAd-ERA-*spc*-R) seria selecionada para o preparo de células eletrocompetentes e posteriormente transformada com o vetor 705-Cre da empresa Gene Bridges, que contém os genes da recombinase Cre, de resistência a cloranfenicol e uma origem de replicação e promotor termossensíveis. Após crescimento e seleção de colônias pelos antibióticos cloranfenicol, espectinomicina e ampicilina a 30 °C, uma colônia de cada construção seria escolhida para ser inoculada em ampicilina, com cultivo passando de 30 °C para 37 °C, a fim de expressar a recombinase Cre e permitir a excisão dos sítios loxP, removendo a marca de espectinomicina do vetor adenoviral. Uma diluição adequada do inóculo seria então selecionada em placas de Petri contendo, separadamente, meio com ampicilina e espectinomicina. Sendo possível identificar colônias da placa de espectinomicina, uma colônia da placa de ampicilina seria escolhida para novo cultivo a

37 °C e novas placas seriam feitas com diluições até que houvesse um número considerável de colônias na placa de ampicilina e nenhuma colônia na placa de espectinomicina. Algumas colônias seriam selecionadas em novas placas contendo os mesmos antibióticos separadamente e, havendo nova confirmação de não crescimento em espectinomicina, uma das colônias testadas de cada construção seria, em seguida, cultivada para extração de DNA em média-escala com o kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System da empresa Promega.

Expressão e identificação da proteína de interesse

Posteriormente, seria feita a digestão das construções finais com a enzima PacI para linearização do vetor e liberação de sequências relativas à manipulação do genoma em bactéria (Figura 6). Após purificação, as construções linearizadas seriam utilizadas para transfectar a linhagem HEK 293A de células de mamífero. Essa linhagem possui genes que codificam para proteínas da região E1 do vírus, permitindo sua replicação ainda que o genoma seja defectivo. Com a coleta dos vírus após o cultivo por 2 semanas das células transfectadas, o ensaio de titulação com placas de lise e contagem das unidades formadoras seriam realizados. Não havendo vírions em níveis iguais ou superiores a 100.000 unidades infecciosas por mililitro, uma nova transfecção seria feita. A produção da glicoproteína G pelo adenovírus seria, por fim, analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e *western blotting*.

Estratégia 2: Lentivírus

Construção de lentivírus recombinante

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), um lentivírus, teve parte do genoma obtido através do vetor pLenti6.3/V5-TOPO®, do kit ViraPower™ HiPerform™ Lentiviral Expression Systems - pLenti6.3/V5™-TOPO™ TA Cloning™ Kit da Invitrogen (Figura 8). Uma vez que a construção de um lentivírus recombinante pelo kit se baseia na clonagem TA auxiliada pela topoisomerase, um novo cassete, ERA-LV, foi produzido utilizando *primers* sintetizados para amplificar somente a região do gene da glicoproteína G do vírus da raiva em conjunto com a região de poliadenilação presentes no vetor pUC-ERA (Tabela 3), eliminando, assim, a presença da região de homologia com o adenovírus.

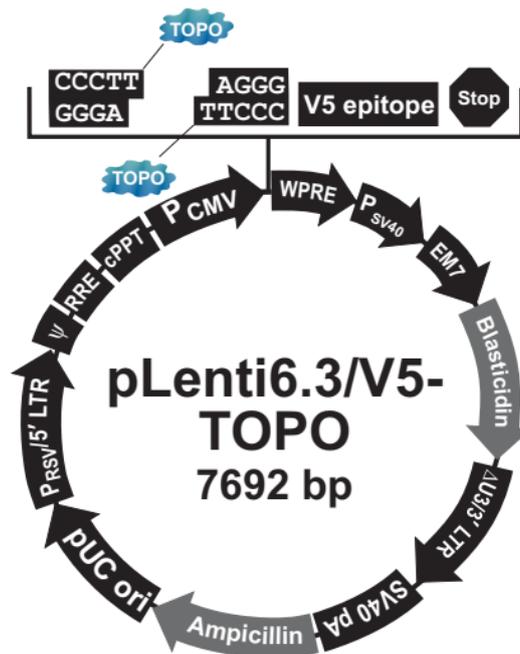


Figura 8. Mapa do vetor comercial lentiviral utilizado neste trabalho. Retirado do manual do kit A10291 da empresa Invitrogen.

A PCR foi feita com uma *Taq* polimerase mista de alta fidelidade, a *Platinum*[®] (Invitrogen), de forma que, em alguns fragmentos, fosse adicionada uma adenina extra na extremidade 3'. Com a purificação do fragmento, foi feita uma reação de ligação entre este e o vetor, de acordo com as instruções do kit, e transformação por choque térmico com a linhagem *Stbl3*, também presente no kit. A seleção foi feita em ampicilina e a análise da correta inserção do fragmento por uso de enzimas de restrição. Uma colônia contendo o fragmento inserido na posição correta — e com o vetor não apresentando qualquer recombinação indesejada — foi selecionada e cultivada para posterior preparação de DNA plasmidial em média escala com o mesmo kit utilizado nas construções adenovirais, observando-se, porém, as precauções a serem tomadas com linhagens *endA+*, de modo a obter, assim, o vetor final pLenti6.3/V5-TOPO[®]-ERA.

Além disso, outro cassete, ERA-LV-CBD, foi gerado também utilizando *primers* sintetizados (Tabela 3) de modo a amplificar, assim como no cassete ERA-LV, apenas a região do gene da glicoproteína em conjunto com a região de poliadenilação a partir do vetor pUC-ERA, mas também inserindo a porção do gene *cbh1* de *Trichoderma reesei* correspondente ao domínio de ligação à celulose (CBD) da exo-celobiohidrolase I (CBHI) na região do C-terminal da glicoproteína G. Uma vez que a sequência deste domínio é pequena, ela pôde ser adicionada diretamente nos *primers*, que tem entre si uma região de sobreposição de 20 pb (Figura 9).

Dessa forma, foram amplificados dois fragmentos (Fragmento 2: ERALV-R e ERACBD-F; Fragmento 1: ERALCBD-R e ERALV-F) com uma polimerase de alta fidelidade que gera extremidades abruptas, a *Phusion*® (New England Biolabs), e, posteriormente, feita uma *overlap extension* PCR com a DNA polimerase de alta fidelidade *Platinum*® (Invitrogen) para gerar um fragmento único, ERACBD, utilizado na clonagem da mesma forma que o cassete ERA-LV, gerando o vetor final pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD.

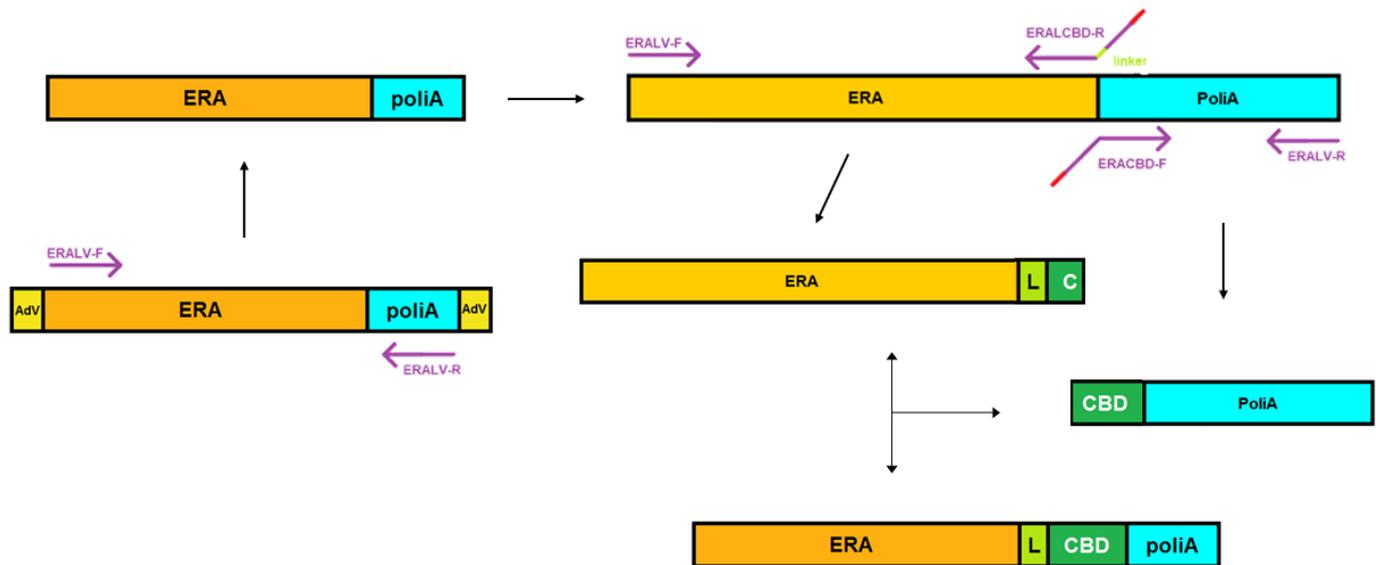


Figura 9. Representação esquemática da montagem dos cassetes a serem introduzidos no vetor lentiviral. Foram utilizados *primers* para remover as regiões de homologia com o vetor adenoviral, gerando o cassete ERA-LV. A partir dele, dois pares de *primers* foram utilizados para gerar dois diferentes fragmentos, posteriormente unidos via *overlap extension* PCR, gerando o cassete ERA-LV-CBD, com o intuito de fusionar a glicoproteína G a um domínio de ligação a celulose. Em azul, a região de poliadenilação do cassete ERA. Em laranja, a região do gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva. Em roxo, os *primers* sintetizados para a construção dos cassetes, com a região de sobreposição entre dois deles mostrada em vermelho. Em verde, a região do linker necessária para fusionar a glicoproteína G ao CBD.

Expressão e identificação da proteína de interesse

De forma semelhante à estratégia do adenovírus, a linhagem HEK 293FT foi transfectada com as construções finais em lentivírus (pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA e pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD), juntamente com um mix provido pelo kit, que contém plasmídeos que expressam as proteínas estruturais do vírus e permitem sua replicação. Dessa forma, o lentivírus só é completamente montado havendo a presença de todos os plasmídeos, tornando a manipulação de seu genoma *in vitro* mais fácil e a manipulação das partículas virais, infecciosas ou não, mais segura. Após a transfecção e período de

produção das partículas virais de cerca de 48 a 72 h, estas foram recuperadas no sobrenadante e utilizadas para infectar a linhagem HEK 293A, com titulação viral realizada por seleção, durante 2 semanas, em meio contendo blasticidina e posterior coloração com cristal violeta. Com isso, a mesma linhagem foi transduzida novamente de duas formas: com diferentes proporções de partículas virais infectantes e células, selecionando novamente por 2 semanas, seguido de coleta das células e do sobrenadante; e com as mesmas proporções mencionadas, mas com coleta do sobrenadante e das células após 72h para análise da produção da proteína e sua detecção por SDS-PAGE e *western blotting*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estratégia 1: adenovírus

Construção dos cassetes ERA-Adv-*spc* A e R

O cassete ERA, que contém o gene da glicoproteína G do vírus da raiva (RABVG), neste trabalho chamado de ERA, foi sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) e clonado em um vetor derivado do pUC contendo resistência a ampicilina. O vetor foi transformado na linhagem XL10-GOLD de *E. coli* e extraído em média-escala (midiprep), segundo protocolo descrito em Materiais e Métodos. *Primers* que foram desenhados anteriormente para amplificar o gene *spc* (Sm5 e Sm3, Tabela 1) anelavam-se em parte da sequência loxP e inseriam regiões de homologia com o vetor pUC-ERA para posterior clonagem por In-Fusion. No entanto, não houve sucesso na amplificação do gene *spc*. Isso poderia ser explicado pela semelhança da porção 3' entre os dois *primers*, tornando-os inespecíficos. Posteriormente, o grupo de pesquisa desenhou ainda novos *primers* (Spe5 e Spe3, Tabela 1) que anelam em regiões mais afastadas do loxP. Com isso, foi possível amplificar o gene *spc* (Figura 10) a partir do plasmídeo pSPEC-phi (Figura 3). O tamanho esperado para o fragmento é de 1440 pb.

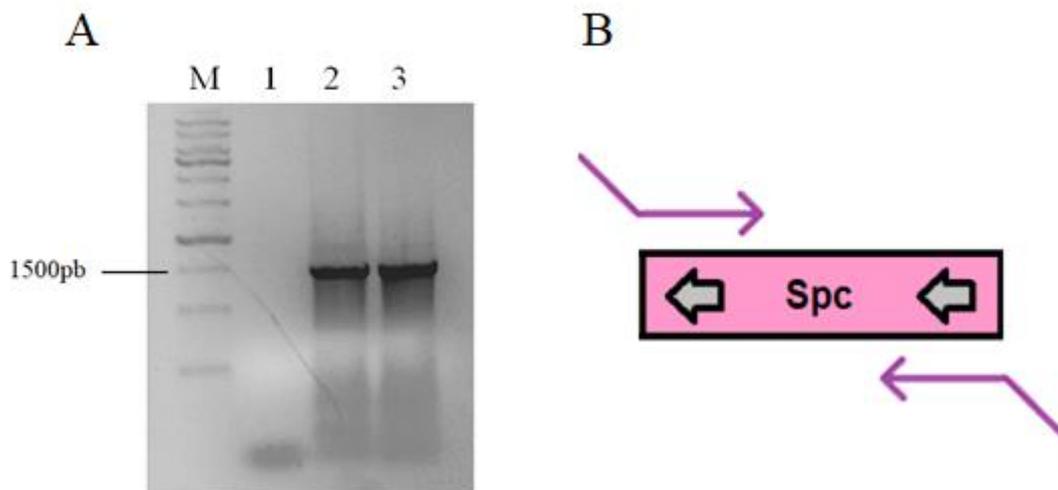


Figura 10. Produto de PCR resultante da amplificação do gene *spc* (A) e sua representação gráfica (B). Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse). No poço 1, o controle negativo do experimento e, nos poços 2 e 3, o produto de PCR. O fragmento esperado era de 1440 pb. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Com a purificação do fragmento contendo o gene *spc* e linearização do vetor pUC-ERA com BglII, foi feita a clonagem por In-Fusion e transformação da linhagem HST08 Stellar de *E. coli*, recomendada pelo kit. Foi feita uma simulação do perfil de restrição para a inserção correta e colônias foram escolhidas para análise (Figura 11).

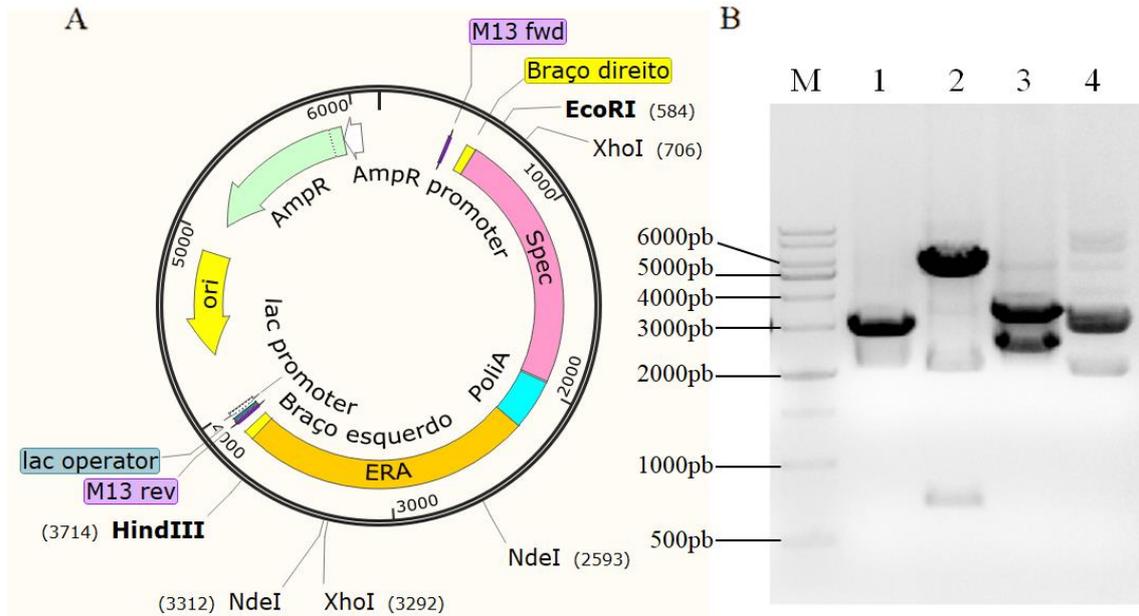


Figura 11. A: Mapa do vetor pUC-ERA contendo a correta inserção do gene *spc*. B: Digestões do DNA plasmidial de colônia selecionada para avaliar a correta inserção do gene. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse); poços 1, 2 e 3 com digestões com HindIII+EcoRI, NdeI e XhoI, respectivamente. Os tamanhos esperados eram de 3003 e 3130pb; 719 e 5414pb; e 2586 e 3547pb, respectivamente. Pode-se observar a digestão parcial em todos os poços. Mapa feito no programa SnapGene. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

As colônias analisadas, cuja inserção do fragmento no cassete se mostrou correta, tiveram estoques congelados. O vetor pUC-ERA-*spc*-A foi extraído e linearizado com *EcoRV* para liberação do cassete, sendo este purificado para uso posterior no *recombineering* (Figura 12). O mesmo vetor foi utilizado como DNA molde para gerar o cassete ERA-Adv-*spc*-R a partir de uma PCR (Figura 12) com os *primers* 7 e 8 da Tabela 1.

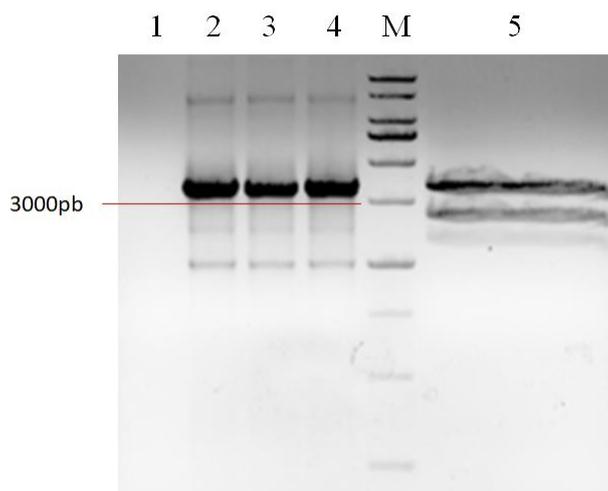


Figura 12. Amplificação do cassete ERA-Adv-*spc-R* e purificação do cassete ERA-Adv-*spc-A* após digestão do vetor pUC-ERA-*spc-A* com EcoRV. Poços 1, 2, 3 e 4 e 5: controle negativo da PCR, amplificação do cassete com temperaturas de anelamento de 52, 55 e 57°C e digestão com EcoRV, respectivamente. Tamanho esperado para a amplificação de 3338pb e para a digestão de 3375pb. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse). Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Construção de adenovírus recombinante

Foram preparadas células eletrocompetentes da linhagem DH10B, que foi escolhida para o *recombineering* após análise de linhagens capazes de comportar grandes plasmídeos, não havendo resistência inata a nenhum dos antibióticos utilizados no projeto. Uma alíquota foi transformada com o vetor pAd/CMV/V5-GW/*lacZ*. A seleção foi feita em ampicilina e foi feito um estoque da linhagem transformada, além de uma midiprep e digestão com NotI e HindIII para confirmação (Figura 13), visto que, com uma miniprep, não se obteve DNA em quantidade necessária para ser visto em um gel de agarose. Ainda, a linhagem DH10B foi transformada separadamente com o vetor pRedET. Foi feito um estoque da linhagem transformada e uma colônia foi escolhida para novo preparo de células eletrocompetentes conforme descrito anteriormente.

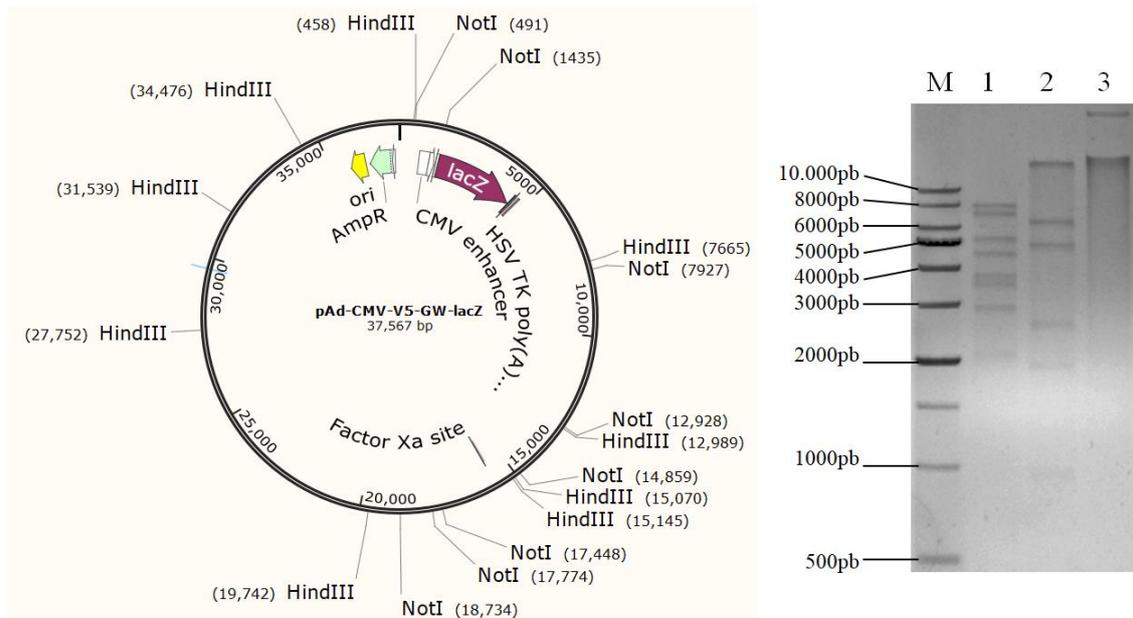


Figura 13. A: Sítios de restrição do plasmídeo pAd/CMV/V5-GW/lacZ para as enzimas HindIII e NotI. B: Midiprep do vetor pAd/CMV/V5-GW/lacZ e digestões com as respectivas enzimas. Poços 1, 2 e 3 contendo as digestões com HindIII, NotI e plasmídeo intacto, respectivamente. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse). Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Mapa feito no programa SnapGene.

Foi feita uma primeira tentativa com o *recombineering*, utilizando 400ng de DNA total, em uma proporção de 3:1 de inserto:vetor, tempo de recuperação de 3h a 37°C sem agitação e os parâmetros 1350 V, 10 μ F e 600 Ω – recomendados pelo kit – para o choque. Não se obteve colônias com as construções após a transformação e poucas foram obtidas no controle positivo. Dada uma primeira transformação malsucedida da linhagem DH10B com o vetor pAd/CMV/V5-GW/lacZ utilizando os mesmos parâmetros de choque, cogitou-se que o *recombineering* poderia não ter funcionado porque o vetor não teria transformado em *E. coli*. Uma nova transformação com o vetor adenoviral utilizando os parâmetros 2500 V, 25 μ F e 200 Ω se mostrou mais adequada (Figura 13) e foi utilizada em uma nova tentativa da técnica de *recombineering*.

Ainda, outras modificações foram feitas na segunda tentativa, com utilização de 500ng de DNA total, em uma proporção de 5:1 de inserto:vetor, e tempo de recuperação de 4 horas a 37°C com agitação de 1000 rpm. Algumas colônias foram escolhidas para miniprep e posterior análise por restrição, mas não apresentaram nenhum padrão esperado (Figura 15). Novas colônias foram selecionadas e uma nova miniprep foi feita, mas o padrão também não foi o esperado. Acreditando que o problema poderia ser uma

extração de má qualidade, foi feita uma nova miniprep usando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit da Qiagen, mais favorável para a purificação de plasmídeos de cerca de 40 kb, e posterior digestão com XhoI, mas o padrão foi o mesmo visto anteriormente (Figura 16).

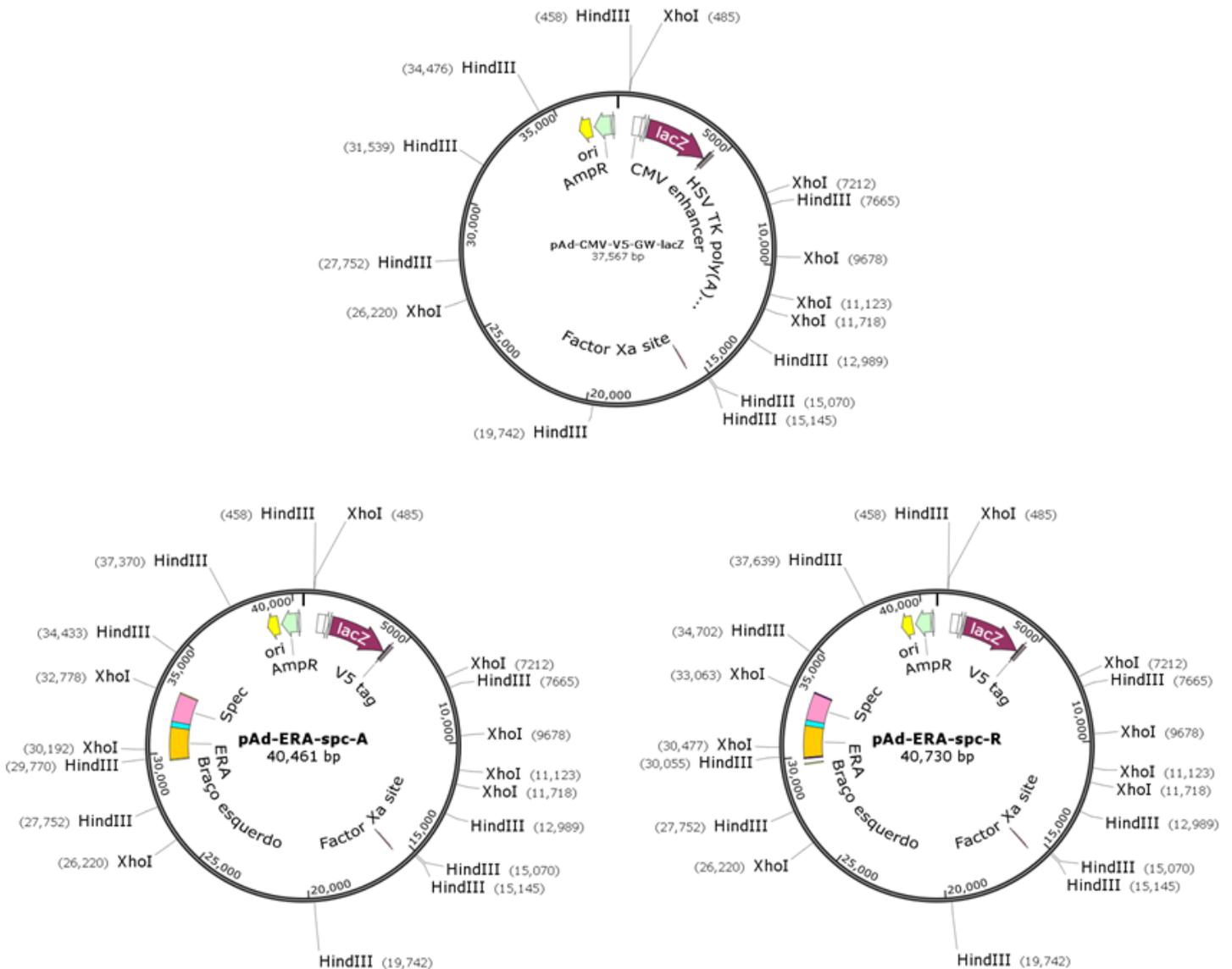


Figura 14. Mapa de restrição do vetor adenoviral e das duas construções elaboradas nesta plataforma para as enzimas HindIII e XhoI.

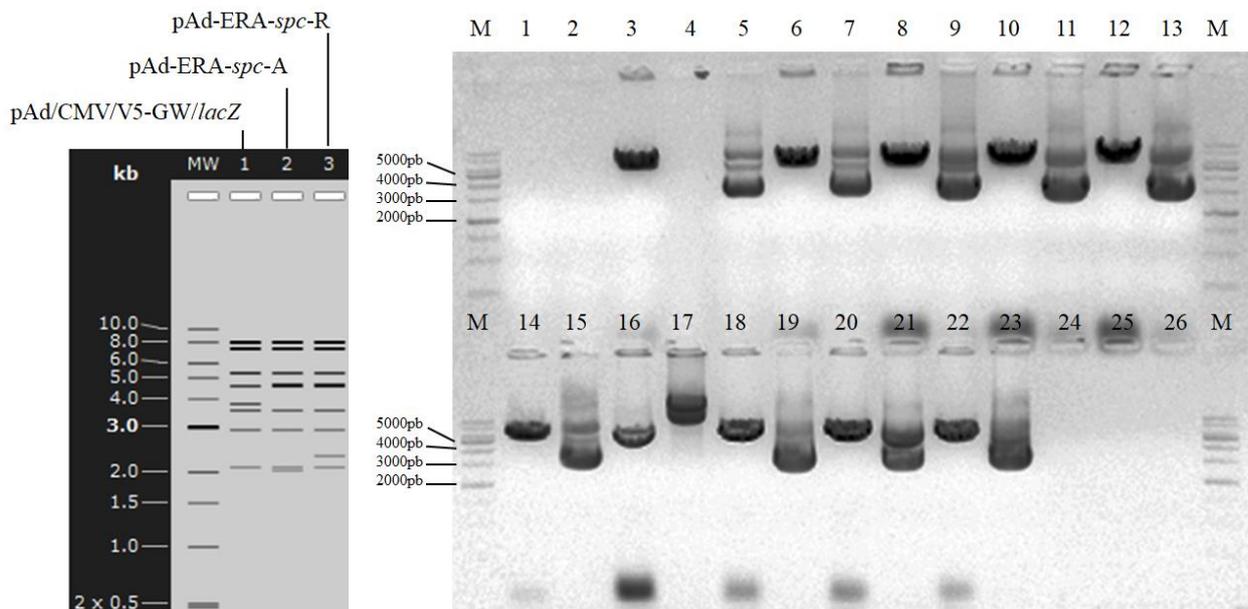


Figura 15. Análise de colônias, por digestão com HindIII, obtidas após a recombinação. Colônias transformadas com os fragmentos ERA-Adv-*spc-R* e ERA-Adv-*spc-A* nas porções superior e inferior do gel, respectivamente. Digestões nos poços pares de 6 a 22, além do poço 3. Amostras intactas nos poços ímpares de 5 a 23. Marcador molecular 1 kb Ladder (Sinapse). Simulação do padrão de restrição feita no programa SnapGene. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

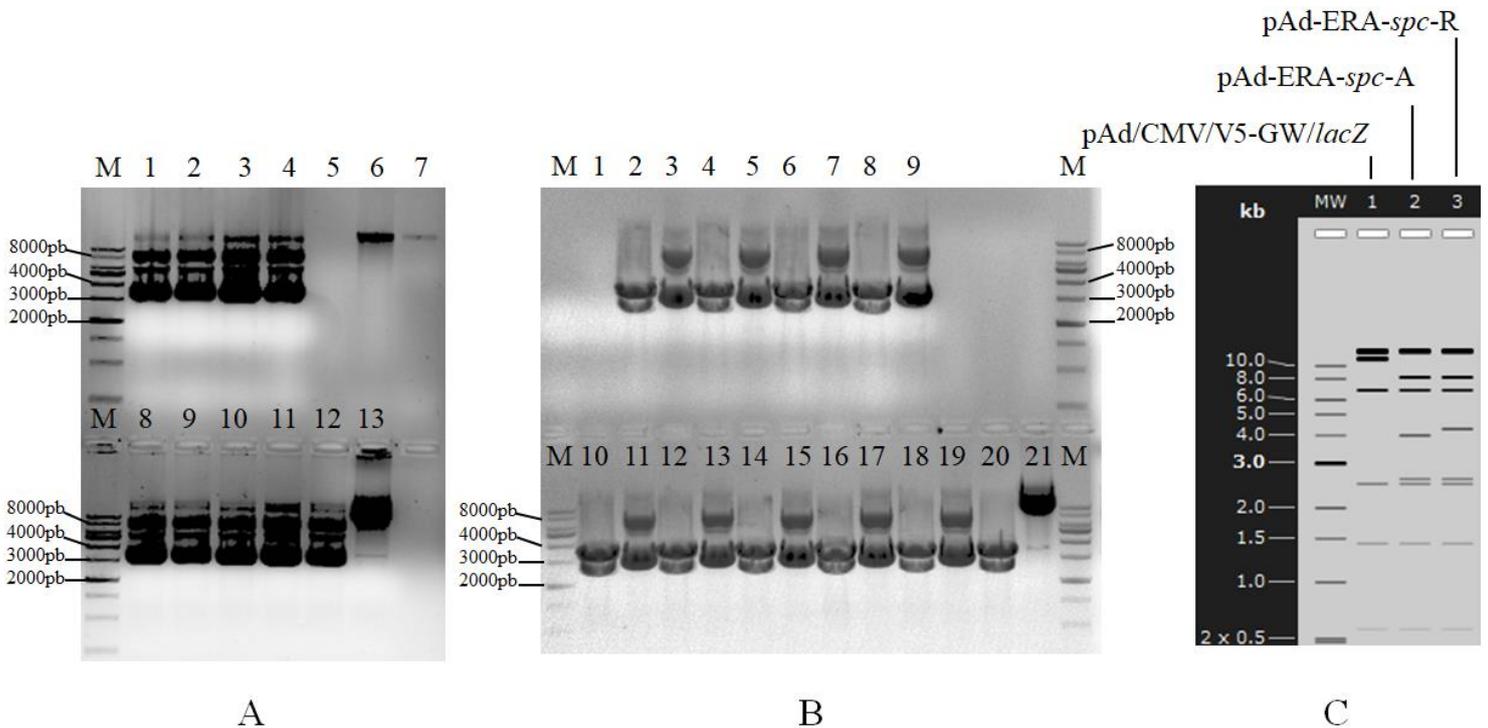


Figura 16. Análise de colônias, por digestão com XhoI, obtidas após a recombinação. Colônias transformadas com os fragmentos ERA-Adv-*spc-R* e ERA-Adv-*spc-A* nas porções superior e inferior de cada gel, respectivamente. **A:** perfil do DNA extraído em nova miniprep. Poços 7 e 8: pAd/CMV/V5-GW/*lacZ* de midiprep anterior e da diluição do kit, respectivamente. **B:** digestões com XhoI (poços ímpares, de 3 a 21) e intactos (poços pares, de 2 a 20) de nova miniprep com kit da Qiagen. **C:** simulação do programa SnapGene do padrão de digestão

esperado para XhoI. Marcador molecular 1kb Ladder em todas as figuras. Eletroforeses em gel de agarose 0,8%.

Foram feitas PCRs de colônia com 4 a 5 colônias de cada construção utilizando os *primers* 7 e 8 da Tabela 1 para verificar a presença do cassete ERA-Adv-*spc* que, por ser um fragmento linear, deveria ter se integrado para manter a resistência a espectinomicina (Figura 17). O par de *primers* foi usado pois, na época, os *primers* internos e externos da Tabela 2 não haviam sido sintetizados.

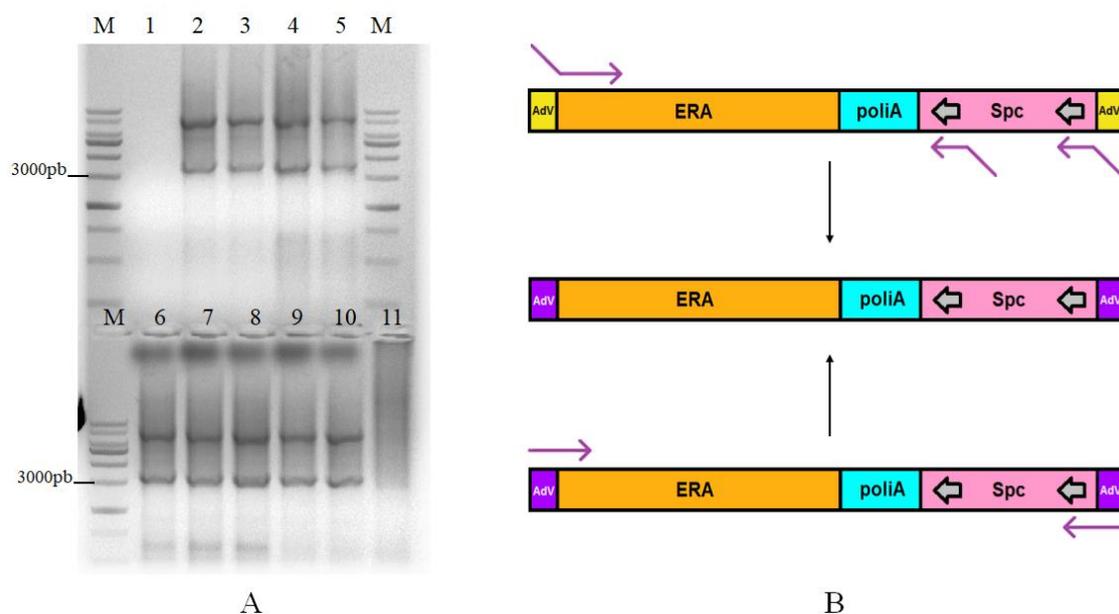


Figura 17. Amplificação do cassete ERA-Adv-*spc* por PCR de colônia. A: Colônias transformadas com os fragmentos ERA-Adv-*spc*-A e ERA-Adv-*spc*-R nas porções superior e inferior de cada gel, respectivamente. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse) e controle negativo no poço 1. Amplificação esperada de 3338 pb para o cassete. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. B: Representação gráfica do uso do mesmo par de primers para amplificação do cassete ERA-Adv-*spc*-R a partir das duas construções.

Vendo que os padrões encontrados nas figuras Figura 15 e Figura 16 eram semelhantes, mesmo utilizando enzimas diferentes, cogitou-se, pelo tamanho das bandas, que se tratava no vetor pRedET, que, segundo o kit, deveria ser perdido com a mudança de temperatura para 37°C. Uma nova consulta ao kit revelou que linhagens derivadas da MG1655, como a DH10B, retinham os plasmídeos das recombinases por mais tempo a 37°C do que outras linhagens. Foram feitos cultivos em meio líquido nessa temperatura, seguidos de placas contendo separadamente ampicilina + espectinomicina e tetraciclina. Foram obtidas colônias na placa de tetraciclina, indicando que o plasmídeo das recombinases não havia sido perdido. Por ser menor, seu rendimento em comparação com o vetor adenoviral era muito maior, impedindo uma melhor visualização do padrão de restrição no gel. A partir da placa de ampicilina + espectinomicina, foram escolhidas

novas colônias para cultivo e análise em placa. Foram feitas 8 passagens até que não houvesse colônias na placa de tetraciclina. Uma colônia de cada construção foi escolhida para uma midiprep e posterior digestão com XhoI, mas o padrão esperado não foi encontrado dentre os clones (Figura 18). Foi feita uma miniprep do vetor pRedET, a partir do estoque feito anteriormente, e digestão com HindIII para comparação com o DNA extraído das mesmas colônias submetidas à avaliação com XhoI (Figura 19).

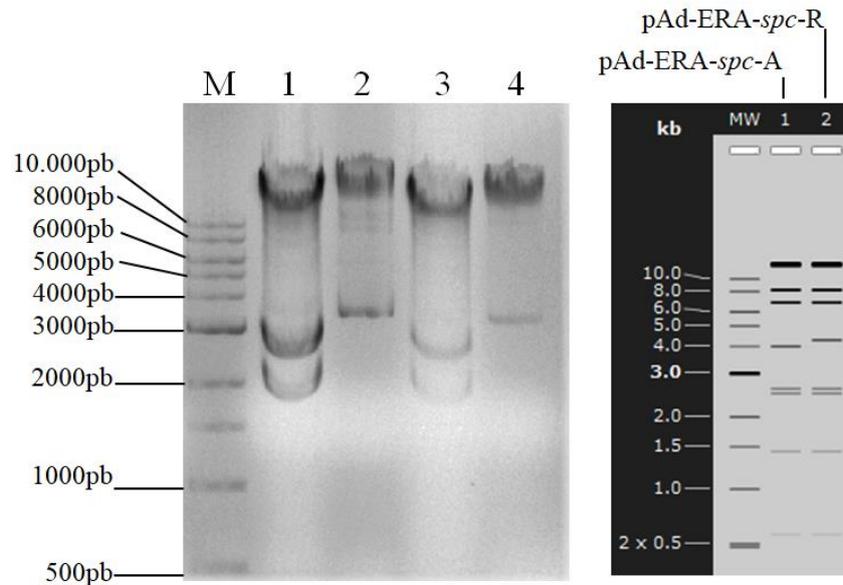


Figura 18. Perfil esperado e perfil encontrado em digestões do DNA plasmidial de duas colônias da placa de *recombineering*. Digestões com XhoI dos plasmídeos pAd-ERA-*spc*-A e pAd-ERA-*spc*-R nos poços ímpares e os intactos de ambos nos poços pares. Simulação no programa SnapGene do padrão de digestões esperado para a correta inserção do cassete ERA-Adv-*spc* no vetor adenoviral utilizando XhoI. Marcador molecular 1kb Ladder. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

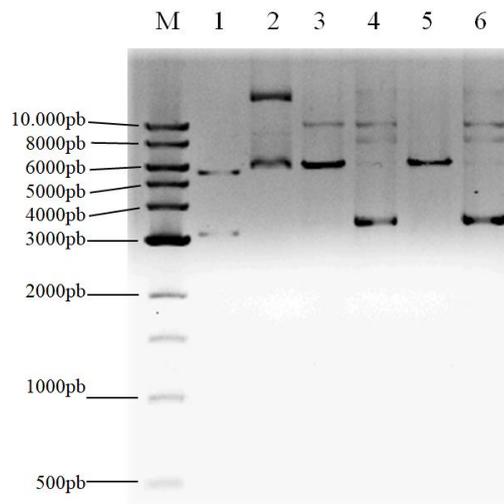


Figura 19. Perfis de restrição do vetor pRedET e de colônias com as construções pAd-ERA-*spc*-A e pAd-ERA-*spc*-R para a enzima HindIII. Digestões nos poços ímpares e intacto

nos poços pares do vetor das recombinases e das construções A e R, respectivamente. Marcador molecular 1kb Ladder. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Não se encontrou uma explicação satisfatória para o perfil mostrado nas figuras de 15, 16, 18 e 19. Foi feita nova PCR de colônia com algumas colônias das duas construções utilizando os *primers* 7 e 8 da Tabela 1, mas não houve amplificação. Isso poderia ser justificado por excesso de colônia na PCR ou por inserção indesejada do cassete. Além disso, a técnica é considerada mais adequada para a avaliação de produtos de PCR de até 1000pb. Notou-se posteriormente que os *primers* Spe5 e Spe3 (Tabela 1), para a amplificação do gene *spc*, incluíam 40pb de homologia com o gene *pyrF* de *E. coli*. Dessa forma, parte das inserções do cassete poderiam ter se dado no genoma em detrimento do vetor viral. Foram escolhidas 5 colônias de cada construção para uma nova PCR de colônia utilizando menos material. Ainda, foi feita uma extração de DNA total com as mesmas colônias e PCR tradicional. No entanto, não houve amplificação em nenhum dos dois casos.

Foram desenhados novos *primers* internos e externos às construções para uma confirmação mais adequada, com regiões de anelamento mostradas anteriormente na Figura 7 e com sequências disponíveis na Tabela 2. Foram feitas novas reações de PCR com todas as amostras de DNA extraídas anteriormente utilizando esses *primers*. No entanto, não houve amplificação em nenhum dos casos. Curiosamente, os *primers* 7 e 8 da Tabela 2 deveriam gerar um produto de 655pb de toda forma, pois se anelam no vetor adenoviral vazio (Figura 7).

Tendo isto em consideração e aproveitando a presença do gene *lacZ* intacto tanto no vetor pAd/CMV/V5-GW/*lacZ* quanto, teoricamente, nos vetores pAd-ERA-*spc*-A e pAd-ERA-*spc*-R, foi realizada a seleção azul e branco com as colônias testadas anteriormente, utilizando uma colônia não transformada e uma colônia transformada somente com o plasmídeo pAd/CMV/V5-GW/*lacZ* como controles negativo e positivo, respectivamente. Entretanto, não houve acúmulo de composto de coloração azul nas colônias testadas, diferentemente do controle positivo. As colônias das placas de transformação, recuperadas anteriormente em placas gradeadas e numeradas, foram repicadas em novas placas contendo IPTG e X-Gal para a seleção. Foram testadas mais de 100 colônias de cada construção, mas nenhuma exibiu coloração azul.

Após consulta no manual Quick & Easy Conditional Knock Out, voltado para a manipulação de grandes vetores, da mesma empresa do kit do *recombineering*,

formulou-se a hipótese de que, devido a regiões repetitivas no vetor adenoviral, este pudesse ter gerado recombinações indesejadas, eliminando parte do plasmídeo, já que o risco era citado no manual supramencionado. Isso explicaria o não funcionamento do gene *lacZ*. Além disso, a possibilidade de integração do gene *spc* no genoma viral em detrimento do plasmídeo adenoviral aumentaria consideravelmente o número de falsos positivos, o que tornaria a etapa de triagem muito mais laboriosa.

Estratégia B: lentivírus

Construção do cassete pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA

Devido aos problemas na montagem do vetor adenoviral, o projeto teve continuidade com o sistema do lentivírus. O cassete ERA-LV foi amplificado com sucesso (Figura 20), utilizando os *primers* 12 e 15 (Tabela 3) e o vetor pUC-ERA como DNA molde, sendo, em seguida, purificado e clonado no vetor pLenti6.3/V5-TOPO®.

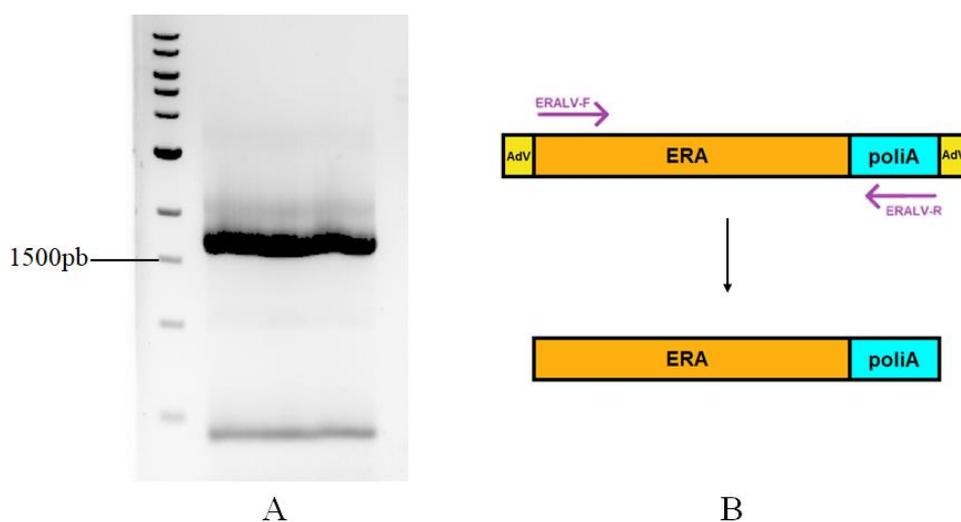


Figura 20. Purificação do produto de PCR para geração do cassete ERA-LV. O tamanho esperado para o cassete é de 1862 pb. Marcador 1kb Ladder (Sinapse) e eletroforese em gel de agarose 0,8%. Representação gráfica dos sítios de anelamento dos *primers* utilizados.

A linhagem Stb13 de *E. coli* foi transformada por choque térmico e foram obtidas poucas colônias. Todas foram analisadas por perfil de restrição após extração de DNA, mas não foi possível observar o padrão, pois o material havia sido degradado (Figura 21a). Posteriormente verificou-se que a linhagem recomendada pelo kit, Stb13, possuía o genótipo *endA+*, de forma que sua endonuclease expressa foi purificada juntamente com o DNA, já que a extração foi feita pelo método de lise alcalina. Na temperatura de 37 °C, em que ocorre a digestão com BglIII, a endonuclease também possui atividade e degrada o DNA. Tentou-se aproveitar o material já extraído com a

adição de fenol-clorofórmio a fim de separar a proteína do material genético, sendo feita, em seguida, uma nova precipitação do DNA (Figura 21b). Ainda que uma parcela maior de DNA tenha sido vista no gel, o padrão não ficou claro e nova extração foi feita, dessa vez aumentando a concentração de EDTA no tampão TE de 1mM para 10 mM e seguindo todo o protocolo de extração com fenol-clorofórmio (Figura 22). Ainda, o tempo de digestão foi reduzido.

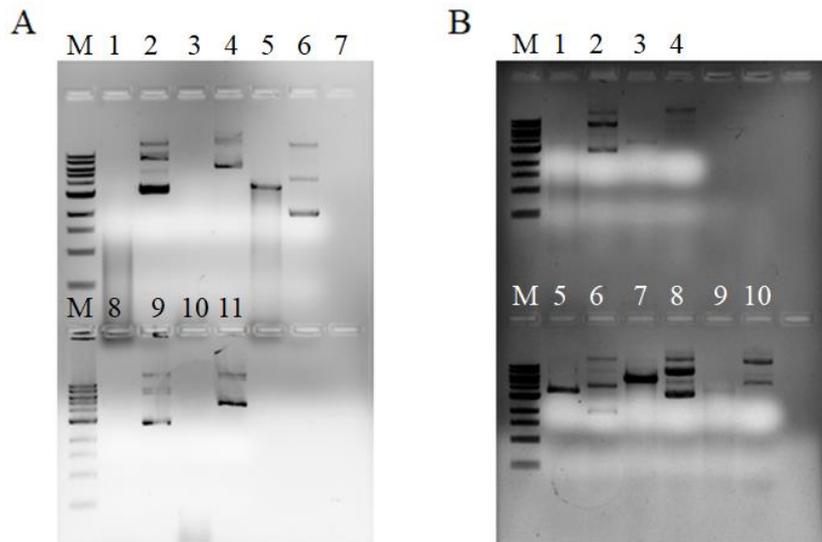


Figura 21. Análise do perfil de restrição de clones transformantes para o vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA. A: DNA extraído em uma miniprep, pelo método de lise alcalina, de cinco colônias escolhidas da placa de transformação com o vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse) e digestões com BglII e respectivos intactos das colônias de 1 a 3 na porção superior do gel e 4 e 5 na porção inferior. É possível observar a degradação do DNA nos poços contendo as digestões. B: Mesmo conteúdo da imagem A após tratamento do DNA com fenol-clorofórmio e nova precipitação. Tempo de digestão reduzido de 4h para 2h. Colônias 1 e 2 na parte superior e 3 a 5 na parte inferior. Eletroforeses em gel de agarose 0,8%.

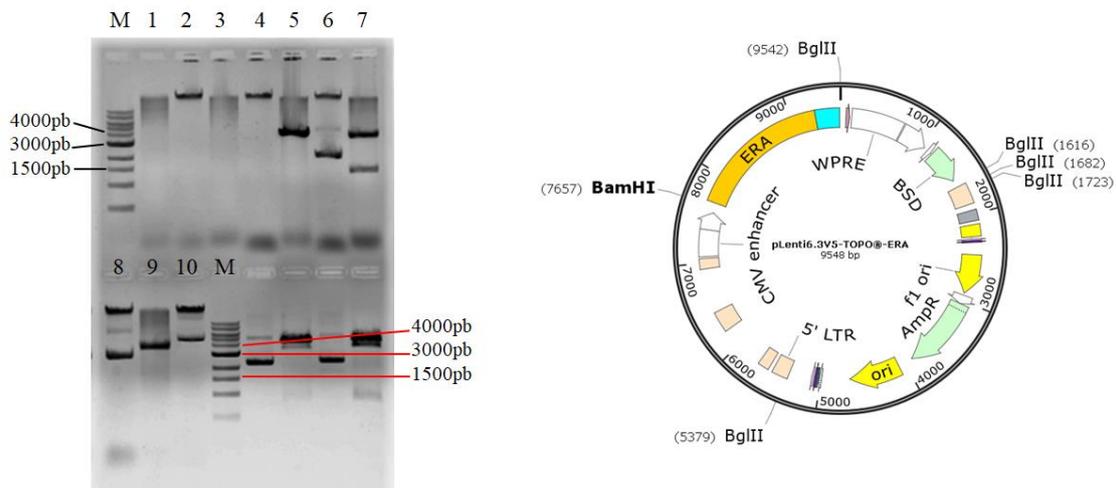


Figura 22. Análise do perfil de restrição de nova miniprep dos cinco clones transformantes para o vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA por extração com fenol-clorofórmio. Digestões

com BglII nos poços ímpares e seus respectivos intactos nos poços pares. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse. Tempo de digestão de 1h30. Eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Mesmo após as modificações, alguns perfis não puderam ser analisados devido à degradação. Decidiu-se fazer nova transformação por choque térmico para a obtenção de novas colônias. Recombinações indesejadas gerando clones aberrantes são esperados segundo o kit. Dessa forma, decidiu-se ainda incluir a digestão com BamHI para linearização da construção, a fim de observar possíveis perdas no vetor. Foi feita nova miniprep seguindo as mesmas modificações feitas anteriormente, com a adição de dupla extração com fenol-clorofórmio e tempo de digestão de 1h30 para 1h. O padrão esperado (Figura 23A) foi encontrado em duas colônias, que tiveram seu material extraído por midiprep utilizando o kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System da Promega, seguindo as instruções referentes a linhagens *endA+*, e nova digestão com BglII e BamHI. Novamente foi confirmado o padrão desejado (Figura 23B). Devido à recomendação, pelo kit, de uso da solução de isopropanol 40% contendo 4,2M de cloridrato de guanidina, foi necessário precipitar o DNA, visto que a razão entre as absorbâncias a 260 e 230nm não estava dentro dos padrões (próximo de 2), considerando que o DNA seria utilizado em transfecção de células de mamífero, que requer um alto grau de pureza. Após a precipitação, a razão passou de 0,99 para 1,68 e 1,27 para 1,93 para as colônias 5A e 2N, respetivamente. O DNA foi mantido a -20°C até o dia da transfecção.

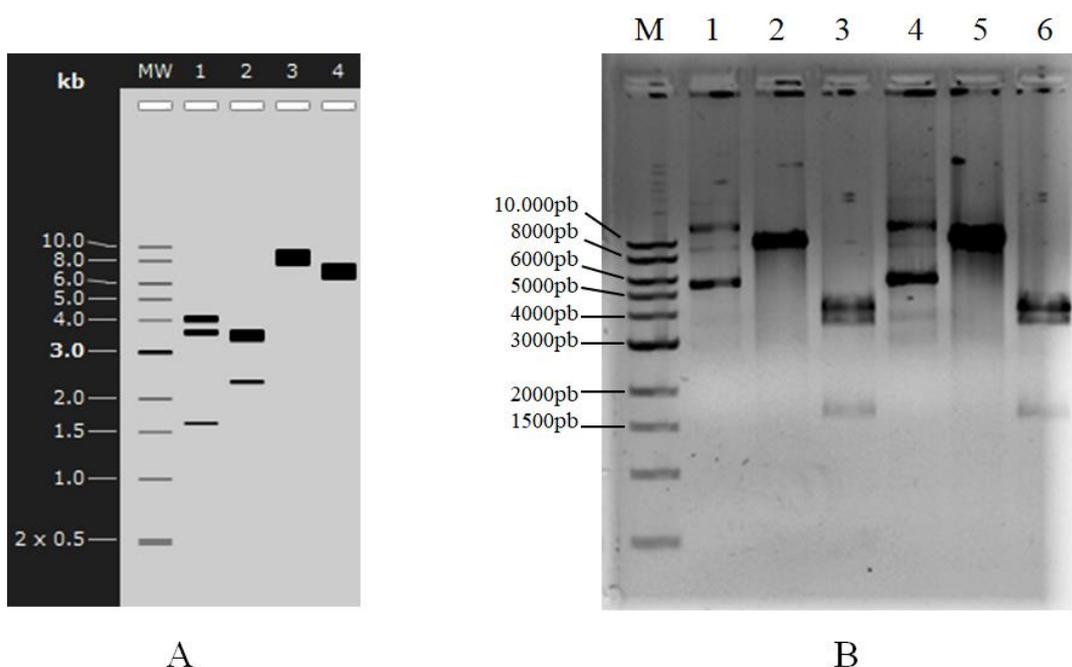


Figura 23. Padrão de digestão da construção pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA com inserções correta e invertida do cassette ERA-LV no vetor pLenti6.3/V5-TOPO® e perfil encontrado

após extração de DNA por midiprep. A: Simulação das inserções correta e incorreta digeridas com BglII, linearização da construção com EcoRV ou BamHI e vetor pLenti6.3/V5-TOPO® linearizado conforme disponibilizado comercialmente nos poços de 1 a 4, respectivamente. **B:** Midiprep das colônias 5A e 2N e suas respectivas digestões com BamHI e BglII. Simulação no programa SnapGene. Marcador 1kb Ladder (Sinapse).

Construção do cassete pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD

Para a montagem do cassete ERA-CBD, foram feitas diversas tentativas de amplificação dos fragmentos 1 e 2 (Figura 9), com mudanças na temperatura, na concentração de enzima e na quantidade de DNA molde (pUC-ERA). Foi-se cogitado que o vetor poderia estar degradado, impedindo a amplificação. Ainda, o uso de DNA molde linearizado facilita a reação. Considerando as modificações anteriores e as duas formas de DNA molde, foi feita nova PCR. As condições em que foi possível observar amplificação são mostradas na Figura 24.

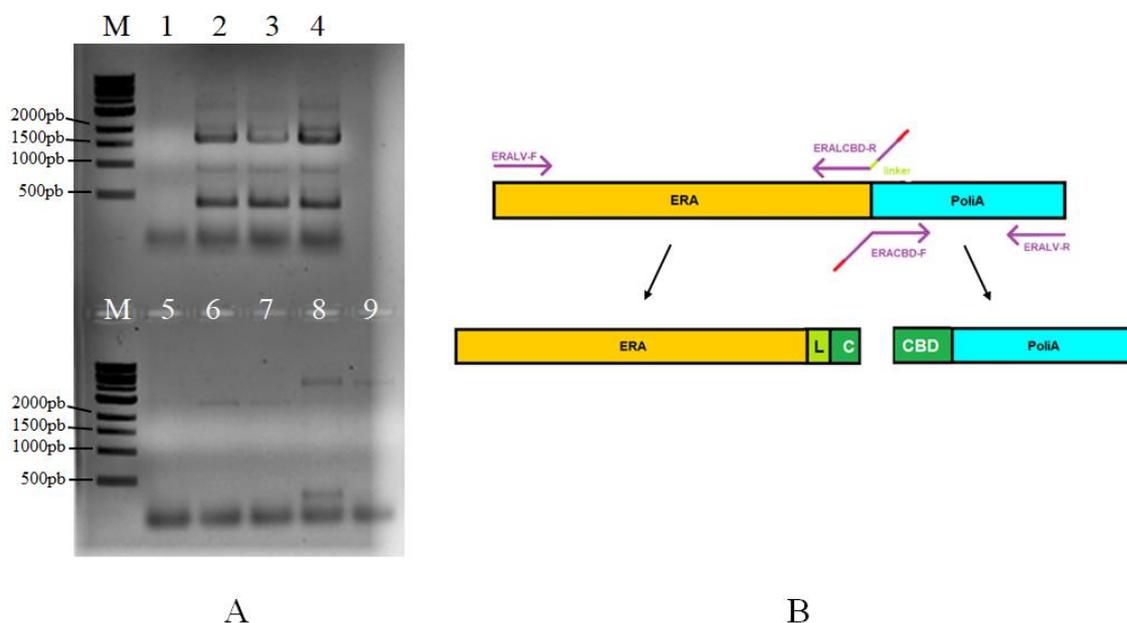


Figura 24. Produtos de PCR para a amplificação dos fragmentos 1 e 2. A: Controle negativo nos poços 1 e 5, produtos de PCR para o fragmento 1 com concentrações de DNA molde (pUC-ERA intacto) de 3, 2 e 5ng nos poços 2, 3 e 5, respectivamente. Produtos para o fragmento 2 com concentração de DNA molde (pUC-ERA intacto) de 2 e 5 ng e de 2 e 1 ng (pUC-ERA linearizado com BglII) nos poços de 6 a 9. Tamanhos esperados para os fragmentos 1 e 2 de 1656 e 369pb, respectivamente. Marcador molecular 1kb Ladder. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. **B:** Representação gráfica dos sítios de anelamento dos *primers* e fragmentos amplificados.

Após a purificação dos fragmentos, foi feita uma *overlap extension PCR* para uni-los. Os primeiros cinco ciclos foram realizados com temperatura de anelamento mais baixa (52 °C) e sem a presença dos *primers* (ERALV-F e ERALV-R) para gerar um fragmento único a partir dos 20 pb de homologia entre os fragmentos. O

termociclador foi pausado e os *primers* foram inseridos em alta concentração, de forma a não modificar significativamente o volume da reação, dando seguimento ao programa estabelecido. Foram testadas duas condições: 100 ng de DNA do fragmento maior, sendo adicionado o fragmento menor em proporção equimolar; e 100ng de DNA total, mantendo a proporção equimolar. É esperado o surgimento de diversas ampliações inespecíficas nesse tipo de PCR.

Nas duas condições, foi possível observar uma banda próxima de 2000 pb (Figura 25A). Para a purificação da banda, foi necessário aumentar o tempo de corrida do gel para melhor visualizá-la, assim como na Figura 25B. A partir do fragmento purificado, foram feitas novas reações de PCR do tipo *overlap-extension* e dos fragmentos 1 e 2 para garantir que a banda excisada era de fato a que continha o fragmento unificado (Figura 26).

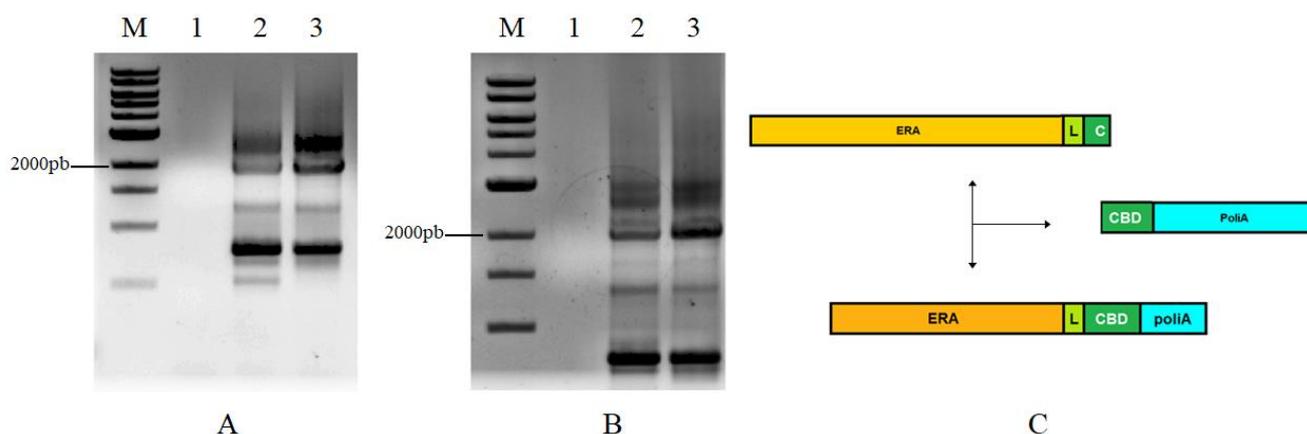


Figura 25. Produtos da *overlap extension* PCR dos fragmentos 1 e 2. Controle negativo da PCR, reação com 100 ng de DNA do fragmento maior e reação com 100 ng de DNA total nos poços de 1 a 3 respectivamente. As figuras A e B indicam diferentes tempos de corrida do mesmo gel. É possível observar uma banda próxima a 2000pb, sendo o tamanho esperado de 2004 pb. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse) e eletroforese em gel de agarose 0,8%. C: Representação gráfica da montagem do cassete ERA-CBD.

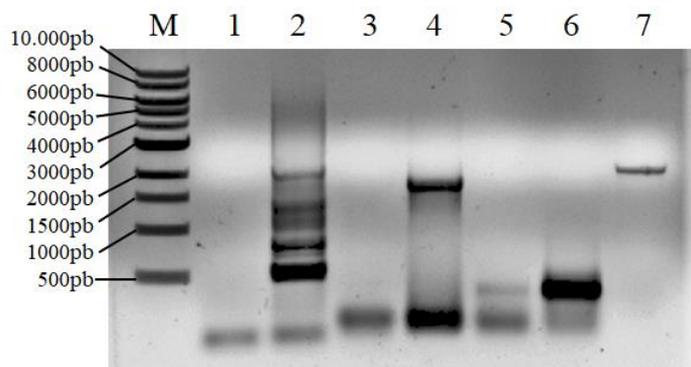


Figura 26. Confirmação da identidade da banda coletada na purificação do produto da *overlap extension* PCR. Controles negativos das reações de PCR nos poços ímpares de 1 a 5.

Reações de PCR do tipo *overlap extension* e dos fragmentos 1 e 2 nos poços pares, respectivamente, e a amostra da banda purificada, utilizada como DNA molde nas reações dos poços 2, 4 e 6. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse) e eletroforese em gel de agarose 0,8%.

Com a confirmação da identidade da banda excisada, foi feita a clonagem no vetor pLenti6.3/V5-TOPO® e transformação da linhagem Stbl3. Doze colônias tiveram seu DNA extraído de maneira semelhante a feita para o vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA e foram analisadas segundo seu perfil de restrição, que é o mesmo do vetor supramencionado (Figura 23), uma vez que a porção do gene relativa ao domínio fusionado à glicoproteína é pequena e não interfere no padrão de digestão.

As duas colônias que apresentaram o perfil desejado tiveram seu DNA extraído novamente em uma midiprep do kit da Promega utilizado anteriormente, seguindo as mesmas instruções para linhagens *endA+*. O DNA de uma das colônias se perdeu ao longo da extração e foi feita nova análise de restrição a partir do DNA extraído da colônia restante para garantir que o padrão (Figura 27) era o desejado (Figura 23). De maneira semelhante ao vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA, foi feita a precipitação do DNA para retirar traços do cloridrato de guanidina. O DNA foi estocado a -20 °C até o dia da transfecção.

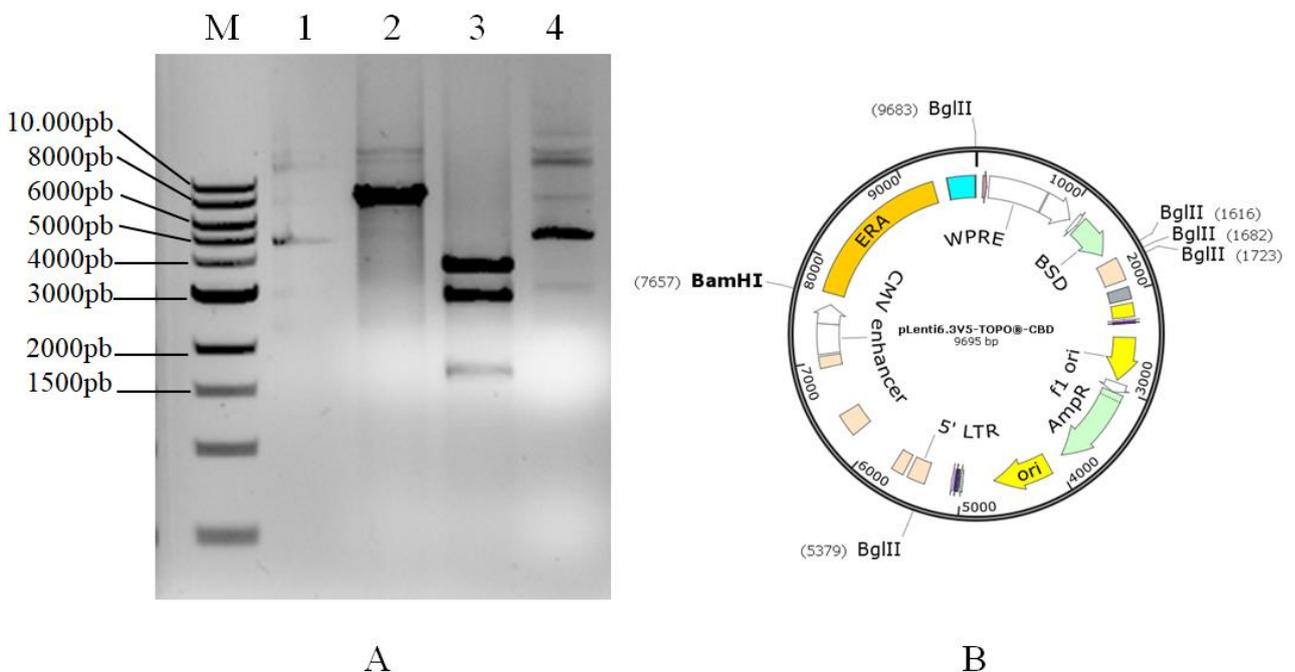


Figura 27. Análise da correta clonagem do vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD em colônia previamente confirmada. A: Midiprep da colônia previamente confirmada e suas respectivas digestões com BamHI e BglII, e novamente a forma intacta nos poços de 1 a 4, respectivamente. Marcador molecular 1kb Ladder (Sinapse). Eletroforese em gel de agarose 0,8%. B: Mapa de restrição do vetor pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD feito no programa SnapGene.

Produção de lentivírus recombinantes

Células HEK 293FT foram retiradas do nitrogênio líquido e cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% e com antibióticos e antimicótico em garrafa T25 a 37°C saturada com 5% de CO₂ (Método 2.17). Foram feitas novas passagens até obter células o suficiente para o ensaio de transfecção, sendo estas inoculadas em uma placa de 12 poços de forma a obter uma confluência de aproximadamente 90% no dia seguinte. Um primeiro ensaio de transfecção levou à morte celular em 24 horas (Figura 28). Percebeu-se que o meio utilizado na transfecção continha antibióticos que, na presença de lipofectamina — lipídio catiônico utilizado na transfecção para aumentar a permeabilidade celular — acumulavam-se nas células, causando um efeito citotóxico e morte. A transfecção foi repetida após algumas passagens e o sobrenadante, que deveria conter o vírus, foi coletado após 48 horas (Figura 29), conforme instruções do kit. O sobrenadante foi centrifugado e aliqotado em criotubos mantidos a -80 °C até o ensaio de transdução.

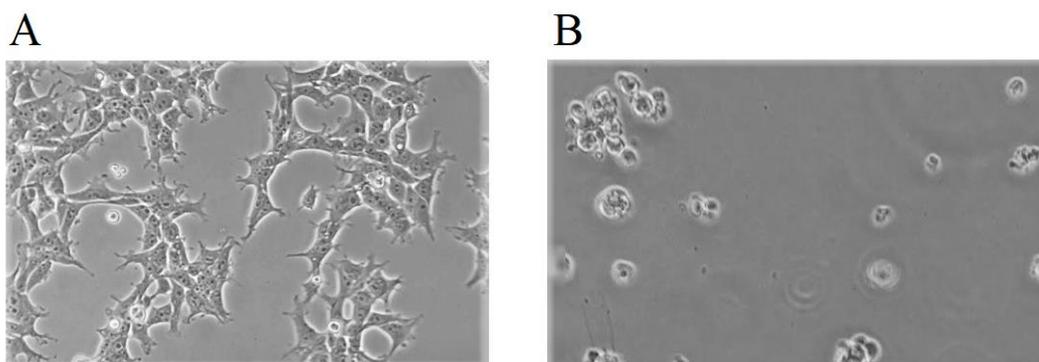


Figura 28. Imagens de microscopia de células HEK 293FT saudáveis (A) e mortas após transfecção em presença de meio DMEM contendo antibióticos (B).

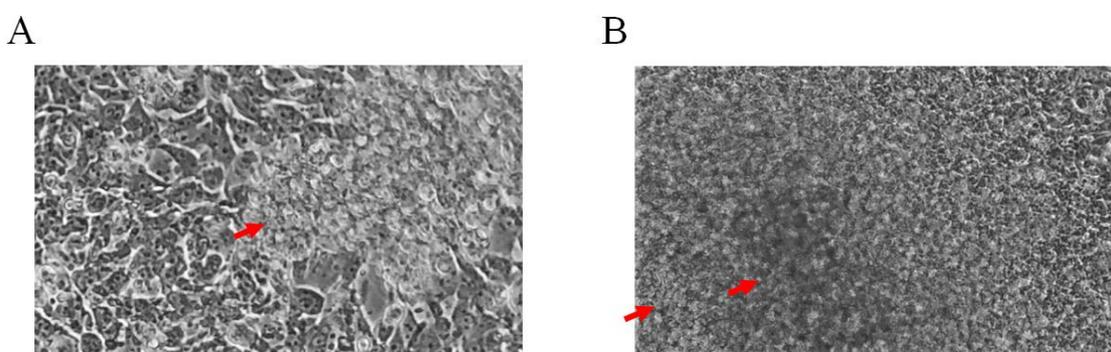


Figura 29. Imagens de microscopia de células HEK293FT 48 horas após a transfecção. Morte (A), sinais de estresse e infecção viral (B) podem ser observados.

Após obtenção de células em quantidade para o ensaio de transdução ou infecção, foi feita nova placa de 12 poços de forma que houvesse cerca de 50% de confluência no dia seguinte. Foram feitas duplicatas para cada construção, com inóculos de 200 e 400 μL de sobrenadante viral, seguindo valores utilizados anteriormente no grupo de pesquisa. No entanto, a adição do sobrenadante levou à morte instantânea das células. Isso pode ser explicado pela presença de sinalização de morte celular no sobrenadante devido ao período de produção do vírus na transfecção e lise das células produtoras.

Optou-se por descartar os protocolos de trabalhos anteriores e seguir apenas as instruções do manual ViraPower™ HiPerform™ Lentiviral Expression Systems. Assim, foi feita nova produção de lentivírus seguindo os passos para usuários iniciantes, em que as células são plaqueadas no dia anterior à transfecção. O sobrenadante foi coletado após 48 horas, centrifugado e filtrado em membrana de 0,45 μm antes de ser aliquoteado e mantido a -80°C . Para poder realizar a titulação viral por seleção em blasticidina, conforme orientado pelo kit, era preciso testar a sensibilidade da linhagem de escolha ao brometo de hexadimetrina (Polybrene), recomendado pelo kit para facilitar a infecção. Além disso, era necessário fazer uma curva com diferentes concentrações do antibiótico para determinar a menor concentração capaz de matar células não infectadas pelo lentivírus.

Deste modo, foram preparadas placas de poliestireno de 6 e 12 poços de modo que estivessem 70% e 50% confluentes no dia seguinte, respectivamente. Para o teste de sensibilidade a Polybrene, foram testadas diluições de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com observação de sinais de estresse por 48 horas. Não foi notada qualquer diferença morfológica nas células submetidas ao teste em relação às células controle durante o período de análise, tornando possível o uso do reagente na titulação. Para a curva de blasticidina, foram testadas concentrações de 0 a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Após duas semanas de seleção, foram contadas as células de amostras de cada um dos poços, com posterior cálculo de viabilidade celular, com o qual foi possível fazer a curva de resistência ao antibiótico, mostrada na Figura 30.

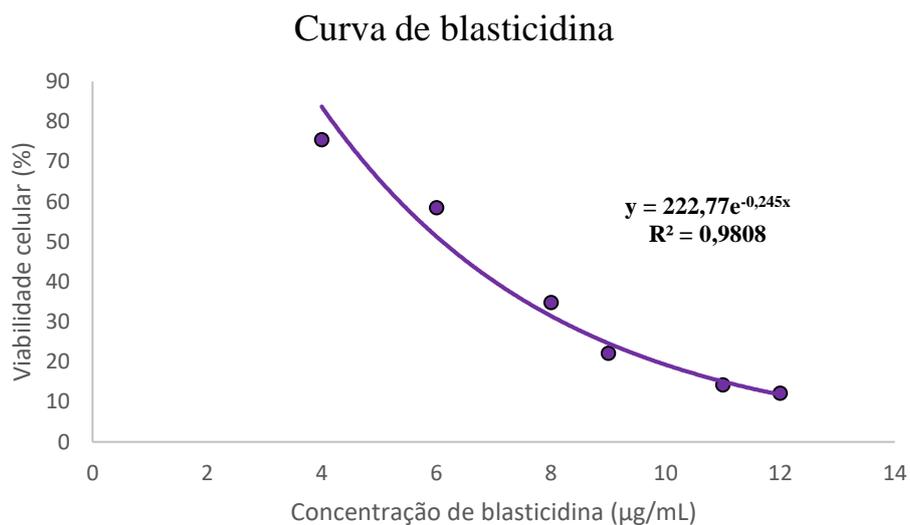


Figura 30. Gráfico da curva de tolerância a blasticidina pela linhagem HEK 293A.

A curva foi refeita, mas, mesmo assim, não foi possível atingir a viabilidade celular nula experimentalmente. Com isso, foi feita uma regressão linear (Figura 31) com os pontos para estimar a concentração de antibiótico necessária para que a taxa de mortalidade fosse de 100%, mesmo que o ponto não estivesse dentro do intervalo da curva.

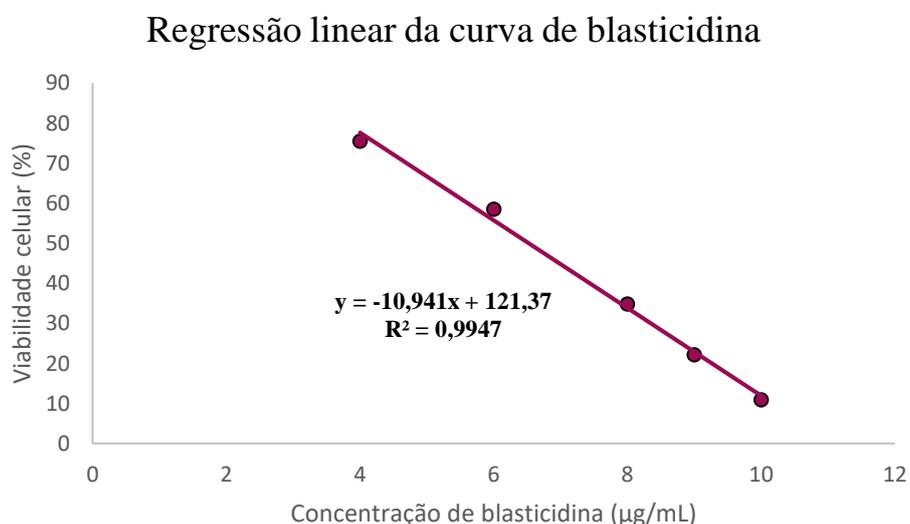


Figura 31. Regressão linear com os valores dos pontos da curva de tolerância a blasticidina pela linhagem HEK293A.

A concentração de blasticidina escolhida para ser utilizada durante a titulação foi de 11µg/mL. Foram feitas, para cada construção e o controle positivo do kit, diluições seriadas do sobrenadante viral de 100 a 100.000 vezes. Após duas semanas de seleção,

as células foram coradas com cristal violeta para a contagem de colônias, mostrada na Figura 32.

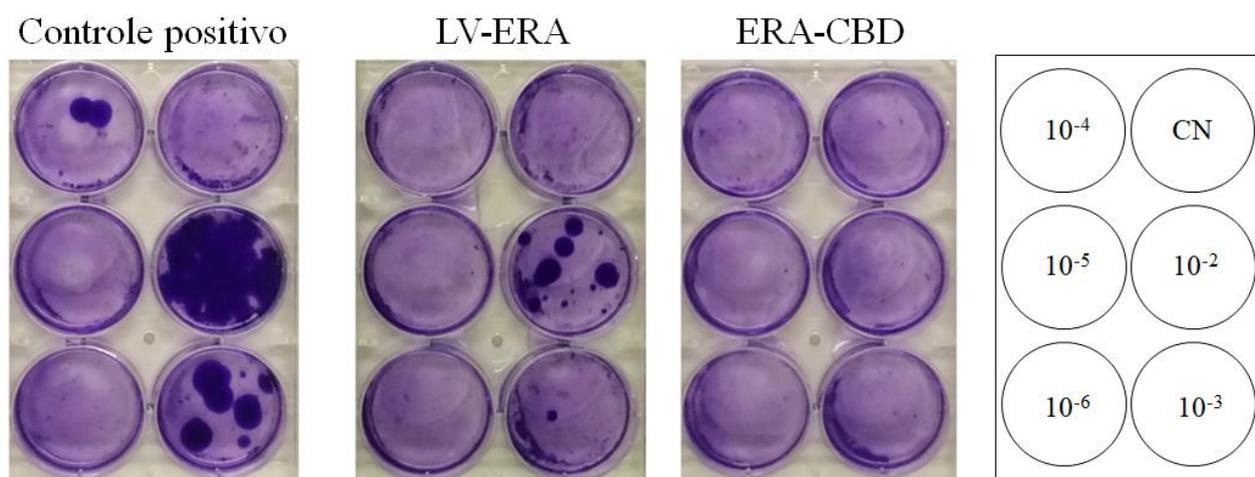


Figura 32. Titulação das construções lentivirais. Placas de poliestireno de 6 poços coradas com cristal violeta para a contagem de colônias após duas semanas de seleção da linhagem HEK 293A em meio com blasticidina. Pode-se observar colônias nas diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para o controle positivo; de 10^{-2} e 10^{-3} para o pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA e em nenhuma diluição para o pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD.

Idealmente, seria possível observar colônias em diluições maiores (10^5 e 10^6). No entanto, mesmo repetindo a transfecção por duas vezes, a titulação não aumentou significativamente, mesmo com o aumento da quantidade de DNA inoculado para $5\mu\text{g}$. Cogitou-se que a lipofectamina utilizada, que estava estocada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, e não a $4\text{ }^\circ\text{C}$ conforme recomendado pelo fabricante, poderia ser a responsável pela baixa eficiência de transfecção. No entanto, deu-se continuidade aos experimentos, plaqueando um número menor de células para poder reproduzir as proporções desejadas para a multiplicidade de infecção (MOI). Foram testadas MOI de 0, 1, 2,5, 5 e 10 para o ERA-LV e de 0, 0,5, 1, 1,5 e 2 para o ERA-CBD, utilizando vírus coletados de uma transfecção posterior para a última construção. As infecções foram feitas em duplicata, sendo uma direcionada para a seleção com blasticidina para o desenvolvimento de linhagens estáveis, que foram posteriormente estocadas em nitrogênio líquido; e a outra direcionada para a análise da expressão da glicoproteína G, com coleta das células e dos sobrenadantes.

Expressão e identificação da proteína recombinante

Em uma primeira análise, foi feita a precipitação dos sobrenadantes de diferentes MOI com ácido tricloroacético (TCA), seguido de gel de SDS-PAGE desnaturante (Figura 33). Após a eletroforese, foi feita a primeira tentativa de *western blotting* utilizando um anticorpo policlonal contra a glicoproteína G conjugado à peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Figura 34).

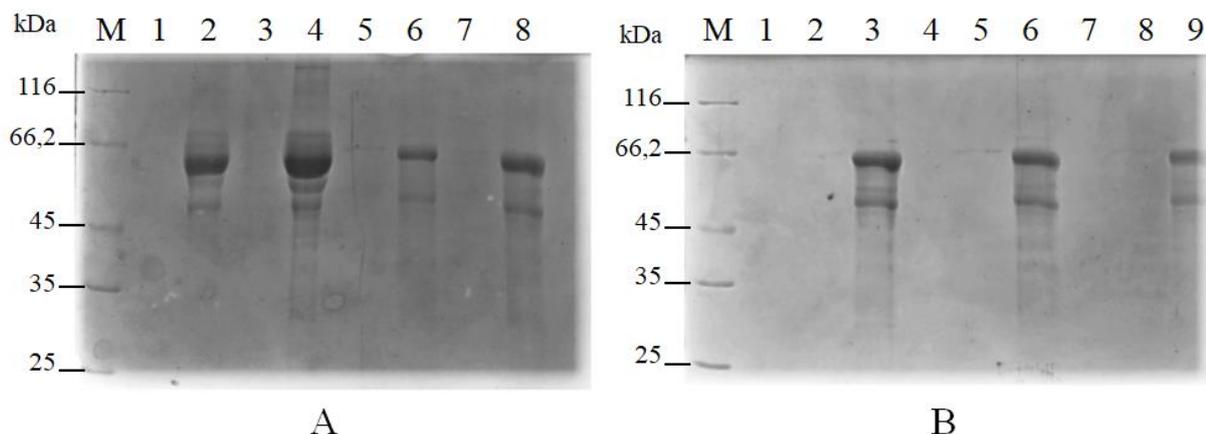


Figura 33. Géis de SDS-PAGE com os sobrenadantes das diferentes multiplicidades de infecção da construção ERA-LV. A: meio de cultura completo, MOI 0, 1 e 2 nos poços 2, 4, 6, 8, respectivamente; **B:** MOI 2,5, 5 e 10 nos poços 3, 6 e 9. Marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific).

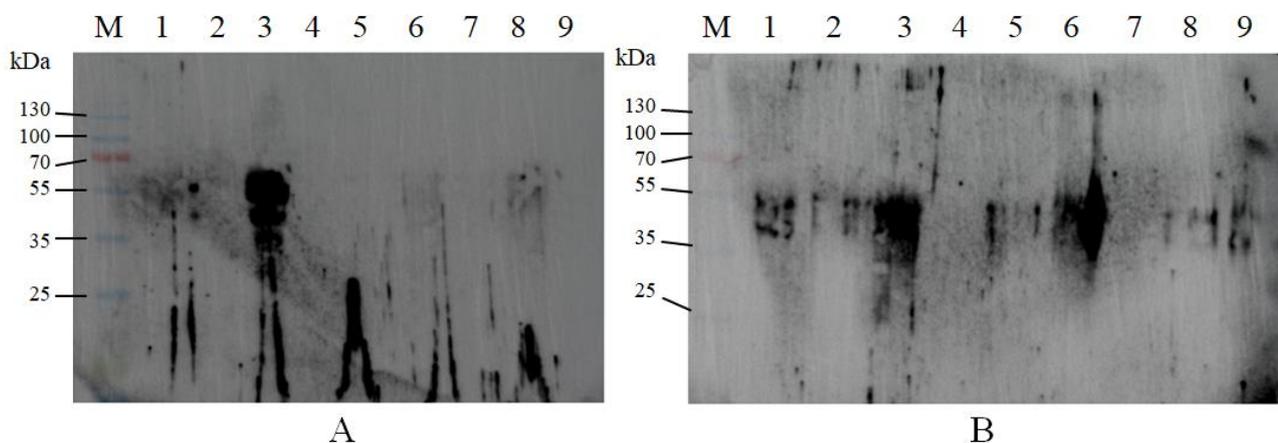


Figura 34. Western blotting com os sobrenadantes de diferentes multiplicidades de infecção da construção ERA-LV. A: meio de cultura completo, MOI 0, 1 e 2 nos poços 1, 3, 6, 8, respectivamente; **B:** MOI 2,5, 5 e 10 nos poços 3, 6 e 9. Marcador Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermo Scientific).

O tamanho esperado para a glicoproteína G é de aproximadamente 65 kDa. Sendo assim, todas amostras, incluindo as de células não infectadas e as do meio de cultura, apresentaram uma banda com aproximadamente o mesmo tamanho esperado. Levando em consideração que muitas proteínas se encontram nessa faixa, foi feito um *western blotting* para confirmar se a banda encontrada nas amostras era ou não da

glicoproteína. Surpreendentemente, a banda da amostra com células não infectadas com lentivírus também acendeu (Figura 34A).

Visando testar diferentes controles, foram feitos novos géis e *westerns*, tanto com a construção ERA-LV quanto com a ERA-CBD, utilizando como amostras de controle soro fetal bovino (FBS), meio DMEM, sobrenadante e extrato intracelular de células não infectadas (293A) e sobrenadante e extrato intracelular de células infectadas com o controle positivo (CP, lentivírus produzido a partir do vetor pLenti6.3/V5-GW/lacZ, disponibilizado pelo kit). Foram escolhidas as amostras de sobrenadante e extrato das construções com o maior MOI, sendo de 10 para o ERA-LV e de 2 para o ERA-CBD, com um poço vazio separando-os dos controles. As análises para o ERA-LV (Figura 35) e para o ERA-CBD (Figura 36) mostraram que os meios de cultura e soro não acenderam, mas tanto a 293A quanto o CP apresentaram um sinal na mesma altura esperada para a proteína. Entretanto, os sinais na Figura 35B, tanto dos controles quanto das amostras, pareceram não corresponder às bandas visíveis nos géis de SDS-PAGE (Figura 35A).

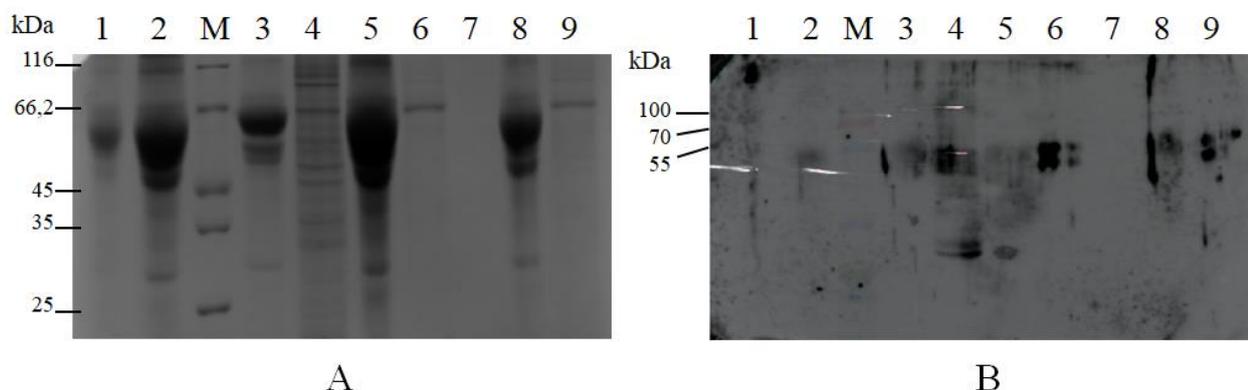


Figura 35. Gel de SDS-PAGE (A) e *western blotting* (B) para análise da produção da glicoproteína G em células infectadas com a construção ERA-LV. Soro fetal bovino e meio DMEM nos poços 1 e 2, sobrenadante e extrato intracelular de células não infectadas (293A) nos poços 3 e 4, infectadas com o controle positivo (CP) (poços 5 e 6) e com a construção ERA-LV nos poços 8 e 9, deixando o poço 7 vazio. Marcadores Pierce™ Unstained Protein MW Marker (A) e PageRuler™ Prestained Protein Ladder (B) da Thermo Scientific.

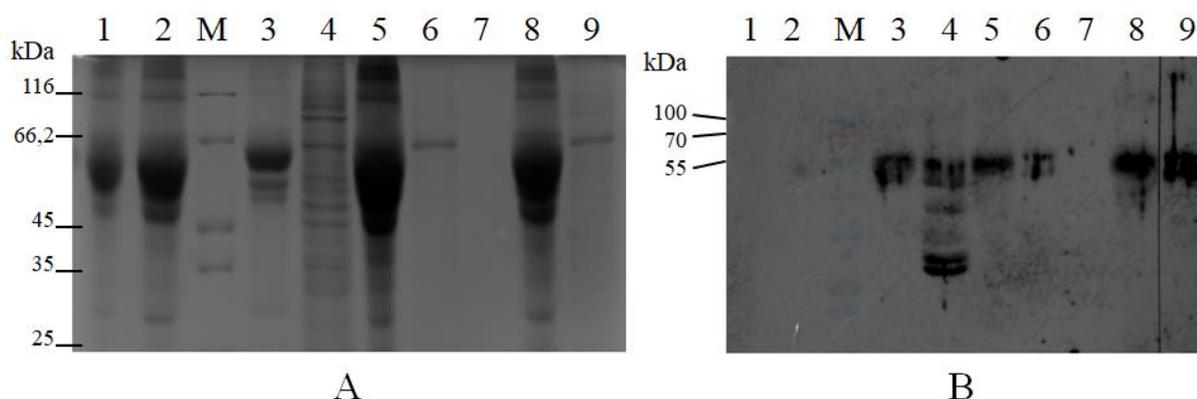


Figura 36. Gel de SDS-PAGE (A) e western blotting (B) para análise da produção da glicoproteína G em células infectadas com a construção ERA-CBD. Soro fetal bovino e meio DMEM nos poços 1 e 2, sobrenadante e extrato intracelular de células não infectadas (293A) nos poços 3 e 4, infectadas com o controle positivo (CP) (poços 5 e 6) e com a construção ERA-LV nos poços 8 e 9, deixando o poço 7 vazio. Marcadores Pierce™ Unstained Protein MW Marker (A) e PageRuler™ Prestained Protein Ladder (B) da Thermo Scientific.

Também foi possível observar que poços com quantidades menores de proteína no extrato intracelular obtiveram sinais tão fortes quanto os dos sobrenadantes. Mesmo assim, cogitando que o excesso de amostra poderia resultar em sinais inespecíficos, foram feitos novos géis e ensaios de *western blot* com limitação de 20 e 10 µg por poço. Mesmo assim, o ruído permaneceu.

Foram testadas modificações no protocolo em relação às amostras (com novas coletas de material por quatro vezes, com mudanças no protocolo de lise celular); aos tampões (PBS-T ou TBS-T); às soluções de bloqueio — a partir de leite em pó desnatado 5% (p/v) ou albumina sérica bovina a 3 ou 5% (p/v) — e aos tempos de incubação (1h, 2h ou durante a noite); às diluições do anticorpo primário conjugado à peroxidase de rábano silvestre (HRP) (de 5000, 10.000, 30.000 e 50.000) e seus tempos de incubação (1h a temperatura ambiente ou 4 °C, ou durante a noite a 4°C para diluições mais altas); e, por fim, à diminuição no tempo de exposição à solução reveladora (120, 90 e 60 segundos). Mesmo assim, os sinais inespecíficos, quer das amostras, quer do ruído, não desapareceram.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Relatos antigos mostram que a raiva acompanha a história do homem. Sua passagem deixa marcas permanentes e seus impactos, quer econômicos, sociais ou ambientais, são verdadeiras tragédias ainda por superar. Esforços globais para a erradicação da raiva por mordidas de cães, através do financiamento de pesquisas em busca de formas de prevenção e tratamento mais viáveis do ponto de vista econômico, logístico e de aderência por parte da população, têm sido o foco dos últimos 20 anos. Este trabalho buscou a transferência de tecnologia na concepção de vacinas recombinantes orais, em voga em países desenvolvidos, para o Brasil, com o intuito de, no futuro, ser a base para a produção de uma vacina de origem nacional.

Complicações na montagem do adenovírus recombinante pelo possível direcionamento da marca de seleção para o genoma bacteriano em detrimento do vetor adenoviral e de recombinações indesejadas no plasmídeo mencionado, causando a perda de suas partes, tornaram a etapa de triagem laboriosa, com a interrupção dos experimentos relacionados a essa estratégia. No entanto, o desenho de novos *primers* para a amplificação da marca de seleção a fim de eliminar regiões de homologia com o gene *pyrF* de *E.coli* poderia reduzir o número de falsos positivos passíveis de análise. Com a construção de novos cassetes de expressão contendo a espectinomicina corrigida, clonagens pela técnica de *recombineering* poderiam ser repetidas. Ainda, clonagens pela técnica de *in Fusion* poderiam ser testadas.

O plasmídeo adenoviral, de grande tamanho, possui um número limitado de enzimas que linearizam o vetor, sendo que nenhuma delas se encontra no sítio de inserção dos cassetes. Entretanto, a utilização de enzimas de restrições com o menor número de sítios possíveis e que cortem na região desejada, poderiam ser utilizadas em processos de digestão parcial, com posterior purificação de fragmentos correspondentes ao tamanho do vetor. Dessa parcela, algumas possibilidades de linearização são possíveis, em número equivalente ao de sítios da enzima. Dentre elas, o corte na região E3 do vírus. A partir disso, reações de clonagem por *in Fusion* poderiam ser realizadas, possibilitando a continuidade dessa estratégia. É o caso da enzima BamHI, que possui 4 sítios de restrição no vetor adenoviral, sendo um deles localizado na região compreendida entre as sequências de homologia com os cassetes construídos.

Estratégia iniciada devido às complicações supramencionadas, a expressão heteróloga da glicoproteína G mediada por lentivírus se mostrou desafiadora na etapa de detecção da proteína, devido à possibilidade de inespecificidade por parte do anticorpo e a sua revelação atrelada a um método por demais sensível. A presença sistemática de sinais nas amostras de células não infectadas e infectadas com lentivírus sem o gene da glicoproteína G poderiam indicar o reconhecimento, por parte do anticorpo, de outras glicoproteínas presentes nas amostras. A deglicosilação de amostras de extrato intracelular e de sobrenadante, com repetição dos géis de SDS-PAGE e *western* poderia verificar essa possibilidade. Ainda, a utilização de novo anticorpo para reconhecimento da glicoproteína, preferencialmente atrelado a outra forma de detecção, como a por ação da fosfatase alcalina, seria desejável.

A comprovação da produção da proteína por qualquer uma das estratégias seria um novo marco no grupo de pesquisas do laboratório, e poderia ser a base de novos projetos visando otimizar as estratégias para a padronização de processos mais adequados ao desenvolvimento de vacinas orais recombinantes. Entretanto, mesmo na ausência dessa comprovação, o trabalho é um dos primeiros relacionados ao uso de células de mamífero como plataforma de expressão dentro do grupo de pesquisa, e o acúmulo de conhecimentos, quer por erros, acertos ou mesmo pelo desenvolvimento de novos protocolos, poderá ser aproveitado em novos projetos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Linhagens celulares

1.1.1. Bactéria

Escherichia coli XL10-GOLD (Stratagene): *Tet^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*

Escherichia coli HST08 Stellar Competent Cells (Clontech EUA): *F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ(lacZYA⁻ argF) UI69, Δ(mrr⁻ hsdRMS⁻ mcrBC), ΔmcrA, λ⁻*

Escherichia coli DH10B (Invitrogen): *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZAM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL(Str^R) nupG*

Escherichia coli One Shot™ Stb13™ (Invitrogen): *F⁻ mcrB mrrhsdS20(rB⁻, mB⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ⁻leumtl-1*

1.1.2. Células de mamífero

HEK 293 FT (Invitrogen): Derivada da linhagem HEK 293F, uma variante de crescimento rápido da linhagem permanente 293 de rim embrionário humano. Transformada com DNA fragmentado do adenovírus sorotipo 5 humano, expressa o gene adenoviral *E1A*, que atua na transativação de certos promotores virais, levando a uma alta expressão proteica (INVITROGEN, 2015). Possui o plasmídeo pCMVSPORT6TAg.neo, que expressa em altos níveis e de forma constitutiva o antígeno T do vírus símio 40, que levou, nesta linhagem, a produção máxima de vírus.

HEK 293A (Invitrogen): Subclone da linhagem permanente 293 de rim embrionário humano, transformada com DNA fragmentado do adenovírus sorotipo 5 humano, expressa os genes adenovirais da região E1 (*E1a* e *E1b*), que atuam na transativação de certos promotores virais, levando a altos níveis de expressão proteica, além de complementar as deleções na região E1 de vetores adenovirais, permitindo a replicação destes nessa linhagem.

1.2. Enzimas

1.2.1. Enzimas de restrição

Enzima	Sítio de clivagem	Tampão	Temperatura de incubação	Procedência	Temperatura de inativação
BglII	A [^] GATCT	3.1	37°C	New England Biolabs	Não há
ClaI	AT [^] CGAT	CutSmart	37°C	New England Biolabs	65°C/20min
EcoRI	G [^] AATTC	2.1	37°C	New England Biolabs	65°C/20min
EcoRV	GAT [^] ATC	3.1	37°C	New England Biolabs	80°C/20min
HindIII	A [^] AGCTT	2.1	37°C	New England Biolabs	80°C/20min
NdeI	CA [^] TATG	3.1	37°C	New England Biolabs	65°C/20min
NotI	GC [^] GGCCGC	3.1	37°C	New England Biolabs	65°C/20min
SlaI	C [^] TCGAG	B3	37°C	Jena Biosciences	65°C/20min
XhoI	C [^] TCGAG	3.1	37°C	New England Biolabs	65°C/20min

1.2.2. Polimerases

Para fins de checagem e orientação de insertos:

Taq DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen)

Taq DNA Polymerase (recombinant) (Thermo Scientific)

Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen)

Para amplificar cassetes de construção:

Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen)

Platinum SuperFi II DNA polymerase (Invitrogen)

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)

1.3. Marcadores moleculares

1.3.1. Marcadores de DNA

1kb Ladder Ready-To-Use M1181 - Sinapse

1.3.2. Marcadores de proteína

Pierce™ Unstained Protein MW Marker - Thermo Scientific

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) - Thermo Scientific

TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa) S2600 - Sinapse

1.4. Kits

ViraPower™ Adenoviral Gateway™ Expression Kit (Invitrogen): Kit da Invitrogen para expressão heteróloga em células de mamífero por meio do adenovírus sorotipo 5 humano.

pLenti6.3/V5-TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen): Um dos kits dos sistemas ViraPower™HiPerform™ Lentiviral Expression da Invitrogen, utilizado para expressão heteróloga estável em células de mamífero por meio de lentívirus, com clonagem TA.

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega): Kit de purificação de fragmentos de PCR e digestões isolados por eletroforese em gel de agarose.

In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit (Takara Bio USA): Clonagem por recombinação homóloga *in vitro* de fragmentos e vetores linearizados.

Quick & Easy *E. coli* Gene Deletion Kit (Gene Bridges): Kit de clonagem por recombinação homóloga em *E. coli* utilizando recombinases virais (*recombineering*), desenhado para modificações no genoma, mas utilizado neste trabalho para modificações em plasmídeos virais.

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen): Kit de purificação de extração de DNA plasmidial bacteriano em baixa escala.

Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega): Kit de purificação de extração de DNA plasmidial bacteriano em média escala.

Protein Assay (Biorad): Para quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.

Optiblot ECL Detect Kit (23pg-187ng) (Abcam): Para revelação de *western blotting* incubado com anticorpos associados à peroxidase de rábano silvestre.

1.5. Oligonucleotídeos (*primers*)

Os *primers* de 1 a 6 da Tabela 1 foram utilizados para a amplificação do gene de resistência a espectinomicina. Os *primers* 1 e 2, desenhados anteriormente no projeto, anelam nos sítios loxP, que flanqueiam o gene *spc*. No entanto, a região 3' dos *primers* era semelhante, de modo que não foi possível amplificar o gene de resistência a espectinomicina. Os *primers* 3 e 4, também desenhados anteriormente pelo grupo de pesquisa, anelam em regiões mais afastadas do loxP e acabaram por adicionar 40pb de homologia com o gene *pyrF* de *E.coli* ao produto de PCR. Os *primers* 5 e 6, desenhados posteriormente, foram planejados de forma a minimizar a homologia com o gene *pyrF*, mas a evitar a região 3' semelhante entre os *primers*, visto que a sequência *loxP* se encontra no mesmo sentido, de forma a ser excisada da construção pela recombinase CreA. Após a inserção do gene *spc* no cassete contendo a glicoproteína G, foram utilizados os *primers* 7 e 8 para substituir as regiões de 50pb de homologia com a região E3 do adenovírus por outras na mesma região, mas mais próximas das deleções feitas pela Invitrogen. O *primer* 8 leva em consideração a inserção do gene *spc* próximo a região de poliadenilação.

Tabela 1. Oligonucleotídeos desenhados para a construção dos cassetes de expressão da glicoproteína G por meio de adenovírus.

Nº	Nome	(pb)	Sequência (5' → 3')
1	Sm5	40	CTGCCATAGCAGATCTATCTTCTTCCC GCATAACTTCGTA
2	Sm3	40	CCCTGCGTCTAGATCTGGACGGAATTCTAATAACTTCGTA
3	Spe5	39	CTGCCATAGCAGATCCAAGGTCTGGTCATGACGTTAACT
4	Spe3	38	CCCTGCGTCTAGATCCTGTAAAGAGGCGTTGATCGCTT
5	ERA_SpecY-F	37	AGGCCCTGCCATAGCAGATCTTCCC GCATAACTTCGT
6	ERA_SpecY-R	58	CGCTGCCCTGCGTCTAGATCATAACTTCGTATAGCATAACATTA TACGAAGTTATATCC
7	ERA-F	82	GGATTTCGTGAGCTTAGAAAACCCTTAGGGTATTAGGCCAAAG GCGCAGCTACTGTGGGGGACATGGTTCCTCAGGCTCTCCT
8	ERA-R	82	GAATCCGGCCGCTGCCCTGCGTCTTTCTAGCAGGCGCTGCTC TGTAATAATTCCGTCCATAGAATAACTTCGTATAGCATAAC

Os *primers* da Tabela 2 foram desenhados para verificar a correta inserção dos cassetes na região E3 do adenovírus. Os *primers* 9 e 10 anelam no adenovírus e geram um produto de PCR de 655pb a partir do vetor vazio; 3549pb a partir da construção pAd-ERA-*spc*-A; e de 3818pb na construção pAd-ERA-*spc*-R. Os *primers* 11, 12 e 13 são internos e se anelam no início do ERA, longo antes do gene *spc* e no final do gene *spc*, respectivamente. Dessa forma, a combinação dos *primers* 9 e 11 gera produtos de PCR somente em plasmídeos onde ocorreu a recombinação, sendo estes de 573 pb (A) e 858 pb (R). De forma semelhante, a combinação dos *primers* 10 e 13 gera produtos de PCR de 710 pb (A) e 694 pb (R), funcionando, no entanto, somente antes da remoção do gene *spc*. Também, antes da remoção, os *primers* 10 e 12 geram produtos de 1857 pb (A) e 1841 pb (R) e, após o uso da recombinase CreA, produtos de 573 pb e 557 pb, respectivamente.

Tabela 2. Oligonucleotídeos para confirmação da correta inserção dos cassetes no genoma adenoviral

Nº	Nome	Tamanho (pb)	Sequência (5' → 3')
9	HAdV5-F	20	TGCAACTGTCCTAACCTTGG
10	HAdV5-R	22	TACTGTCGTAGGTGACTTTGGC
11	ERAint1-R	21	GGTAGTCAGGGTACGGATTGT
12	ERAint2-F	22	CATGGGAATCACACAAGAGTGG
13	Specint-F	24	CATTGATCTGGCTATCTTGCTGAC

Os *primers* de 14 a 17 foram desenhados para amplificar apenas o gene da glicoproteína G com sua região de poliadenilação e contexto Kozak otimizado para

mamíferos, diferindo, em relação aos cassetes anteriores, na ausência de regiões de homologia com o vetor adenoviral e na ausência do gene *spc* como marca de seleção, uma vez que os novos cassetes seriam utilizados em um vetor lentiviral. Como a expressão da glicoproteína G por meio de lentivírus visava produzir a proteína de forma estável, foi proposta, além da construção original, uma construção que levasse à expressão da proteína fusionada a um domínio de ligação a celulose (CBD) na porção C-terminal desta. O domínio escolhido foi o da celobiohidrolase I (CBHI) de *Trichoderma reesei* que, por ser pequeno, pôde ser incluído nos *primers* de forma parcial em dois diferentes fragmentos, com uma porção comum a ambos para posterior geração de um fragmento único pela técnica de *overlapping PCR*. O fragmento 1, gerado pelo *primers* 14 e 15, contém o contexto Kozak, o gene da glicoproteína G fusionado ao *linker* da porção do gene *cbhl* que codifica para o CBD e o início do domínio. O fragmento 2 contém 20pb da porção final do fragmento 1, o restante do gene *cbhl* e a região de poliadenilação. Para o *overlapping PCR*, foram adicionados os *primers* 14 e 17.

Tabela 3. Oligonucleotídeos para a montagem dos cassetes utilizados em vetores lentivirais

Nº	Nome	Tamanho (pb)	Sequência (5' → 3')
14	ERALV-F	19	GACATGGTTCCTCAGGCTC
15	ERALCBD-R	95	GGGCCGCTGTAGCCAATACCGCCGCACTGGCCCCAGTGAGACTGGGTAGGT CCGGGAGAGCTTCCAGTGGTAGTGGCTGGCAGTCTGGTCTCACC
16	ERACBD-F	99	GGTATTGGCTACAGCGGCCCCACGGTCTGCGCCAGCGGCACAACCTTGCCAG GTCCTGAACCCTTACTACTCTCAGTGCCTGTGAGGGGGAGGCTAACTG
17	ERALV-R	20	GCGTCTAGATCTGCTATGGC

1.6. Vetores

Nome	Descrição
pUC-ERA	Plasmídeo sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) contendo o gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva da cepa Evelyn Rokitnicki Abelseth (ERA) flanqueado por sequências de 50pb de homologia com a região E3 do adenovírus e com o contexto Kozak

	otimizado para mamíferos. Contém gene de resistência a ampicilina.
pSPEC-phi	Plasmídeo sintetizado pela empresa Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e modificado em trabalho anterior do grupo de pesquisa, contém o gene <i>spc</i> , que codifica para resistência a espectinomicina, flanqueado por sequências de homologia com o gene <i>pyrF</i> de <i>E. coli</i> .
pUC-ERA-Spec	Plasmídeo resultante da clonagem por in-Fusion do gene <i>spc</i> no plasmídeo pUC-ERA após linearização deste com a enzima <i>Bgl</i> III.
pRed/ET	Plasmídeo do kit da Gene Bridges para a técnica de <i>recombineering</i> . Contém genes que codificam para a expressão de recombinases virais e gene de resistência a tetraciclina. Possui origem de replicação e promotor termossensíveis, além de promotor induzido por L-arabinose.
pAd/CMV/V5-GW/ <i>lacZ</i>	Plasmídeo do kit adenoviral da Invitrogen. Desenhado para ser usado <i>a priori</i> como controle positivo da transfecção, contém o genoma do adenovírus sorotipo 5 humano, com deleções na região E3, ausência dos genes <i>E1a</i> e <i>E1b</i> na região E1 e possui o gene <i>lacZ</i> na região de clonagem pelo sistema Gateway®. Contém gene de resistência a ampicilina.
pLenti6.3/V5-TOPO®	Plasmídeo do kit lentiviral da Invitrogen.

	Inserção do gene desejado por clonagem TA. Contém gene de resistência a ampicilina.
pLenti6.3/V5-GW/ <i>lacZ</i>	Plasmídeo do kit lentiviral da Invitrogen. Usado como controle positivo da transfecção. Contém o gene <i>lacZ</i> .
pLenti6.3/V5-TOPO®-ERA	Plasmídeo resultante da clonagem do gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva no plasmídeo pLenti6.3/V5-TOPO®.
pLenti6.3/V5-TOPO®-CBD	Plasmídeo resultante da clonagem do gene que codifica para a glicoproteína G do vírus da raiva fusionado a porção do gene <i>cbh1</i> que codifica para o domínio de ligação à celulose da enzima celobiohidrolase I de <i>Trichoderma reesei</i> no plasmídeo pLenti6.3/V5-TOPO®.
pLP1, pLP2 e pLP/VSVG	Plasmídeos do kit lentiviral da Invitrogen presentes no mix necessário para a produção da partícula viral. Contém genes de função auxiliar, estruturais e de replicação do vírus <i>in trans</i> . Contém ainda o gene que codifica para a proteína G do vírus da estomatite vesicular como forma de pseudotipagem, possibilitando um leque maior de células passíveis de infecção.
705-Cre	Plasmídeo de baixo número de cópias da empresa Gene Bridges, que deve ser replicado a 30°C. Contém o gene que codifica para a recombinase Cre sob influência de um promotor termossensível, que é reprimido a 30 °C e

	induzido entre 37 e 42 °C, o que resulta na perda do plasmídeo. Contém gene de resistência a cloranfenicol.
pUC19	Plasmídeo utilizado para avaliar eficiência de transformação no preparo de células competentes. Contém gene de resistência a ampicilina.

1.7. Meios de cultura

1.7.1. Meios de cultivo para bactéria

Meio LB (*Luria-Bertani*):

Peptona	1% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1% (p/v)

Reagentes solubilizados em água destilada e pH ajustado para 7,2

Para meio sólido, foi adicionado ágar 2% (p/v)

Quando para seleção branco e azul, foram adicionados 5µL de IPTG 1M e 40 µL de X-Gal 2%.

Meio SOB (Super Optimal Broth):

Triptona	2% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Ajuste de pH para 7,2.

Uma solução estoque de MgCl₂ e MgSO₄ 1 M for preparada e

esterilizada por filtração. O restante foi esterilizado por calor úmido e a adição da solução feita posteriormente.

Meio SOC (Super Optimal Broth com repressão catabólica):

Preparado a partir da adição de uma solução de glicose 2 M, previamente esterilizada por calor úmido, ao meio SOB, de forma que a concentração de glicose passou a ser de 20 mM.

1.7.2. Meios de cultivo para células de mamífero

Meio completo para HEK293A e HEK293FT (Dulbecco modification of Minimum Essential Media)

DMEM (high glucose) (Gibco: 11965092)	90% (v/v)
Soro fetal bovino (FBS)	10% (v/v)
Solução de Aminoácidos Não Essenciais Gibco™ MEM (100X)	0,1 mM
L-Glutamina	6 mM
Piruvato de sódio Gibco™ MEM (100X)	1 mM

Foi feita a adição de 2 mM de L-glutamina, visto que o meio DMEM contém 4 mM de L-Glutamina. A esterilização foi feita por filtração com membrana de 0,22 µm.

Não foram adicionados antibióticos na preparação de meio para descongelamento, transfecção, transdução e congelamento.

Para manutenção da linhagem 293A, foi adicionada uma solução de penicilina-estreptomicina 100 vezes concentrada, de forma a obter 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina na solução final.

Para manutenção da linhagem 293FT, foi adicionada geneticina na concentração de 500 µg/mL.

Para seleção de células pós-transdução, foi adicionada blasticidina na

concentração de 11 µg/mL.

Meio de congelamento

Meio DMEM completo	90% (v/v)
DMSO	10% (v/v)

Solução corante (ensaio de eficiência de transfecção)

K ₄ Fe(CN) ₆	5 mM
K ₃ Fe(CN) ₆	5 mM
MgCl ₂	2 mM
X-Gal (em DMSO)	1 mg/mL
Solução preparada em PBS.	

1.8. Tampões e soluções

1.8.1. Preparo de células termocompetentes

Tampão de Transformação I

RbCl	1,2% (p/v)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,99% (p/v)
Acetato de Potássio	0,03 M
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15% (p/v)
Glicerol	15% (p/v)

Tampão de Transformação II

MOPS	0,02 M
RbCl	1,2% (p/v)
CaCl ₂ ·H ₂ O	1,1% (p/v)
Glicerol	15% (p/v)

1.8.2. Extração de DNA plasmidial (bactéria)

Solução I

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM
Diluídos em água destilada	

Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1% (p/v)
Dissolvidos em água destilada. Solução preparada logo antes do uso.	

Solução III

Acetato de sódio	3 M
Ácido acético	2 M
Ajuste de pH para 5,0. Manter refrigerada.	

1.8.3. Extração de DNA total (bactéria)

Tampão TEN

Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	0,15 M
Diluídos em água destilada	

Clorofil

Solução de clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v)

Clorofane

Solução de fenol equilibrado:clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v)

1.8.4. Análise de DNA em gel de agarose

Tampão Tris-Acetato EDTA (TAE) 50X

Tris-Acetato	2000 mM
EDTA (pH 8,0)	50 mM
Dissolvidos em água destilada.	

Tampão de amostra de DNA

TAE 20X	50% (v/v)
Glicerol 30%	30% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25% (p/v)
Dissolvidos em água destilada.	

Brometo de etídeo

Dissolvido em água destilada na concentração de 10mg/mL.

SYBR Gold

SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen™), que vem concentrado 10000 vezes, foi diluído para 10X em água destilada.

1.8.5. Soluções diversas no cultivo de células de mamífero

Tripsina-EDTA (0,25%) com vermelho de fenol da Gibco (25200)

Tampão fosfato-salino de Dulbecco sem cálcio e sem magnésio da Gibco (14190)

Meio com soro reduzido Opti-MEM™ da Gibco (31985): meio otimizado para transfecção de células

Brometo de hexadimetrina (Polybrene): polímero catiônico utilizado para favorecer a transdução de lentivírus. Foi dissolvido em água destilada e preparado na concentração de 6 mg/mL. Esterilização por filtração em membrana de 0,22 µm. As alíquotas foram estocadas a -20 °C e a solução de trabalho a 4 °C. Esta foi descartada após 2 semanas.

1.8.6. Análise de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Tampão RIPA: utilizado como tampão de lise de células de mamífero no preparo de extrato intracelular.

Triton X-100	1% (v/v)
Desoxicolato de sódio	0,5% (p/v)
SDS	0,1% (p/v)
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

A solução estoque de desoxicolato de sódio 10% (p/v) foi preparada e mantida longe da luz. O tampão foi preparado logo antes do uso, resfriado no gelo. A ele foi adicionado o inibidor de protease PMSF na concentração final de 1 mM.

Tampão de corrida

Trizma base	125mM
Glicina	0,96M
SDS	0,1%

Tampão de amostra (5X)

Tris-HCl 1M pH 6,8	500 mM
SDS	10% (v/v)

β -Mercaptoetanol	10% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)

Gel separador (12%)

Água destilada	3,63 mL
Acrilamida : Bisacrilamida (29:1)	2,5 mL
Tris HCl 3M (pH 8,8)	0,94 mL
SDS 10% (p/v)	75 μ L
TEMED	8 μ L
APS 10% (p/v)	56,25 μ L

Gel concentrador (4%)

Água destilada	2,75 mL
Acrilamida : Bisacrilamida (29:1)	0,625 mL
Tris HCl 0,5M (pH 6,8)	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	50 μ L
TEMED	4 μ L
APS 10% (p/v)	37,5 μ L

Solução corante de Comassie

Comassie Brilliant Blue G-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acético	7% (v/v)

Solução descorante

Metanol	30% (v/v)
Ácido acético	7% (v/v)

1.8.7. Deglicosilação de proteínas em condições desnaturantes

Tampão fosfato de sódio

NaH₂PO₄ 10 mM

Na₂HPO₄·4H₂O 50 mM

O pH foi ajustado para 7,5 com NaH₂PO₄.

Solução desnaturante

SDS 0,2% (p/v)

β-Mercaptoetanol 100 mM

1.8.8. Transferência e Western Blotting

Membrana de transferência de PVDF Immobilon®-P (Merck)

Membrana cortada segundo as dimensões do gel (cerca de 7 x 8,5 cm) e ativada por 40 segundos em metanol 100%, seguido de água destilada por 5 minutos.

Tampão de transferência

Trizma base 25mM

Glicina 190mM

Metanol 20% (v/v)

SDS 0,1% (p/v)

TBS (10x)

Trizma base 200mM

NaCl 1,5 M

Para o preparo da solução TBS-T, a solução estoque foi diluída em água destilada e adicionou-se Tween 20 na concentração final de 0,1% (v/v).

PBS (1X)

NaCl	136,90 mM
Na ₂ HPO ₄	8,09 mM
NaH ₂ PO ₄	1,76 mM
KCl	2,69 mM

Para o preparo da solução PBS-T, adicionou-se Tween 20 na concentração final de 0,1% (v/v)

Soluções de bloqueio

Leite em pó desnatado da marca Molico a 5% (p/v) em TBS-T ou PBS-T.

Albumina sérica bovina (BSA) a 3% (p/v) em TBS-T ou PBS-T.

Soluções de incubação com anticorpo

Os anticorpos foram diluídos em diferentes concentrações nas próprias soluções de bloqueio, TBS-T ou PBS-T, a depender do protocolo utilizado.

Tampão APB (Alkaline Phosphatase Buffer)

Trizma base	100 mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	5 mM

1.8.9. Antibióticos

Todos os antibióticos foram filtrados com membrana de 0,22 µm.

Ampicilina (1000X): 100 mg/mL, dissolvida em água destilada.

Espectinomomicina (1000X): 50mg/mL, dissolvida em água destilada.

Tetraciclina (1000X): 3mg/mL, dissolvida em etanol 75%.

Canamicina (1000x): 50mg/mL, dissolvida em água destilada.

Blasticidina: 5mg/mL, dissolvida em água.

Penicilina-Estreptomicina (100X): solução da Gibco, com 1000 unidades/mL de penicilina e 1mg/mL de estreptomicina.

Todos os antibióticos foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm.

1.9. Anticorpos

Nome	Empresa	Tipo	Origem	Alvo
ab193430	Abcam	Primário conjugado com HRP	Coelho	Aminoácidos 20 a 459 da glicoproteína do vírus da raiva
MCA2828	Bio-Rad	Primário	Camundongo	Glicoproteína do vírus da raiva
Não identificado		Secundário conjugado com fosfatase alcalina		IgG de camundongo

2. Métodos

Os métodos abaixo descritos foram adaptados do livro “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) quando não especificados.

2.1. Cultivo de microrganismos

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C e em meio LB líquido ou sólido, quando não especificado de outra forma por algum protocolo. Da mesma maneira, quando em meio líquido, as bactérias foram incubadas sob agitação de 200 rpm.

2.2. Preparo de células bacterianas competentes por choque térmico

Uma colônia, selecionada e isolada da linhagem escolhida, foi crescida em 10 mL de meio SOB a 37 °C e 200 rpm por cerca de 16 h. Posteriormente, 1mL da cultura foi adicionado a um inóculo de 100 mL de meio SOB em frasco de 500mL. O frasco foi incubado em condições semelhantes até a OD₆₀₀= 0,3, sendo resfriado rapidamente em banho de gelo, etanol e NaCl. A cultura foi centrifugada a 3000 g por 5 minutos a 4 °C, tendo, então, o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 32 mL de

tampão de transformação I e incubadas no gelo por 15 minutos e posteriormente recuperadas por nova centrifugação nas mesmas condições. As células foram ressuspendidas em 4 mL de tampão de transformação II e aliquotadas em tubos do tipo Eppendorf, com 100 µL da ressuspensão. Os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo seco com etanol e estocados a -80 °C até o uso.

2.3. Transformação bacteriana por choque térmico

Tubos de células termocompetentes preparadas anteriormente foram descongelados em gelo por 5 minutos em número proporcional ao de transformações a serem feitas. Em seguida, adicionou-se a eles o DNA a ser transformado, em quantidade variável, a depender do protocolo, com incubação posterior de 30 minutos no gelo. Em seguida, os tubos foram transferidos para o banho seco a 42°C por 90 segundos e devolvidos ao gelo. Rapidamente, adicionou-se 1 mL de meio LB a cada um dos tubos, que foram incubados em seguida em banho a 37 °C por 1 h. Por fim, as culturas foram adicionadas a placas de meio LB sólido contendo os antibióticos respectivos para seleção e espalhadas com o auxílio de pequenas esferas de vidro. As esferas foram descartadas em frasco contendo etanol 70% e as placas de Petri transferidas para estufa de 37 °C por cerca de 18 h.

2.4. Preparação de DNA plasmidial em baixa escala (Miniprep)

Para a extração de DNA plasmidial, utilizou-se uma versão modificada do protocolo descrito no livro *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Uma colônia selecionada e isolada foi crescida em 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos necessários para manutenção da seleção a 37 °C e 200 rpm por cerca de 18 h. Em seguida, 3 mL da cultura foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf e centrifugados a 3000 g por 2 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 200 µL de tampão TE. Em seguida, foi preparada a solução II e adicionados 360µL a cada um dos tubos, com mistura do conteúdo por inversão. Após incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 300 µL de solução III refrigerada. Após mistura do conteúdo dos tubos por inversão, estes foram incubados no gelo por 5 minutos. Em seguida, foram centrifugados a 10000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a ele adicionou-se 750µL de isopropanol. Após a mistura do conteúdo por inversão, foi feita nova centrifugação nas mesmas condições e o descarte do sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 200 µL de tampão TE, seguido de 110 µL de acetato de amônio 7,5 M e mistura por inversão. Foi

feita uma centrifugação a 10000 g por 10 minutos e recuperação do sobrenadante. A ele, adicionou-se 750 µL de etanol 100% refrigerado, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições, mas a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 750 µL de etanol 70% refrigerado. Após nova centrifugação, foi feita a secagem do precipitado por incubação a temperatura ambiente. Este foi então ressuscitado em 50 µL de água destilada contendo RNase A (20 µg/mL).

Para linhagens *endA+*, após a precipitação do DNA com isopropanol e posterior centrifugação, conforme anteriormente descrito, ressuscitou-se o precipitado em 200 µL de TE e adicionou-se, em seguida, 200 µL de solução de fenol e clorofórmio (1:1, v/v). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado por vortexação durante 1 minuto, seguido de centrifugação a 6000 rpm por 3 minutos. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e, a ele, adicionou-se 500 µL de etanol 100% refrigerado. Após mistura por inversão e nova centrifugação a 10000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70% refrigerado. Após a secagem do precipitado, este foi ressuscitado em 30µL de água destilada contendo RNase A (20 µg/mL).

Quando a preparação foi feita utilizando kits, seguiu-se as instruções do fabricante.

Para a preparação do vetor adenoviral, utilizou-se 10 mL de cultura para a extração.

2.5. Digestão

Para a digestão de DNA com enzimas de restrição, foram seguidas as instruções do fabricante, mantendo a concentração de enzima abaixo de 10% do volume final e proporcional à quantidade de DNA. Para digestões completas, a incubação foi de 4 horas.

Para digestões parciais, diluiu-se a enzima 10 vezes no tampão recomendado pelo fabricante. Dessa diluição, foi utilizado o volume originalmente recomendado para a enzima não diluída. A incubação, nesse caso, foi de 10 minutos, seguido de inativação da enzima conforme instruções do fabricante.

2.6. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

Foram montados géis de agarose 0,8% (p/v) de tamanhos variados, a depender da quantidade de amostras. Após a aferição da quantidade de agarose necessária, adicionou-se tampão TAE 1X conforme o volume recomendado para o tamanho do gel

desejado. Em seguida, a solução foi esquentada até a completa solubilização da agarose e posteriormente resfriada, com adição de brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL. As amostras a serem analisadas foram misturadas em tampão de amostra e aplicadas no gel. Este foi imerso em tampão TAE 1X e submetido a corrente de 65V até a separação adequada das bandas do marcador de DNA escolhido.

Para géis de purificação de bandas de DNA, o gel foi preparado sem a adição de brometo de etídeo e, às amostras, adicionou-se o intercalante de DNA SYBR Gold 10X de forma a ajustar sua concentração para 1X.

2.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para reações de PCR convencionais, o preparo destas e o cálculo da T_m foram feitos seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade de DNA molde plasmidial e genômico utilizados foi inferior a 10 ng e 100 ng, respectivamente.

Para PCR de colônia, as reações feitas foram de 25 µL. No lugar do DNA molde, coletou-se, com um palito de bambu estéril, uma amostra da colônia desejada, sendo este lavado diretamente nos tubos de PCR. De maneira alternativa, foram preparadas reações de 25 µL de PCR, com 5 µL destinados ao DNA molde. Em 500 µL de água destilada estéril, diluiu-se uma amostra da colônia desejada e, desta mistura, completaram-se os 5 µL na reação de PCR.

Para a PCR de sobreposição (*overlapping PCR*), foram preparadas reações de 50 µL, sem a adição de *primers*. Para o DNA molde, foram testadas duas variações: 100ng do DNA cujo fragmento é o maior, adicionando-se o segundo fragmento em quantidade necessária para proporção molar de 1:1; e adicionando-se 100 ng de DNA no total, respeitando a proporção molar de 1:1. Os primeiros 5 ciclos foram feitos na ausência dos *primers*, com temperatura de anelamento mais baixa do que o recomendado (52°C). Em seguida, o programa do termociclador foi pausado e foram adicionados os *primers* na concentração final de 0,5 µM, com diluição de ambos em uma mesma solução, de tal forma que houvesse pouca variação no volume final (0,2 µL). Em seguida, deu-se continuidade ao programa, com mais 30 ciclos com temperatura de anelamento de 61°C.

2.8. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Após submeter o gel de agarose 0,8% (p/v) a uma corrente de 65V até a separação adequada das bandas do marcador escolhido, foi feita a revelação do gel com luz ultravioleta, caso o gel tenha sido preparado com brometo, conforme descrito na seção

2.6 de Métodos; e com luz de LED, caso tenha sido preparado sem brometo. As bandas desejadas foram cortadas com o auxílio de um bisturi e adicionadas, cada uma, a um tubo do tipo Eppendorf previamente pesado. Após a adição, foi aferido o novo peso, para o cálculo do peso das bandas a serem purificadas. Depois, seguiu-se as instruções do fabricante quanto ao uso do kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”. Por fim, o DNA isolado foi quantificado e estocado a -20 °C.

2.9. Clonagem independente de ligação (Tecnologia In-Fusion)

Para a clonagem feita pela técnica de In-Fusion, seguiu-se as instruções da Takara para a utilização do kit de clonagem In-Fusion® HD EcoDry™. Para a clonagem do gene *spc* no vetor pUC-ERA, utilizou-se 59,2ng do inserto e 100 ng do vetor.

2.10. Preparo de células bacterianas competentes por eletroporação

Uma colônia selecionada e isolada da linhagem escolhida foi crescida em 10 mL de meio SOB a 37 °C e 200 rpm por cerca de 16 h. Posteriormente, 1 mL da cultura foi adicionado a um inóculo de 100 mL de meio SOB em frasco de 500 mL. O frasco foi incubado em condições semelhantes até atingir a OD₆₀₀ entre 0,7 e 0,9, sendo resfriado rapidamente em banho de gelo, etanol e NaCl. A cultura foi centrifugada a 3000g por 20 minutos a 4 °C, tendo, então, o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com 50 mL de glicerol 10% resfriado e centrifugadas nas mesmas condições por duas vezes. Após o descarte do sobrenadante na segunda lavagem, as células foram ressuspensas no líquido residual e aliqüotadas em tubos do tipo Eppendorf, com 100 µL da ressuspensão. Os tubos foram resfriados rapidamente em banho de gelo seco com etanol e estocados a -80 °C até o uso.

2.11. Transformação bacteriana por eletroporação

Para a transformação por eletroporação, os materiais manipulados foram resfriados previamente e cada transformação foi feita somente após o término da primeira. Um tubo de células electrocompetentes preparadas anteriormente foi incubado em gelo picado por 5 minutos, seguido da adição do DNA a ser transformado, em quantidade variável, a depender do protocolo. O conteúdo do tubo foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta e transferido para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm de largura previamente resfriada. Ajustou-se os parâmetros de aparelho de eletroporação para 2,5 kV, 200 Ω e 25 µF e deu-se o choque. Em seguida, adicionou-se rapidamente 1mL de meio LB à cubeta, ressuspendendo gentilmente as células. A mistura foi transferida para um novo tubo do tipo Eppendorf, que foi incubado a 37 °C por 1 h. Por

fim, a cultura foi adicionada às placas de meio LB sólido contendo os antibióticos respectivos para seleção e espalhada com o auxílio de pequenas esferas de vidro. As esferas foram descartadas em frasco contendo etanol 70% e as placas de Petri transferidas para estufa de 37 °C por cerca de 18 h.

2.12. Recombinação homóloga mediada por recombinases virais (*Recombineering*)

Células da linhagem DH10B foram transformadas com o vetor pRED/ET por eletroporação, plaqueadas a 30 °C e selecionadas por tetraciclina. Foi selecionada uma colônia isolada para cultivo em 10 mL de meio LB contendo tetraciclina a 30 °C e 200 rpm por 18 h. Em seguida, preparou-se 2 frascos de 250 mL com 25 mL de meio LB, aos quais foram adicionados 250 µL da cultura, cada. Os frascos foram incubados a 30°C e 200 rpm por cerca de 3 h, até atingirem a OD₆₀₀ de 0,3. Posteriormente, adicionou-se uma solução estéril de L-arabinose a um dos frascos, para indução, de forma que a concentração final fosse de 0,4%. Então, os dois frascos foram incubados a 37 °C e 200 rpm por 1h e seu conteúdo centrifugado a 10000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 25 mL de glicerol 10% refrigerado por 2 vezes. Por fim, após o descarte do sobrenadante da segunda lavagem, as células foram ressuspensas no meio residual e aliqüotadas em tubos do tipo Eppendorf em 100 µL cada. Para cada construção, foram utilizados 2 tubos, um com células induzidas por L-arabinose e outro não. Para o controle negativo, não foi adicionado DNA. Para o controle positivo, adicionou-se 1 µL do produto de PCR FRT-PGK-gb2-neo-FRT (Tubo 4 fornecido no *E. coli* Gene Deletion Kit). Para as construções, foram adicionados 300 ng do plasmídeo pAd/CMV/V5-GW/*lacZ* e 130 ng de cada cassete. Foi feita a transformação por eletroporação com os parâmetros descritos na seção anterior e as células foram recuperadas a 37 °C por 4 horas em meio LB. Por fim, as células dos controles negativo, positivo e das construções ERA-*spc*-A e ERA-*spc*-R, com e sem indução, foram adicionadas em placas sem antibiótico; com canamicina; e com ampicilina + espectinomicina, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por cerca de 18 h.

2.13. Extração de DNA total de bactéria

Para a extração de DNA total, utilizou-se uma versão modificada do protocolo descrito por MARMUR. Para realizar a triagem das construções após o *recombineering*, cinco colônias foram crescidas, cada uma, em 5mL de meio LB líquido contendo os

antibióticos necessários para manutenção da seleção a 37 °C e 200 rpm por cerca de 15 h. Em seguida, 3 mL da cultura foram transferidos para tubos do tipo Eppendorf e centrifugados a 3000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 1mL de tampão TEN, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. Então ressuspendeu-se as células em 500 µL de tampão TEN, além de 75,2 µL de lisozima (20mg/mL), com posterior incubação a 37 °C por 16 minutos. Em seguida, adicionou-se 4 µL de RNase A (4mg/mL) com nova incubação a 37 °C por 15 minutos. A seguir, adicionou-se 20 µL de solução de SDS 20% (p/v) e 5 µL de solução de proteinase K, cuja concentração é de 10mg/mL, seguido de uma incubação a 65 °C por 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de fenol, que foi homogeneizado com o restante a mistura por 2 minutos, seguido de centrifugação de 2000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi então transferida para novo tubo onde a ela acrescentou-se 500µL de clorofil, com o qual o último passo foi repetido. Após nova transferência da fase aquosa para outro tubo, acidionou-se acetato de sódio de forma que sua concentração final fosse de 0,3 M, e etanol 100% gelado na proporção de 2,5 volumes. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e depois ressuspendido em 300 µL de água destilada.

2.14. Clonagem por extremidades coesivas do tipo TA

Foram seguidas as instruções do fabricante quanto ao kit de clonagem do tipo TA “pLenti6.3/V5-TOPO®”, que integra o sistema de expressão heteróloga por meio de lentivírus “ViraPower™HiPerform™” da mesma empresa.

2.15. Precipitação de DNA

A fim de remover traços de impureza (endonuclease I, cloridrato de guanidina), adicionou-se acetato de sódio ao DNA a ser precipitado, de forma que a concentração final do acetato fosse de 0,3 M. Além disso, foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100% refrigerado. Após a mistura do conteúdo por inversão do tubo, este foi incubado a -20 °C durante a noite. No dia seguinte, o tubo foi centrifugado a 10000 g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições. Por fim, o precipitado foi seco por incubação à temperatura ambiente até que o álcool residual evaporasse e ressuspendido em água destilada.

2.16. Preparação de DNA plasmidial em média escala (Midiprep)

Após a devida confirmação das construções lentivirais via análise de DNA por eletroforese em gel de agarose das digestões com BamHI e BglII, colônias selecionadas e isoladas foram cultivadas em 5mL de meio LB contendo ampicilina por 18 h a 37 °C e 200 rpm. Em seguida, 1 mL da cultura foi transferido para um frasco de 500 mL do tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB com ampicilina. O frasco foi incubado nas mesmas condições por mais 18 h e, por fim, seguiu-se as recomendações do fabricante quanto ao kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Por se tratar de uma linhagem *endA+*, seguiu-se a recomendação do kit de lavagem do DNA na coluna com solução de isopropanol 40% (v/v) contendo 4,2 M de cloridrato de guanidina.

2.17. Descongelamento de células de mamífero

O criotubo contendo a linhagem escolhida foi retirado do nitrogênio líquido e descongelado em banho de gelo picado. O conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL e a ele foram adicionados, gota a gota, 5 mL de meio DMEM completo sem antibiótico. O tubo foi centrifugado a 300 g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio DMEM completo e transferidas para uma garrafa T25, que foi incubada a 37 °C saturada em 5% de CO₂.

2.18. Manutenção e propagação de células de mamífero

As linhagens 293 A e 293 FT foram cultivadas em meio DMEM completo sem e com a adição de geneticina, respectivamente, em garrafas de poliestireno estéreis de 25 cm² (T25) e 75 cm² (T75) de área para propagação celular. Com a ocupação de cerca de 90% da área de cultivo (confluência), a garrafa em questão teve seu meio de cultura retirado com o auxílio de uma pipeta e foi lavada com 2 mL (T25) e 4 mL de DPBS (T75). Em seguida, foram adicionados 500 µL e 1 mL de tripsina para garrafas T25 e T75, respectivamente, com posterior incubação a 37 °C por cerca de um minuto, até que as células se desprendessem do fundo da garrafa. O conteúdo foi transferido para um tubo do tipo Falcon de 15 mL e a ele foram adicionados 2 volumes de meio DMEM completo para neutralização da tripsina. O tubo foi centrifugado a 300 g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 1mL de meio DMEM completo e 70 µL da ressuspensão transferidos para uma garrafa nova contendo meio novo. A nova garrafa foi agitada no padrão do número 8 para

espalhar as células e incubada a 37 °C saturada em 5% de CO₂. A propagação, dessa forma, ocorreu a cada 3 ou 4 dias, havendo a troca de meio de cultura da garrafa na metade do tempo do intervalo maior.

2.19. Contagem de células de mamífero

Para a contagem, 10 µL da ressuspensão utilizada para a propagação foram aliquotados à parte em um tubo do tipo Eppendorf e misturados a 90 µL de solução de NaCl 0,9% (p/v). Dessa mistura, 10 µL foram adicionados a outro tubo e misturados com 2,5 µL de solução de azul de tripano 4X. Após incubação de 1 minuto, os 12,5 µL foram transferidos para o hemocitômetro, cujos 4 quadrantes maiores foram contados. As células localizadas nos limites superior e esquerdo foram contadas, enquanto nos demais limites foram desconsideradas. Foi feita a média de células vivas (brancas), mortas (azuis) e totais entre os 4 quadrantes.

Para fins de cálculo de células viáveis por mL, a média de células vivas foi multiplicada pelo fator de diluição e por 10⁴ (volume de líquido que ocupa o hemocitômetro).

Para fins de cálculo de viabilidade, foi calculada a razão entre as médias de células vivas e totais e o valor multiplicado por 100, de modo a obter a percentagem.

2.20. Curva de morte de blasticidina

Células da linhagem 293A foram propagadas em placa de poliestireno de 12 poços, de modo a obter 40% de confluência no dia seguinte. Com a confluência observada, os poços tiveram seus meios de cultura retirados e substituídos por meio DMEM completo novo, com doses crescentes de blasticidina por poço, sendo de 0, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 µg/mL. A seleção se deu por 14 dias, com trocas de meio ocorrendo a cada 3 ou 4. Ao final do período de seleção, as células restantes foram desprendidas do fundo dos poços com o auxílio de pipetas estéreis e transferidas para tubos do tipo Eppendorf que, após terem seu conteúdo homogeneizado, tiveram suas células contadas e o cálculo de viabilidade, previamente descrito, feito.

2.21. Teste de toxicidade a Polybrene

Células da linhagem 293A foram propagadas em placa de poliestireno de 12 poços, de modo a obter 70% de confluência no dia seguinte. Posteriormente, o meio foi substituído por novo meio DMEM completo acrescido de Polybrene em concentrações

crecentes por poço, sendo: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. As células foram observadas durante 48h buscando sinais de mudanças fenotípicas ou de citotoxicidade.

2.22. Transfecção de células de mamífero, coleta de vírus e determinação da titulação viral

Seguiu-se as instruções contidas no manual “ViraPower™ HiPerform™ Lentiviral Expression Systems”, com o protocolo de transformação sendo o recomendado para usuários inexperientes (em que as células são propagadas no dia anterior à transfecção) e o protocolo de titulação sendo o por seleção com blasticidina.

2.23. Ensaio de eficiência de transfecção por β-galactosidase

O protocolo utilizado foi adaptado da dissertação de SOUSA de 2006. Os poços contendo as células transfectadas com diferentes multiplicidades de infecção (MOI) foram lavados 2 vezes com PBS, seguido de fixação em etanol 80% por 10 minutos. Os poços foram lavados mais uma vez com PBS e posteriormente adicionou-se 2mL de solução corante. As placas foram cobertas com alumínio e incubadas a 37 °C saturadas em 5% de CO₂ por 24 horas. Na manhã seguinte, a solução corante foi trocada por PBS e as células foram observadas em microscópio.

2.24. Transdução e desenvolvimento de linhagens estáveis e congelamento de células de mamífero

Placas de 12 poços de poliestireno, contendo quantidade variada de células da linhagem 293A por placa, foram preparadas no dia anterior à transdução. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e substituído por meio DMEM completo sem antibiótico, em diferentes quantidades por poço. A esses poços foi adicionado Polybrene na concentração de 10 µg/mL e, por fim, sobrenadante viral descongelado na hora. A quantidade de sobrenadante viral foi variada entre os poços, visando testar diferentes multiplicidades de infecção (MOI). As multiplicidades testadas para a construção ERALV foram de 0, 1, 2, 2,5, 5 e 10, enquanto, para a construção ERACBD, foram de 0, 0,5, 1, 1,5 e 2. O volume final nos poços foi de 1 mL e, após homogeneização da mistura com movimentos em forma de cruz, a placa foi incubada a 37°C saturada em 5% de CO₂. No dia seguinte, o meio foi substituído por outro fresco e, posteriormente, na outra manhã, as células foram coletadas para análise de proteínas em gel de SDS-PAGE ou tiveram seu meio de cultura trocado por meio fresco contendo 11 µg/mL de blasticidina para a criação de linhagens estáveis. A seleção durou 12 dias e, ao final, foi feita a expansão clonal.

Para o congelamento de células, foi necessário que garrafas T25 ou T75 estivessem com 90% de confluência. As células foram tratadas de forma semelhante a feita durante a propagação, mas ressuspensas em meio de congelamento, preparado na hora. Para uma garrafa de T25, utilizou-se 500 µL de meio de congelamento e todo o seu conteúdo foi transferido para um único criotubo. Para garrafas T75, utilizou-se 1,5mL de meio, com seu conteúdo sendo dividido em 3 criotubos. Estes foram colocados rapidamente no Mr. Frosty™ Freezing Container já alimentado com isopropanol. O contêiner então foi colocado a -80 °C até o dia seguinte. Para estoques de trabalho, os tubos permaneceram a -80 °C. Já para os estoques principais, os tubos foram transferidos para nitrogênio líquido.

2.25. Precipitação de proteínas por TCA

Ácido tricloroacético (TCA) refrigerado foi adicionado à solução contendo as proteínas a serem precipitadas de forma que sua concentração final fosse de 25%. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a 4 °C por pelo menos 2 horas, podendo a incubação ser estendida até o dia seguinte. Posteriormente a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C e teve o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado por 2 vezes com 1mL de acetona 100% refrigerada e centrifugado nas mesmas condições por 15 minutos. Por fim, o precipitado foi incubado à temperatura ambiente até que secasse e posteriormente ressuspendido em água destilada, sendo quantificado em seguida. Alternativamente, foi ressuspendido diretamente em tampão de amostra desnaturante de proteína 1X.

2.26. Preparação de extrato intracelular de células de mamífero

Para a coleta de células a serem lisadas, foram feitas as lavagens com PBS e posterior incubação com tripsina, conforme descrito anteriormente. As células foram então transferidas para um tubo do tipo Eppendorf e lavadas com PBS gelado por 3 vezes. Em seguida, as células foram ressuspensas em 60µL de tampão RIPA, preparado na hora, contendo 1 mM de PMSF. A mistura resultante foi incubada a 4 °C durante 30 minutos, seguida de centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C para a retirada dos detritos celulares. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e quantificado pelo método de Bradford.

2.27. Quantificação de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas, foi realizado o método de BRADFORD. Parte do reagente de Bradford do kit Protein Assay (Biorad) foi diluído 5 vezes em água

destilada e estocado a 4 °C até o uso. Foi feita uma curva-padrão com 10 µL de albumina sérica bovina (BSA) com concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2 e 4 µg/µL em triplicata em uma placa de 96 poços de poliestireno. Aos pontos, foram adicionados 200 µL do reagente diluído. Após incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, a absorbância a 595nm foi lida em cada um dos poços. Foi feita a média de absorbância entre as triplicatas, as quais subtraiu-se a média do ponto 0. Os valores foram então colocados em um gráfico e foi feita uma regressão linear. O valor do R² foi considerado válido quando acima de 0,95 e a equação da reta utilizada para posterior quantificação de amostras. Para aferir a quantidade de proteínas totais, utilizou-se 10 µL das amostras, ou suas diluições, acrescidos dos 200 µL do reagente diluído, sempre em triplicata. A absorbância a 595 nm foi lida após incubação a temperatura ambiente por 5 minutos e a média das triplicatas, já subtraída da média do ponto 0, substituiu o valor de y na equação gerada na curva feita anteriormente, sendo possível, desta forma, quantificar as proteínas presentes na amostra como um todo. Quando os valores da absorbância se encontravam fora dos pontos da curva, foram feitas novas diluições das amostras para que estivessem dentro do intervalo confiável.

2.28. Deglicosilação de proteínas

O protocolo descrito foi adaptado do kit “Enzymatic Protein Deglycosylation” (Sigma-Aldrich). Foram utilizados 40 µg de proteína por amostra, sendo possível utilizar os mesmos valores citados abaixo para até 100 µg de proteína. Aos tubos das amostras, adicionou-se 10 µL do tampão fosfato de sódio e 2,5 µL da solução desnaturante, com posterior incubação a 100 °C por 5 minutos. Após resfriamento dos tubos até a temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 µL de solução de Triton X-100 15% (v/v) e 1 µL da enzima PNGase F da Sigma, seguido de incubação a 37 °C por 3 horas.

2.29. Análise de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a quantificação por Bradford do conteúdo intracelular recuperado após a lise com tampão RIPA e dos sobrenadantes precipitados com TCA, foram calculados 10 µg de proteína por amostra e por poço. A eles, adicionou-se o tampão de amostra de proteína desnaturante 5X para análise. As amostras contendo o tampão foram fervidas a 100 °C por 5 minutos e aplicadas no gel. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita utilizando-se o sistema *Mini-PROTEAN* da Bio-Rad, com tampão de corrida 1X e corrente de 100 V na porção concentradora e 120 V na porção separadora. Os géis

foram recuperados após a saída do azul de bromofenol da corrida e utilizados no *western blotting* ou corados com Comassie, a fim de verificar as bandas.

2.30. Coloração de gel de poliacrilamida por azul de Comassie

Após a retirada dos géis do sistema da Bio-Rad, estes foram incubados em solução de Comassie à temperatura ambiente sob agitação por cerca de 1 a 2 horas para verificações rápidas, podendo o tempo ser estendido até o dia seguinte. Para a revelação, os géis foram transferidos para solução descorante nas mesmas condições até o surgimento das bandas.

2.31. Western blotting

Após a retirada dos géis de poliacrilamida do sistema da Bio-Rad, estes foram incubados por 15 minutos em tampão de transferência. Também, pouco antes da finalização da eletroforese, membranas de PVDF de 7x8,5 cm foram cortadas e incubadas em metanol 100% por 45 segundos. Em seguida, estas foram lavadas em água destilada por 5 minutos, sob agitação, com posterior incubação em tampão de transferência por 10 minutos, de forma que as membranas e géis fossem retirados ao mesmo tempo. Utilizou-se o aparelho Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell da BioRad para a transferência do tipo semi-seca, no qual foram adicionados, na seguinte ordem, de baixo para cima: papel filtro, membrana, gel e mais papel filtro, todos embebidos em tampão de transferência. Foram retiradas bolhas de ar com o auxílio de um tubo do tipo Falcon de 15 mL e o aparelho ajustado para 15V e 150 mA durante 30 minutos. Ao final, foi conferida a transferência para a membrana tendo, como referência, o marcador pré-corado. Os géis foram corados com Comassie para avaliar a transferência e as membranas foram incubadas com solução de bloqueio a 4 °C durante a noite e mais 1h à temperatura ambiente no dia seguinte. A solução foi substituída por solução de anticorpo primário, com incubação de 1h, sendo testada tanto a 4 °C como a temperatura ambiente, no caso de diluições mais baixas e, ainda, incubação durante a noite a 4 °C para diluições mais altas.

Quando utilizando anticorpo conjugado a HRP, as membranas foram lavadas com PBS-T ou TBS-T por 3 vezes durante 5 minutos cada. Ao final, as membranas foram transferidas para um novo recipiente ao qual foi-se adicionado 100 µL da solução de luminol e 100 µL do reagente de detecção quimioluminescente de peróxido do kit Optiblot ECL Detect Kit da Abcam. A solução foi espalhada ao longo de toda a

membrana durante 90 segundos, sendo esta transferida para filme PVC em seguida e revelada no aparelho Amersham™ Imager 600.

Quando utilizando o sistema da fosfatase alcalina, a solução de anticorpo primário foi substituída pela solução de anticorpo secundário após 3 lavagens com TBS-T ou PBS-T de 5 minutos cada. A membrana foi incubada por 1h à temperatura ambiente com a solução de anticorpo secundário e, em seguida, foram feitas novas lavagens de forma semelhante. Posteriormente, a membrana foi incubada em tampão APB por 5 minutos sob agitação e transferida para novo recipiente, no qual foram adicionados 8mL da solução 1-Step™ NBT/BCIP Substrate (Thermo Scientific) e 2mL de tampão APB. A membrana foi mantida sob agitação na ausência de luz até a revelação das bandas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, A. A. V.; RUIGROK, R. W. H.; BLONDEL, D. Rabies Virus Transcription and Replication. In: **Advances in Virus Research**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 79p. 1–22.
- BAER, G. M. The History of Rabies. In: **Rabies**. [s.l: s.n.]. p. 1–22.
- BAER, G. M. **The natural history of rabies**. [s.l: s.n.].
- BETT, A. J.; PREVEC, L.; GRAHAM, F. L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. **Journal of Virology**, 1993.
- BORDENAVE, G. **Louis Pasteur (1822-1895). Microbes and infection / Institut Pasteur**, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BRUNKER, K. et al. Elucidating the phylodynamics of endemic rabies virus in eastern Africa using whole-genome sequencing. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, p. vev011, 2015.
- BRUNKER, K.; MOLLENTZE, N. Rabies Virus. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 886–887, 2018.
- CADOZ, M. et al. Immunisation with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. **The Lancet**, 1992.
- CHRISTOPHE, P. et al. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10537–10547, 2003.
- CONSTANTINE, D. G. Bat rabies and other lyssavirus infections. **US Geological Survey Circular**, n. 1329, p. 1–84, 2009.
- DIETZSCHOLD, B. et al. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. **Virology**, v. 124, n. 2, p. 330–337, 1983.
- DIETZSCHOLD, B.; FABER, M.; SCHNELL, M. J. New approaches to the prevention and eradication of rabies. **Expert Review of Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 399–406, 2003.
- FINKE, S.; CONZELMANN, K.-K. Dissociation of Rabies Virus Matrix Protein Functions in Regulation of Viral RNA Synthesis and Virus Assembly. **Journal of Virology**, 2003.
- FISHER, C. R.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. The spread and evolution of rabies virus: Conquering new frontiers. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 241–255, 2018.
- FOOKS, A. R. et al. Rabies. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17091, 30 dez. 2017.
- FREULING, C. M. et al. The elimination of fox rabies from Europe: Determinants of

success and lessons for the future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1623, 2013.

GNANADURAI, C. W.; FU, Z. F. **CXCL10 and blood-brain barrier modulation in rabies virus infection** *Oncotarget*, 2016.

GUPTA, P. K. et al. Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 3–4, p. 207–214, 2005.

HAMPSON, K. et al. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–21, 2015.

HEINEMANN, M. B. et al. Genealogical analyses of rabies virus strains from Brazil based on N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v. 128, n. 3, p. 503–511, 2002.

HICKS, D. J.; FOOKS, A. R.; JOHNSON, N. Developments in rabies vaccines. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 169, n. 3, p. 199–204, 2012.

HORTON, D. L. et al. Complex Epidemiology of a Zoonotic Disease in a Culturally Diverse Region: Phylogeography of Rabies Virus in the Middle East. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–17, 2015.

INVITROGEN. **Growth and Maintenance of the 293FT Cell Line**. [s.l.: s.n.].

JACKSON, A. C. Human Rabies: a 2016 Update. **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, n. 11, p. 1–6, 2016.

JACOB, Y. et al. Cytoplasmic Dynein LC8 Interacts with Lyssavirus Phosphoprotein. **Journal of Virology**, 2000.

JALLET, C. et al. Chimeric Lyssavirus Glycoproteins with Increased Immunological Potential. **Journal of Virology**, 1999.

JOHNSON, N.; ARÉCHIGA-CEBALLOS, N.; AGUILAR-SETIEN, A. Vampire bat rabies: Ecology, epidemiology and control. **Viruses**, v. 6, n. 5, p. 1911–1928, 2014.

JOHNSON, N.; PHILLPOTTS, R.; FOOKS, A. R. Airborne transmission of lyssaviruses. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 785–790, 2006.

KNOWLES, M. K. et al. Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. **Vaccine**, v. 27, n. 47, p. 6619–6626, 2009.

LEWIS, P.; FU, Y.; LENTZ, T. L. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. **Muscle and Nerve**, v. 23, n. 5, p. 720–730, 2000.

LIFE TECHNOLOGIES. **ViraPower™ HiPerform™ Lentiviral Expression Systems: Lentiviral systems for high-level expression in dividing and non-dividing mammalian cells**. Carlsbad, California: [s.n.].

LUO, M. et al. Conserved characteristics of the rhabdovirus nucleoprotein. **Virus Research**, v. 129, n. 2, p. 246–251, 2007.

MANI, J. et al. Magnetic resonance imaging in rabies. **Postgraduate Medical Journal**, v. 79, n. 932, p. 352–354, 2003.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-

- organisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 208–218, 1961.
- MAVRAKIS, M. et al. Rabies virus chaperone: Identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 422–429, 2006.
- MEBATSION, T.; KONIG, M.; CONZELMANN, K. K. Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. **Cell**, 1996.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde 3ª edição**. [s.l: s.n.].
- MOCHIZUKI, N. et al. Molecular epidemiology of livestock rabies viruses isolated in the northeastern Brazilian states of Paraíba and Pernambuco from 2003 - 2009. **BMC Research Notes**, v. 5, 2012.
- NGUGI, J. N. et al. Epidemiology and surveillance of human animal-bite injuries and rabies post-exposure prophylaxis, in selected counties in Kenya, 2011-2016. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- PASTORET, P. P.; BROCHIER, B. Epidemiology and control of fox rabies in Europe. **Vaccine**, v. 17, n. 13–14, p. 1750–1754, 1999.
- PICCINOTTI, S.; WHELAN, S. P. J. Rabies Internalizes into Primary Peripheral Neurons via Clathrin Coated Pits and Requires Fusion at the Cell Body. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, p. 1–25, 2016.
- RAUX, H.; FLAMAND, A.; BLONDEL, D. Interaction of the Rabies Virus P Protein with the LC8 Dynein Light Chain. **Journal of Virology**, 2000.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3th edn, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 3th edn, 2001.
- SANTOSUOSSO, M.; MCCORMICK, S.; XING, Z. **Adenoviral vectors for mucosal vaccination against infectious diseases** **Viral Immunology**, 2005.
- SHEN, J. et al. Systematic Review: Interventions to Educate Children about Dog Safety and Prevent Pediatric Dog-Bite Injuries: A Meta-Analytic Review. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 42, n. 7, p. 779–791, 2017.
- SOBEY, K. G. et al. An assessment of ONRAB® oral rabies vaccine persistence in free-ranging mammal populations in Ontario, Canada. **Vaccine**, v. 31, n. 17, p. 2207–2213, 2013.
- SOUSA, T. M. M. DE. **Produção de proteínas de interesse terapêutico em células de mamíferos em cultura**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2006.
- SUDARSHAN, M. K. et al. Assessing the burden of human rabies in India: results of a national multi-center epidemiological survey. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 29–35, 2007.
- VARGAS, A.; ROMANO, A. P. M.; MERCHÁN-HAMANN, E. Human rabies in Brazil: a descriptive study, 2000-2017. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, 2019.
- VIDY, A.; CHELBI-ALIX, M.; BLONDEL, D. Rabies Virus P Protein Interacts with STAT1 and Inhibits Interferon Signal Transduction Pathways. **Journal of Virology**,

2005.

WIKTOR, T. J. et al. Antigenic properties of rabies virus components. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, 1973.

WIKTOR, T. J. et al. Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Consultation on Rabies, third report**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zero by 30: the global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030**. Geneva: [s.n.].

XIANG, Z. Q. et al. Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus. **Virology**, v. 214, n. 2, p. 398–404, 1995.

YAROSH, O. K. et al. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. **Vaccine**, v. 14, n. 13, p. 1257–1264, 1996.

ZHANG, J. et al. Transmission of rabies through solid organ transplantation: A notable problem in China. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2018.