DANIELA FLORES TERUYA ASTUDILLO

**Avaliação *in vitro* da entrega do gene da glicoproteína do vírus da
raiva através de vetores não virais**

São Paulo
2017

DANIELA FLORES TERUYA ASTUDILLO

Avaliação *in vitro* da entrega do gene da glicoproteína do vírus da raiva através de vetores não virais

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues
Azzoni

São Paulo
2017

DANIELA FLORES TERUYA ASTUDILLO

Avaliação *in vitro* da entrega do gene da glicoproteína do vírus da raiva através de vetores não virais

Dissertação apresentada à Escola Politécnica
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Adriano Rodrigues
Azzoni

São Paulo
2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Astudillo, Daniela Flores Teruya

Avaliação in vitro da entrega do gene da glicoproteína do vírus da raiva através de vetores não virais / D. F. T. Astudillo -- versão corr. -- São Paulo, 2017.

103 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1.DNA plasmidial 2.Glicoproteína do vírus da raiva 3.T-Rp3
4.Lipofectamina 5.Vacinas de DNA I.Universidade de São Paulo.
Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

*À minha mãe pelo amor incondicional e
por todo apoio, incentivo e confiança.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni, pela confiança depositada em mim desde o início deste trabalho. É devido às inúmeras conversas que estivemos sempre alinhados e que essa dissertação foi possível. Obrigada pela orientação e dedicação!

Às Profs. Dras. Paula Maria Nogueira Ambrogi e Luciana Maria Guimarães, sem o exemplo e incentivo de vocês, eu não teria chego até aqui.

Ao Prof. Dr. Aldo Tonso, por todos os conselhos, companheirismo e pela prontificação em ajudar.

Aos amigos do B-20 e agregados, em especial: Bianca, Carla, Gabriela, Guilherme e Livia. Obrigada não só pela ajuda no laboratório e discussões científicas, mas pela amizade, por todas as conversas e bons momentos que passamos dentro e fora do B-20, vocês fizeram meus dias mais felizes.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Viral (LIV) do Instituto Butantan, pelo suporte técnico, difusão de conhecimento e principalmente pelo companheirismo e carinho. Em especial ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira pela coorientação, aos Drs. Renato Astray e Soraia Jorge, pela atenção, ensinamentos e disponibilidade.

À Professora Iolanda Cuccovia do Instituto de Química (IQ) da USP, por permitir o uso do equipamento Zetasizer e à Greice Kelly pelo suporte técnico.

Ao Professor Sandro de Almeida da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP pela permissão de uso do Citômetro de Fluxo, e em especial à Renata Albuquerque, pelo suporte técnico, disponibilidade e a companhia sempre agradável;

À FAPESP e a CAPES pela Bolsa de Mestrado e Reserva Técnica: processo 2014/14404-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao CNPq pelo auxílio financeiro referente ao processo 402439/2013-9.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

“Obstacles are those frightful things you see
when you take your eyes off your goal.”
(Henry Ford)

RESUMO

Um dos principais limitantes ao desenvolvimento e aprovação para utilização em humanos das vacinas de DNA é a falta de um vetor ideal de entrega gênica, que seja ao mesmo tempo eficiente e seguro. Embora mais seguros, os vetores não virais enfrentam uma série de barreiras físicas, enzimáticas e difusionais que limitam a chegada do transgene ao núcleo das células alvo. Dando continuidade ao trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, o principal objetivo desta dissertação de mestrado foi avaliar o desempenho do vetor não viral comercial Lipofectamina e da proteína multifuncional T-Rp3 na entrega do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) a células BHK-21. Primeiramente, o gene RVGP foi inserido no plasmídeo modelo pVAX1. Foram então realizados estudos de transfecção em células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), utilizando-se Lipofectamina como agente de transfecção, no sentido de constatar a correta expressão do gene RVGP contido no novo plasmídeo. Como controle positivo, foi utilizado o plasmídeo pCMV-RVGP. Os estudos de PCR quantitativo da transcrição reversa (qRT-PCR) e imunofluorescência indicaram a expressão da glicoproteína pelo pVAX1RVGP, ainda que em valores de expressão menores se comparados com o plasmídeo controle pCMV-RVGP. Foi também desenvolvido com sucesso um método quantitativo de determinação da expressão da RVGP em células utilizando-se citometria de fluxo, que confirmou os resultados anteriores. Devido ao plasmídeo pVAX1RVGP ter apresentado baixa eficiência de expressão da RVGP, buscou-se a elevação da eficiência a partir da adição da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1RVGP. Nesse caso, ainda que os resultados indiquem um aumento na expressão, não houve confirmação estatística ($p < 0,05$). Os estudos de entrega com a proteína T-Rp3 foram realizados com um lote da T-Rp3 armazenada em ultrafreezer. A proteína demonstrou-se não ser estável após o congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em ultrafreezer pelo tempo de 10 meses. Apesar de ser capaz de complexar o pDNA após esse tempo, não foi eficiente em ensaios de transfecção, tendendo a agregar em relações molares altas e ausência de soro fetal bovino.

Palavras-chave: DNA plasmidial, Glicoproteína do vírus da raiva, T-Rp3, Lipofectamina, Vacinas de DNA, Entrega Gênica.

ABSTRACT

One of the major bottlenecks on the development and approval of DNA vaccines in humans is the lack of an ideal gene delivery vector, which must be safe and efficient at the same time. Although safer, the non-viral vectors face a series of physical, enzymatic and diffusion barriers that limits the arrival of the endogenous gene in the nuclei of the target cells. The main goal of this work was the evaluation of the performances of the commercial non-viral vector Lipofectamine, and the recombinant protein T-Rp3, a multifunctional protein, on the delivery of the rabies virus glycoprotein (RVGP) gene to BHK-21 cells. First, the RVGP gene was inserted into the pVAX1 plasmid, and transfections using BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) cells were performed using the Lipofectamine reagent to verify the correct expression of the RVGP gene present in the new plasmid. As a positive control, the plasmid pCMV-RVGP was used. The quantitative reverse transcription (qRT-PCR) and immunofluorescence studies indicated the expression of RVGP from pVAX1RVGP, although in lower expression values in comparison to the control plasmid. In addition, a flow cytometry quantitative method to quantify and compare the expression of the RVGP in the membrane of the transfected cells was developed, confirming the previous results. With the purpose of increase, the expression of RVGP, the KOZAK consensus sequence was added to the new pVAX1RVGP plasmid, and despite of the apparent increase of RVGP expression, this could not be confirmed statistically. The experiments of gene delivery using the T-Rp3 protein were performed using a protein batch stored in ultrafreezer for 10 months. However, the protein has shown not being stable after storage for this long period. Moreover, despite of being capable to complex pDNA after this time, T-Rp3 was not efficient in the transfection assays and tended to aggregate in high molar ratios.

Keywords: Plasmid DNA, Rabies virus glycoprotein, T-Rp3, Lipofectamine, DNA Vaccines, Gene Delivery.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição dos testes clínicos realizados mundialmente até o ano de 2015 de acordo com o tipo de vetor utilizado (JOHN WILEY AND SONS LTD, 2015).
.....24
- Figura 2** - Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA: (1) degradação por nucleases extracelulares; (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação no endossoma vs. escape; (5) degradação por nucleases citosólicas (6) entrada no núcleo; (7) transcrição; (8) exportação do mRNA (9) tradução (FAVARO, 2012).25
- Figura 3** - Domínios funcionais da proteína T-Rp3 e sequência completa de aminoácidos. Em azul está representado a sequência de histidinas, em verde a sequência sintética de ligação ao DNA (*DNAbinding*), em laranja a cadeia leve de dineína humana Rp3 e em vermelho a sequência do peptídeo membrano-ativo, TAT. Em preto está apresentado os resíduos resultantes do processo de clonagem. Adaptado de (FAVARO *et al.*, 2014).26
- Figura 4** - Diferentes domínios da T-Rp3 e sua complexação com pDNA, originando um complexo binário (ALVES, 2015).27
- Figura 5** - Lipídeos utilizados na formulação do reagente de transfecção Lipofectamina™ (Life Technologies): **(a)** Estrutura molecular do lipídeo DOSPA (2,3 Dioleoiloxi-N-[(esperminacarboxamino)etil]-N,N-dimetil-1- propanamínio); **(b)** Estrutura molecular do lipídeo DOPE (L- α -dioleoil fosfatidiletanolamina) (SILVA, 2015).28
- Figura 6** - Esquema do vírus rábico e suas proteínas estruturais. O vírion exibe o formato de bala de fuzil e é composto por ribonucleocapsídeo helicoidal (RNP-M) e envelope viral formado por glicoproteínas espiculadas (G) (CHAVES, 2010).30
- Figura 7** - O genoma do vírus rábico é constituído por cinco genes de proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P, NS ou M1), uma proteína matriz (M ou M2), uma RNA polimerase (L) e uma glicoproteína (G) ou RVGP. Adaptado de (TORDO *et al.*, 1986).31
- Figura 8** - Ilustração representativa das vistas lateral e superior da glicoproteína do vírus da raiva em sua forma trimérica. (MONTEIRO, 2014).32

Figura 9 - Mapa do vetor plasmidial pVAX1RVGP construído com o uso do *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA). O plasmídeo contém 4541 pb e possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pUC, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH), e o gene de seleção em bactéria KanR, que confere resistência ao antibiótico kanamicina.35

Figura 10 - Mapa do vetor plasmidial pCMV-RVGP construído com o uso do *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA). O plasmídeo contém 7950 pb e possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pMB1, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), íntron quimérico dos genes da β -globina humana e cadeia pesada de imunoglobulina, região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do vírus SV40, e o gene de seleção em bactéria AmpR, que confere resistência ao antibiótico ampicilina. .37

Figura 11 - a) Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada como controle, contendo o gene RVGP do plasmídeo pCMV-RVGP. Legenda: M - marcador molecular; 1 - digestão da RVGP purificada, utilizada como inserto. b) Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção do gene *RVGP* no plasmídeo pVAX1 em diversos clones através de análise de restrição. Legenda: M - marcador molecular; 1 a 12 - digestão dos 12 clones do plasmídeo pVAX1RVGP com as enzimas de restrição PmeI e EcoRI, bandas com aproximadamente 1600 pb.....44

Figura 12 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção do gene *RVGP* no plasmídeo pVAX1 através de análise de restrição e amplificação do gene por PCR. Legenda: M - marcador molecular; 1 - amostra do plasmídeo pVAX1RVGP purificado (clone 9); 2 - resultado da reação de PCR para amplificação do gene *RVGP* do plasmídeo pVAX1RVGP (clone 9); 3 - digestão do plasmídeo pVAX1RVGP (clone 9) com a enzima de restrição *EcoRI*.45

Figura 13 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos realizados utilizando-se o *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA) a partir do sequenciamento dos clones “9” e “A” do plasmídeo pVAX1RVGP, respectivamente.45

Figura 14 - Códon da espécie *Mesocricetus auratus*. As células BHK-21 são células de rim de hamster bebê provenientes desta espécie de roedor. Em vermelho estão os códon AGU (sequência original da RVGP) e AGC (códon modificado). Ambos codificam para o aminoácido Serina (KAZUSA, 2007).....46

Figura 15 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção do gene *RVGP* no plasmídeo pCMV através de análise de restrição e amplificação do gene por PCR. Legenda: M - marcador molecular; 1 - amostra do plasmídeo pCMV-RVGP purificado; 2 - resultado da reação de PCR para amplificação do gene *RVGP* do plasmídeo pCMV-RVGP; 3 - digestão do plasmídeo pCMV-RVGP com a enzima de restrição *EcoRI*.47

Figura 16 - a) Perfis de *melting* de cDNA obtidos através de transcrição reversa submetidas a qPCR nos diferentes tempos pós-transfecção (24, 48, 72, 96 e 120 horas) dos plasmídeos pCMV-RVGP e pVAX1RVGP, bem como controles negativo, positivo e água. b) Perfil de *melting* contendo apenas a curva do controle positivo. c) Perfil de *melting* contendo apenas as curvas de controle negativo. d) Perfil de *melting* contendo controle positivo e amostras de 48 horas de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP. e) Perfil de *melting* contendo controle positivo, controle negativo e amostras de 48 horas de células transfectadas com o plasmídeo pVAX1RVGP.49

Figura 17 - Detecção da RVGP através do método de Imunofluorescência Indireta partir de células BHK-21 transfectadas, imagens capturadas no aumento de 20x. a) Controle Negativo - células BHK-21 não transfectadas. b) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pCMV-RVGP:lipofectamina na relação massa/volume 1:5 com 2 µg de pDNA c) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pCMV-RVGP:lipofectamina na relação massa/volume de 1:5 com 4 µg de pDNA. d) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pVAX1RVGP:lipofectamina na relação massa/volume 1:5 com 2 µg de pDNA. e) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pVAX1RVGP:lipofectamina na relação massa/volume de 1:5 com 4 µg de pDNA.51

Figura 18 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas pelo lipoplexo pDNA:lipofectamina, na relação massa/volume de 1:1,5 com 5 µg de pDNA. A diluição utilizada foi de 1:500 para o anticorpo primário e 1:80 para o anticorpo secundário (0,5 µg/amostra).53

Figura 19 - Titulação de anticorpos para padronização da quantificação da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo. Legenda: S - Células não transfectadas tratadas com os anticorpos. T - Células transfectadas com o plasmídeo controle pCMV-RVGP. A diluição que aparece em frente ao traço é equivalente à diluição do anticorpo primário e, após o traço, ao anticorpo secundário. As diluições utilizadas para o anticorpo primário foram 1:200; 1:3500; 1:500 e para o anticorpo secundário foram 1:200; 1:267 e 1:400 (0,2; 0,15 e 0,1 µg/amostra, respectivamente).54

Figura 20 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e os plasmídeos pCMV-RVGP e pVAX1RVGP, em diferentes relações massa/volume (1:5, 1:2,5 e 1:1,5), com 2 µg, 4 µg e 5 µg de pDNA por poço respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão entre duplicatas.56

- Figura 21** - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a identificação de clones contendo a sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1. Legenda: M - marcador molecular; 1 - plasmídeo pVAX1GFP; 2 - plasmídeo pVAX1RVGP; 3 a 8 - clones purificados após transformação de plasmídeos em bactérias *E. coli* DH10B.....58
- Figura 22** - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1 através de análise de restrição. Legenda: M - marcador molecular; 1 - plasmídeo pVAX1GFP; 2 - digestão do plasmídeo pVAX1GFP com a enzima de restrição *SpeI*; 3 e 5 - plasmídeo pVAX1RVGP; 4 e 6 - digestão do plasmídeo pVAX1RVGP com a enzima de restrição *SpeI*; 7 - clone 4; 8 - digestão do clone 4 com a enzima de restrição *SpeI*.58
- Figura 23** - Alinhamento de sequências de nucleotídeos realizados utilizando-se o *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA) a partir do sequenciamento do clone 4 do plasmídeo pVAX1RVGP.59
- Figura 24** - Mapa do vetor plasmidial pVAX1RVGP construído com o uso do *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA). O plasmídeo contém 4512 pb e possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pUC, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH), e o gene de seleção em bactéria KanR, que confere resistência ao antibiótico kanamicina.60
- Figura 25** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e os plasmídeos pCMV-RVGP, pVAX1kRVGP e pVAX1RVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na presença de SFB. Células foram transfectadas com o plasmídeo pVAX1kRVGP nas mesmas condições sem a presença SFB. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.62
- Figura 26** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 após 48 horas da transfecção com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA, nas confluências celulares de 60%, 70% e 80% na ausência de SFB. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.63
- Figura 27** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na ausência de SFB, após os seguintes tempos de expressão 24h, 48h, 72h e 96h. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.64

Figura 28 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP nas relações massa/volume de 1:1, 1:3 e 1:5 com 2 µg de pDNA, na relação massa/volume de 1:5 com 4 µg de pDNA, na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na presença de SFB e na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg do plasmídeo pVAX1RVGP. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.65

Figura 29 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) realizado para a confirmação da presença da proteína T-Rp3 após processo de purificação. Legenda: M - marcador molecular; 1 - Proteína T-Rp3 (controle positivo); 2 - Amostra da proteína T-Rp3 obtida após a eluição da coluna cromatográfica com Imidazol 200 mM; 3 - Amostra da T-Rp3 obtida após eluição em Imidazol 500 mM.68

Figura 30 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada como avaliação qualitativa da complexação do pDNA pela T-Rp3 em diferentes relações molares. Legenda: M - marcador molecular; 1 - plasmídeo pVAX1kRVGP, controle negativo; 2 - pVAX1kRVGP: T-Rp3 na relação molar de 1:1000; 3 - pVAX1kRVGP: T-Rp3 na relação molar de 1:8000; 4 - pVAX1kRVGP: T-Rp3 na relação molar de 1:15000.....69

Figura 31 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP nas relações molares de 1:1000, 1:8000 e 1:15000 com 2 µg de pDNA, após 48 horas de expressão. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.....70

Figura 32 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, nas confluências celulares de 50, 60, 70, 80 e 90. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.....71

Figura 33 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas na confluência de 50% com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, após os seguintes tempos de expressão 24h, 48h, 72h e 96h. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.72

Figura 34 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas na confluência de 50% com a T-Rp3 e os plasmídeos pVAX1kRVGP e pVAX1Luc na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, em diferentes maneiras de complexação. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.....73

Figura 35 - Imagens capturadas no aumento de 20x em três diferentes tempos pós transfecção: t0, t6 e t48 de células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pVAX1k-RVGP:lipofectamina na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA, com o complexo pVAX1k-RVGP:T-Rp3 na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA na presença de SFB, *TP e na ausência de SFB. O controle (-) apresenta células BHK-21 não transfectadas.74

Figura 36 - Imagens capturadas no aumento de 20x dos complexos formados em contato com a placa de 6 poços. a) Controle Negativo - poço contendo Opti-MEM. b) Lipofectamina em Opti-MEM. c) T-Rp3 em Opti-MEM. d) pVAX1kRVGP:T-Rp3 na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA.76

Figura 37 - Análise da especificidade de anticorpos através da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA. Legenda: SM - sem marcação; SEC - marcação apenas com o anticorpo secundário (SEC); PRI+SEC - marcação com os anticorpos primário e secundário. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sequência e Temperatura de *Melting* (Tm) dos *Primers* Intermediários Direto e Reverso e desenhados para amplificar a região intermediária do gene da RVGP inserido no plasmídeo pVAX1.....35
- Tabela 2** - Sequência e Temperatura de *Melting* (Tm) dos *Primers* KOZAK Direto e Reverso desenhados para amplificar o gene da RVGP inserido no plasmídeo pVAX1RVGP. Sequência de KOZAK representada em negrito, sequência da enzima de restrição *KpnI* em laranja, sequência da enzima de restrição *XbaI* em azul e nucleotídeo modificado no *stop* códon em vermelho.....38
- Tabela 3** - Divergências identificadas a partir do alinhamento da sequência de nucleotídeos do clone 4 contendo a sequência de KOZAK e do gene da RVGP.59
- Tabela 4** - Diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta dos lipoplexos pVAX1kRVGP:Lipofectamina formados nas relações massa/volume de 1:1; 1:3; 1:5 sem a presença de SFB e na relação massa/volume de 1:5 na presença de SFB (*), em meio Opti-MEM. O controle negativo apresentado consiste no meio de cultura Opti-MEM sem a presença de complexos.66
- Tabela 5** - Mediana de Intensidade de Fluorescência (AU) das amostras sem marcação em diferentes comprimentos de onda.78

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	17
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. Entrega gênica e as Vacinas de DNA.....	22
3.2. Vetores de entrega gênica.....	22
3.2.1. Vetores virais.....	23
3.2.2. Vetores não virais.....	23
3.3. Barreiras intracelulares à entrega gênica de vetores não virais	24
3.4. Proteína T-Rp3.....	26
3.5. Lipofectamina™	28
3.6. A Raiva.....	29
3.7. Vírus da Raiva e a Proteína G	30
3.8. Vacinas antirrábicas.....	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. Clonagem do gene RVGP no DNA plasmidial pVAX1	34
4.2. Sequenciamento do gene da RVGP no plasmídeo pVAX1RVGP	35
4.3. Transformação de células <i>Escherichia coli</i> DH10B com DNA plasmidial	36
4.4. Inserção da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1RVGP	37
4.5. Ensaio de transfecção em células BHK-21 para expressão do gene da RVGP	38
4.5.1. Crescimento e passagem de células BHK-21	38
4.5.2. Ensaio de transfecção in vitro de células BHK-21 utilizando Lipofectamina e a proteína T-Rp3	39
4.5.3. Preparação de amostras de células transfectadas para avaliação da expressão da RVGP	40
4.6. Detecção da expressão do gene <i>RVGP</i> através de PCR quantitativo da transcrição reversa - qRT-PCR	40
4.7. Detecção da expressão da proteína RVGP em células BHK-21 através de Imunofluorescência Indireta (IF-I)	41
4.8. Quantificação da expressão da proteína RVGP em células BHK-21 através de Citometria de Fluxo	41
4.9. Expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação da proteína recombinante T-Rp3.....	42

4.10. Determinação das características físico-químicas dos complexos binários formados com pDNA e Lipofectamina	43
4.11. Metodologia Estatística	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1. Clonagem e sequenciamento do gene RVGP no DNA plasmidial pVAX1	44
5.2. Avaliação da expressão do gene da RVGP	47
5.2.1. Quantificação de mRNA da RVGP através de qRT-PCR	47
5.2.2. Detecção da expressão da proteína RVGP	50
5.2.3. Quantificação da expressão da RVGP e padronização de método quantitativo através de Citometria de Fluxo	52
5.3. Clonagem e sequenciamento do pVAX1RVGP após inserção da sequência de KOZAK	57
5.4. Quantificação da expressão da RVGP a partir do complexo pVAX1kRVGP:Lipofectamina.....	61
5.5. Caracterização físico-química do complexo pVAX1kRVGP:Lipofectamina	66
5.6. Expressão e purificação da proteína recombinante T-Rp3	67
5.7. Quantificação da expressão da RVGP a partir do complexo pVAX1kRVGP:T-Rp3...	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7. CONCLUSÕES	82
8. SUGESTÃO PARA A CONTINUAÇÃO DOS ESTUDOS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE A - Eletroforese em Gel de Agarose realizada para análise de fragmentos amplificados nas etapas de extração de material genético, tratamento com DNase e síntese de cDNA	91
APÊNDICE B - Resultados em Mediana da Intensidade de Fluorescência (AU)	92
APÊNDICE C - Propriedades Físico-Químicas de Nanopartículas	99
Diâmetro Médio Hidrodinâmico	99
Estabilidade Coloidal, a Teoria DVLO e o Potencial Zeta	101

1. INTRODUÇÃO

Com o advento das tecnologias de DNA recombinante e a crescente gama de estratégias de manipulação genética, surgiu o interesse em aplicar este conhecimento na área de saúde, através da inserção de moléculas de ácidos nucleicos em células de mamíferos. A entrega de genes exógenos pode ser aplicada para a terapia gênica, que tem como um dos objetivos a correção de um processo patológico de base genética, bem como para a vacinação por DNA, que consiste na inserção de genes exógenos visando à imunização. Em ambos os contextos, a entrega gênica surge como uma estratégia de grande potencial médico.

Estudadas desde 1990, as vacinas de DNA se tornaram uma realidade, com produtos licenciados para uso veterinário e apresentam a maior parte dos testes clínicos realizados até 2015. Aparecem como alternativa às vacinas tradicionais, por serem mais seguras e possuírem a mesma capacidade de indução da produção de anticorpos e de resposta imune celular. Nesse contexto, muitos estudos têm sido realizados para a substituição da vacina clássica contra a raiva por outras com tecnologia recombinante. Mas apesar do potencial da entrega gênica, ácidos nucleicos não possuem a capacidade natural de entrar nas células, tornando necessário o uso de vetores que os transportem com eficiência e segurança.

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa tem direcionado seus estudos para o desenvolvimento e avaliação de vetores não virais de entrega gênica, em especial proteínas recombinantes baseadas em cadeias leves de dineína, proteína responsável pelo transporte intracelular de cargas através da rede de microtúbulos. Estudos realizados demonstraram que uma dessas proteínas, a T-Rp3, possui a capacidade de condensar o pDNA, formando nanopartículas, que se mostraram eficientes em transfectar células de mamífero (HeLa) *in vitro*. No entanto, pouco sabemos ainda sobre o potencial da proteína modular recombinante T-Rp3 em atuar como vetor de entrega em uma vacina real de DNA.

Uma excelente oportunidade para isso surgiu recentemente, através de uma colaboração com o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, que possui grande experiência na pesquisa e desenvolvimento de vacinas contra o vírus da raiva. O desenvolvimento de novas vacinas contra a raiva passa, frequentemente, pela utilização do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) como agente de

imunização. No entanto, trata-se de glicoproteína complexa, trimérica, de baixa expressão e de natureza instável, cujos estudos de expressão e purificação em diferentes tipos de células são frequentemente desafiadores. Por isso, buscamos nesse trabalho congrega os conhecimentos de ambos os grupos de pesquisa para buscar o desenvolvimento inicial de uma vacina antirrábica veterinária baseada em DNA plasmidial, utilizando para isso dois diferentes vetores de DNA, Lipofectamina e a proteína recombinante T-Rp3.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é contribuir para o desenvolvimento de um protótipo de vacina de DNA plasmidial contra o vírus da raiva, avaliando-se dois diferentes vetores não virais de entrega gênica: a Lipofectamina e a proteína recombinante modular T-Rp3. Para isso, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- Clonagem do gene RVGP no DNA plasmidial pVAX1 utilizado em estudos de vacinação gênica;
- Desenvolvimento e implementação de um método analítico eficiente para quantificação da expressão do gene da RVGP na membrana das células de transfectadas, através de citometria de fluxo;
- Expressão em *Escherichia coli* e purificação da proteína recombinante T-Rp3, baseada na cadeia leve de dineína Rp3;
- Padronização de ensaios de transfecção em células de mamíferos BHK-21 buscando-se avaliar parâmetros de transfecção, como a confluência celular, sobre a eficiência de entrega e a cinética de expressão do gene RVGP, utilizando-se Lipofectamina e a proteína T-Rp3 como vetores de entrega;
- Caracterização *in vitro* da interação entre o DNA plasmidial e os vetores Lipofectamina ou T-Rp3, em meio de cultura Opti-MEM, na presença e na ausência de Soro Fetal Bovino, avaliando-se as características físico-químicas do complexo formado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Entrega gênica e as Vacinas de DNA

A entrega de genes exógenos pode ser aplicada tanto para a terapia gênica quanto para a vacinação por DNA. A Terapia gênica consiste na transferência de material genético a células através de vetores, com o objetivo de prevenir, alterar ou reverter um processo patológico. Baseia-se na inserção de genes funcionais em células, com a finalidade de substituir, corrigir ou complementar (ou uma combinação destes) os genes causadores de doenças (DANI, 2000; KAY, 2011; LINDEN, 2010). Atualmente, o número de testes clínicos de fase I/II têm demonstrado evidências de eficácia e segurança para tratamentos de várias doenças hereditárias graves do sangue, sistemas imune e nervoso, bem como linfoma. Todos os testes exploram a utilização de tecnologias que melhoram a entrega de genes terapêuticos através de vetores (NALDINI, 2015).

As vacinas de DNA, também consistem na entrega do material genético através de vetores (plasmídeos, na maioria dos casos), porém por conter um gene responsável por codificar um antígeno é de extrema importância que não ocorra a integração deste gene no genoma do hospedeiro (PATHAK; PATNAIK; GUPTA, 2009). Têm como principal vantagem a indução da produção de anticorpos e de resposta imune celular de linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, justamente como as vacinas tradicionais (KANO; VIDOTTO; VIDOTTO, 2007; YANG *et al.*, 2013). Outras vantagens são: possuem forte estabilidade de estocagem, facilidade de aumento de escala de produção e boa rentabilidade (SCHLEEF, 2005). Se comparadas com vacinas baseadas na entrega de proteínas, as vacinas de DNA são superiores em termos de produção e estocagem, bem como em sua aplicação e segurança. Estudadas desde 1990, as vacinas de DNA se tornaram uma realidade, com quatro produtos licenciados para uso veterinário (KUTZLER; WEINER, 2008).

3.2. Vetores de entrega gênica

Um vetor de entrega gênica é um carreador que facilita a entrada do material genético na célula alvo. Podemos classificar estes vetores em: virais e não virais.

3.2.1. Vetores virais

Atualmente os vetores virais são a estratégia de entrega gênica mais comumente utilizada, devido a sua alta eficiência de transdução, compreendendo 66% dos testes clínicos realizados até o ano de 2015 (Figura 1). Apesar de muito eficientes, alguns tipos (vetores adenovirais e retrovirais), obtiveram alguns efeitos adversos graves, até mesmo fatais em testes clínicos ocasionando o cancelamento de diversos estudos na fase I (JOHN WILEY AND SONS LTD, 2015; LINDEN, 2010). Isso ocorre, pois o vetor viral pode elicitar respostas imunes no hospedeiro que além de danosas, bloqueiam o efeito terapêutico (NAYAK; HERZOG, 2011).

A produção de vetores virais consiste na inserção de um gene terapêutico no material genético viral, após a remoção dos genes envolvidos nos processos de patogenia e proliferação viral. A utilização de vetores virais baseia-se na habilidade natural dos vírus de infectar células hospedeiras (LINDEN, 2010).

A principal distinção na escolha da aplicação de cada tipo de vetor viral é o tipo de expressão de cada um no hospedeiro. Os vetores mais utilizados são os Retrovírus e Adenovírus. Os retrovírus integram o gene exógeno no cromossomo do hospedeiro, resultando numa expressão estável, já os adenovírus persistem nas células como um epissoma (NAYAK; HERZOG, 2011).

3.2.2. Vetores não virais

Os vetores não virais representam cerca de 25% dos testes clínicos realizados até o ano de 2015 (Figura 1). O número de testes clínicos realizados passou de 428 em 2012 para 571 em 2015, aumento de aproximadamente 34% (JOHN WILEY AND SONS LTD., 2015). A produção dos vetores não virais baseados em plasmídeos consiste na purificação do DNA plasmidial (pDNA) e complexação com algum carreador de entrega. Os carreadores podem ser formados por diferentes produtos, como: lipídeos, peptídeos, polímeros, polissacarídeos, materiais metálicos, dentre outros. Uma outra opção de entrega do pDNA é através de métodos que visam fragilizar a membrana celular, como a eletroporação (choques elétricos) ou agentes químicos (LINDEN, 2010).

Os lipídeos catiônicos têm sido os mais utilizados, pois possuem a função de complexar o pDNA eletrostaticamente formando os chamados lipoplexos. As proteínas quiméricas, têm aparecido como uma opção versátil à esses lipídeos, pois

além de conseguirem cumprir a mesma função, podemos incorporar diversos domínios à essas proteínas, de modo a conferir habilidades que melhoram a entrega gênica (ARÍS; VILLAVERDE, 2004; KAY, 2011; WON; LIM; KIM, 2011).

Muito menos de 1% das células incorpora o pDNA em seus cromossomos, ou seja, o pDNA é expresso transitoriamente. Para que a expressão nas células seja permanente, o pDNA deve conter uma sequência de integração dirigida. Essa é uma das razões pela qual esses vetores são considerados seguros. Além de não estimularem imunidade, sendo assim uma estratégia muito promissora (DANI, 2000).

Apesar do crescente aumento da utilização destes vetores, eles possuem algumas limitações. Como sua utilização para introduzir genes em órgãos de difícil acesso, sendo assim necessária a combinação com outras ferramentas terapêuticas, como terapia celular. Se comparados com vetores virais, ainda são pouco eficientes, apresentando algumas limitações quanto ao direcionamento celular, resultando em baixa expressão do transgene (LINDEN, 2010).

Figura 1 - Distribuição dos testes clínicos realizados mundialmente até o ano de 2015 de acordo com o tipo de vetor utilizado (JOHN WILEY AND SONS LTD, 2015).

3.3. Barreiras intracelulares à entrega gênica de vetores não virais

Considerando que a eficiência de entrega gênica é um desafio tanto para terapia gênica quanto para as vacinas de DNA, a melhoria dos vetores já existentes ou o desenvolvimento de novos, faz-se necessária. Para isso a compreensão das barreiras limitantes da chegada do DNA exógeno ao núcleo da célula alvo é fundamental.

As etapas do tráfego do transgene constituem em múltiplos desafios (Figura 2),

começando fora da célula alvo, onde o pDNA pode sofrer degradação por nucleases extracelulares. A entrada na célula também é uma barreira por dois fatores principais: o tamanho e a carga da partícula (FERRER-MIRALLES; VÁZQUEZ; VILLAYERDE, 2008). O tamanho da partícula deve ser menor que 200 nm de diâmetro para que possa ocorrer a endocitose (REJMAN *et al.*, 2004). Na ausência de um direcionador, a carga da partícula deve ser positiva, uma vez que acontece a repulsão eletrostática entre o pDNA e a superfície celular, devido a ambos serem carregados negativamente. Portanto, a necessidade da utilização de carreadores para complexação eletrostática do DNA dá-se por esses motivos (WIETHOFF; MIDDAGH, 2003).

Uma vez dentro da célula o pDNA pode sofrer degradação por acidificação do compartimento e por atuação de nucleases lisossomais. Para que isso não ocorra, o escape endossomal antes da fusão da vesícula com o lisossomo é necessário (RUPONEN *et al.*, 2009). Então, o pDNA deve ser transportado através do citosol por meio de motores moleculares até próximo ao núcleo, onde deverá ocorrer a passagem através da membrana nuclear (translocação nuclear). A última barreira é a dissociação do material genético de seu carreador para a transcrição. Nesse caso, o sistema de entrega deve se ligar ao pDNA com força suficiente para protegê-lo de nucleases, mas não tão fortemente de maneira a afetar a expressão gênica (PATHAK; PATNAIK; GUPTA, 2009).

Figura 2 - Principais barreiras à expressão gênica durante o tráfego de vetores de pDNA: (1) degradação por nucleases extracelulares; (2) entrada na célula; (3) endocitose; (4) degradação no endossoma vs. escape; (5) degradação por nucleases citosólicas (6) entrada no núcleo; (7) transcrição; (8) exportação do mRNA (9) tradução (FAVARO, 2012).

3.4. Proteína T-Rp3

Recentemente, nosso grupo de trabalho desenvolveu a proteína T-Rp3 com o objetivo de atuar como carreador no vetor não viral de entrega de DNA plasmidial. A T-Rp3, com quatro domínios funcionais: cauda de histidina, domínio de ligação ao pDNA, cadeia leve da dineína humana (Rp3) e domínio TAT, possui 164 aminoácidos (Figura 3) e massa molecular de 18,4 kDa (FAVARO *et al.*, 2014).

Figura 3 - Domínios funcionais da proteína T-Rp3 e sequência completa de aminoácidos. Em azul está representado a sequência de histidinas, em verde a sequência sintética de ligação ao DNA (*DNAbinding*), em laranja a cadeia leve de dineína humana Rp3 e em vermelho a sequência do peptídeo membrano-ativo, TAT. Em preto está apresentado os resíduos resultantes do processo de clonagem. Adaptado de (FAVARO *et al.*, 2014).

A construção desta proteína foi efetuada visando superar as diversas barreiras encontradas desde a entrada do pDNA na célula, seu transporte ao longo do citoplasma e chegada ao núcleo até a expressão proteica desejada na célula alvo.

A dineína possui na célula uma função como proteína transportadora. É responsável pelo transporte intracelular de cargas através da rede de microtúbulos (filamentos polarizados do citoesqueleto) no sentido da periferia para o centróssoma, que fica localizado próximo ao núcleo de células não polarizadas (DÖHNER; NAGEL; SODEIK, 2005; TZFIRA, 2006). A utilização da cadeia leve de dineína humana deu-se por ser a porção que interage com a carga a ser transportada, sendo que estas não se encontram apenas associadas ao complexo, sugerindo assim uma função independente (DOUGLAS *et al.*, 2004).

O TAT é um peptídeo membrano-ativo proveniente do vírus HIV-I, rico em arginina e lisina, de onze aminoácidos capaz de transportar moléculas através das membranas plasmática e nuclear (YAMANO *et al.*, 2011). Não desencadeia resposta imune e possui a capacidade de penetrar a membrana nuclear, independentemente de ATP, com uma cinética mais rápida que sinais de localização nucleares (NITIN *et al.*, 2009). É amplamente usado na entrega gênica, devido sua natureza catiônica que permite a condensação e proteção do ácido nucleico (MOSCHOS *et al.*, 2007). Estudos

apontam que a adição de resíduos de histidina e cisteína ao peptídeo original de TAT promove um aumento de 7000 vezes na eficiência de transfecção (LO; WANG, 2008).

A sequência sintética de ligação ao DNA utilizada possui 10 aminoácidos compostos por dois “clusters” de arginina intercalada por um aminoácido aromático. A organização dos resíduos em “clusters” favorece o aumento da condensação e estabilidade do complexo pDNA:T-Rp3, por se basear em histonas, que nos cromossomos tem o papel de condensar o DNA. Além disso, a utilização deste pequeno domínio facilita a interação da T-Rp3 com o pDNA (SACCARDO; VILLAYERDE; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, 2009; TOLEDO *et al.*, 2012).

Visando o escape endossomal, resíduos de histidina foram utilizados por serem capazes de causar inchaço osmótico, resultando no rompimento da membrana endossomal (BEHR, 1997; CANINE; WANG; HATEFI, 2008).

Conforme ilustrado na Figura 4, a T-Rp3, que possui carga positiva é capaz de condensar o pDNA, que possui carga negativa, formando complexos binários. Segundo Favaro *et al.* (2014), estes complexos binários formaram partículas toroidais com um tamanho menor que 100 nm e com potencial zeta positivo. Estes complexos, ou nanopartículas mostraram-se bastante eficientes em transfectar células de mamífero *in vitro* e com uma baixa citotoxicidade, mostrando potencial para uma futura aplicação *in vivo*.

Figura 4 - Diferentes domínios da T-Rp3 e sua complexação com pDNA, originando um complexo binário (ALVES, 2015).

3.5. Lipofectamina™

A Lipofectamina™ (Invitrogen, EUA) é um reagente comercial que contém lipídeos que podem formar lipossomas catiônicos em meio aquoso. É um vetor não viral, amplamente utilizado na entrega gênica *in vitro* a células de mamífero. Sua composição é uma proporção de 3:1 do lipídeo catiônico DOSPA (2,3 Dioleoiloxi-N-[(esperminacarboxamino)etil]-N,N-dimetil-1- propanamínio) e do lipídeo neutro DOPE (L-α-dioleoil fosfatidiletanolamina) (THERMO FISHER, 2004). Na Figura 5 é possível verificar a estrutura dos lipídeos citados.

Figura 5 - Lipídeos utilizados na formulação do reagente de transfecção Lipofectamina™ (Life Technologies): **(a)** Estrutura molecular do lipídeo DOSPA (2,3 Dioleoiloxi-N-[(esperminacarboxamino)etil]-N,N-dimetil-1- propanamínio); **(b)** Estrutura molecular do lipídeo DOPE (L-α-dioleoil fosfatidiletanolamina) (SILVA, 2015).

Lipossomas são estruturas biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicas formadas na maioria das vezes por fosfolipídios, que em meio aquoso se auto agregam espontaneamente em vesículas resultando em uma bicamada esférica, cujo diâmetro pode variar de dezenas de nanômetros até dez micrômetros (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Especialmente, os lipossomas que contém lipídeos com carga positiva em sua superfície, chamados de lipossomas catiônicos têm sido utilizados para a veiculação de DNA *in vitro* e *in vivo*, pois permite sua complexação eletrostática, devido ao DNA possuir carga negativa, protegendo-o assim contra possíveis degradações (LIMA *et al.*, 1999).

A lipofecção, ou seja, a entrada do lipoplexo (complexo formado por uma mistura de DNA e lipossoma) nas células é facilitada devido à sua semelhança com a membrana celular (PATHAK; PATNAIK; GUPTA, 2009). Apesar de promissores, a entrega gênica efetuada por lipossomas catiônicos ainda é baixa se comparada com

vetores virais. O baixo tempo de vida dos lipoplexos, sua inativação por proteínas e a sua alta toxicidade em elevadas concentrações (pela presença de lipídeos catiônicos), são algumas das razões. Além de poderem apresentar super-estabilização do lipoplexo, inibindo a liberação do DNA no interior da célula (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

3.6. A Raiva

A raiva é uma doença viral que está presente e é endêmica em todos os continentes com exceção da Antártida. Está em décimo lugar no ranking de mortalidade de doenças infecciosas. Apesar de ser conhecida desde a antiguidade, ainda é a causa da morte de 50 a 60 mil pessoas por ano mundialmente (COLEMAN; FÈVRE; CLEAVELAND, 2004). É negligenciada particularmente nos continentes Africano e Asiático, onde ocorrem 95% dos casos reportados (WHO, 2016).

É uma antropozoonose, que normalmente é transmitida para o homem através de arranhadura ou mordedura do animal infectado. A transmissão pode ocorrer também com o contato direto da saliva do animal com a mucosa da vítima ou em feridas recentes (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOSKA, 2009). A transmissão de humano para humano por mordedura é extremamente incomum. Raramente a raiva pode ser contraída por inalação de aerossol contendo o vírus ou transplante de órgãos infectados. A ingestão de carne crua ou outros tecidos de animais infectados não é conhecido como fonte de infecção humana. O vírus da raiva está principalmente contido na saliva dos animais, mas lágrimas, urina, e outros fluidos corporais também podem ser infecciosos (WHO, 2010).

Consiste em uma doença aguda do Sistema Nervoso Central (SNC) e acomete apenas em mamíferos. Existem dois tipos clínicos de manifestação da raiva: a furiosa e a parálitica. A raiva furiosa é a forma mais comum nos casos de raiva em humanos, cerca de 80% e ocorrem manifestações de inquietação e excitação. Já na parálitica incidem mais os atos depressivos do sistema nervoso (WHO, 2010). A raiva senão tratada, independentemente do tipo clínico de manifestação, leva a óbito em 100% dos casos. A raiva pode ser prevenida através da vacinação e também logo após o contato com o animal infectado (HAUPT, 1999).

O principal desafio na terapia contra a raiva é o tratamento de pacientes que desenvolveram a doença além dos cuidados paliativos. Em 2005, foi reportado um

caso de sobrevivência de uma garota de 15 anos não vacinada, após um tratamento que inclui a indução de coma, terapia antiviral e intenso suporte médico, esta estratégia foi denominada de Protocolo de Milwaukee. Este tipo de tratamento teve um pequeno número de casos de sucesso, porém um número crescente de falhas. A vacinação de animais domésticos ou de criação é considerada a melhor medida de prevenção em áreas de risco (HICKS; FOOKS; JOHNSON, 2012).

3.7. Vírus da Raiva e a Proteína G

O vírus da raiva pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, gênero Lyssavirus. Exibe o formato de bala de fuzil característica dos rabdovírus (Figura 6), mede aproximadamente 180 nm de comprimento e 75 nm de diâmetro e sua constituição química é de 2-3% de RNA, 3% de carboidratos, 26% de lipídeos e 67% de proteínas (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOSKA, 2009; OPORTO *et al.*, 2009).

Figura 6 - Esquema do vírus rábico e suas proteínas estruturais. O vírion exibe o formato de bala de fuzil e é composto por ribonucleocapsídeo helicoidal (RNP-M) e envelope viral formado por glicoproteínas espiculadas (G) (CHAVES, 2010).

A espécie *Rabies virus* (RABV) possui RNA de fita simples negativa, linear, anti-senso e não segmentado. Seu genoma (Figura 7) contém aproximadamente 12 kb, possui massa molecular de $4,6 \times 10^6$ kDa e codifica cinco proteínas: uma

nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P, NS ou M1), a proteína matriz (M ou M2), uma RNA polimerase (L) e a glicoproteína (G) ou RVGP (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOSKA, 2009). O vírus é inativado através de luz solar, aquecimento, dessecação e através de agentes químicos como detergentes, acetona, álcool e formol (NIGG; WALKER, 2009).

Figura 7 - O genoma do vírus rábico é constituído por cinco genes de proteínas: uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P, NS ou M1), uma proteína matriz (M ou M2), uma RNA polimerase (L) e uma glicoproteína (G) ou RVGP. Adaptado de (TORDO *et al.*, 1986).

A proteína G é composta por 524 aminoácidos (codificada entre um ATG na posição 3318 e um TGA na posição 4890) e contém a maioria dos sítios antigênicos (TORDO *et al.*, 1986). É uma proteína transmembrana que forma integralmente o envelope viral a partir de moléculas agrupadas na forma de 400 espículas triméricas. Cada espícula possui 9 nm e é formada por 3 monômeros de 65 kDa, que são responsáveis pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira (ROSS; FAVI; VÁSQUEZ, 2008). Após a entrada na célula via endocitose o ribonucleocapsídeo é liberado no citoplasma, onde acontece a replicação do RNA e a tradução das cinco proteínas. O material genético é encapsidado e liberado da célula através do brotamento na membrana plasmática (KOTAIT; CARRIERI; TAKAOSKA, 2009).

Em sua estrutura, a glicoproteína possui: um peptídeo sinal que está ausente em sua forma madura, um ectodomínio que possui oito sítios antigênicos (a, I - VI e G1), um domínio hidrofóbico transmembranário e um domínio hidrofílico intracitoplasmático (GAUDIN *et al.*, 1992). Durante sua síntese, os trímeros são formados e ocorrem três tipos de modificações pós-traducionais, sendo estas: uma palmitolação em sua região transmembrana, uma acetilação e N-glicosilações que são cruciais para manter a função biológica da proteína, que podem variar de uma a seis em seu ectodomínio (GAUDIN *et al.*, 1992; SHAKIN-ESHLERNANS *et al.*, 1992). Os sítios antigênicos II e III presentes no ectodomínio possuem a maior representação de epítomos para anticorpos neutralizantes, sendo que o sítio III está presente apenas na forma trimérica da proteína, como pode ser observado na Figura 8 (ROSS; FAVI; VÁSQUEZ, 2008).

Figura 8 - Ilustração representativa das vistas lateral e superior da glicoproteína do vírus da raiva em sua forma trimérica. (MONTEIRO, 2014)

3.8. Vacinas antirrábicas

A primeira vacina antirrábica foi desenvolvida através da obtenção de vírus atenuado em tecido nervoso dessecado, há mais de 100 anos por Louis Pasteur e seus colegas. Apesar da melhora contínua através dos anos, este tipo de vacina causa reações neurológicas adversas. São vacinas menos potentes e por isso numerosas imunizações diárias são necessárias. Ainda é utilizada em alguns países da Ásia, devido ao baixo custo e disponibilidade local (WHO, 2010).

Atualmente a vacina que tem sido administrada a milhões de pessoas em todo o mundo, consiste de vírus inativado após a propagação em ovos embrionados ou em cultura de células (ex.: Vero). Após o crescimento em culturas celulares, os vírus são concentrados, inativados e liofilizados. Este tipo de vacina induz uma resposta de anticorpos maior que 99% em pessoas pré ou pós-expostas ao vírus (WHO, 2010).

Ainda há também dois tipos de vacinas recombinantes comerciais disponíveis, porém apenas para uso veterinário. Uma delas é composta pelo vírus vaccínia vivo recombinante e a outra por adenovírus vivo recombinante, ambos contêm a sequência da proteína G do vírus da raiva em seu gene (FEHLNER-GARDINER *et al.*, 2012).

Embora estas vacinas contra a raiva sejam eficientes e tenham metodologia de produção bem consolidada, é do maior interesse o desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de vacinas mais seguras, como também para o barateamento do processo de produção. Além disso, estes desenvolvimentos tecnológicos encontram justificativa em fatores como biossegurança, eficiência vacinal e controle de produção (ERTL, 2009).

Sendo a raiva uma das poucas doenças virais que atingem humanos e animais e pode ser controlada por vacinas conceitualmente iguais, o desenvolvimento de vacinas encontra na infecção/vacinação um modelo sem igual para o estudo de abordagens vacinais variadas, na medida em que estas podem ser testadas adequadamente. Nesse contexto, muitos estudos têm sido realizados para a

substituição da vacina clássica contra a raiva por outras com tecnologia recombinante (ERTL, 2009; NIGG; WALKER, 2009).

Diversos estudos utilizam plasmídeos contendo a proteína G como vetor de imunização *in vivo* (ULLAS, 2012). No geral, os resultados indicam lenta e modesta indução de anticorpos neutralizantes contra o vírus da raiva. As respostas imunológicas de uma dose de vetores plasmidiais se mostraram bem abaixo de uma dose da vacina tradicional de vírus inativado, porém estas respostas podem ser aumentadas a partir de imunização repetida, com o uso de adjuvantes. (ERTL, 2009).

Portanto é possível afirmar que a clonagem da proteína G em plasmídeos e a expressão desta proteína em diversos sistemas é uma estratégia promissora para novas vacinas antirrábicas (HICKS; FOOKS; JOHNSON, 2012). Sendo os principais desafios: a baixa imunogenicidade e a necessidade de doses mais elevadas em animais maiores. A coentrega com adjuvantes é uma abordagem que necessita estudos mais aprofundados (ULLAS, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1. Clonagem do gene RVGP no DNA plasmidial pVAX1

O plasmídeo pVAX1RVGP foi preparado a partir da substituição do gene repórter GFP presente no plasmídeo pVAX1GFP (3,7 kpb), pelo gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) da cepa Pasteur. A sequência gênica codificante para a proteína RVGP obtida através do plasmídeo pCMV-RVGP. Esta foi amplificada por PCR (1575 pb) utilizando-se os sítios de restrição *EcoRI* e *XbaI*. O produto da reação de ligação, plasmídeo pVAX1RVGP, foi utilizado para eletroporar células de *Escherichia coli* DH10B. Colônias isoladas foram selecionadas em meio LB-ágar suplementado com 30 µg/mL de kanamicina e cultivadas em meio LB suplementado com 30 µg/mL de kanamicina a 37°C por 16 horas. A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit Plasmid DNA extraction kit (GE Healthcare, GB), seguindo as instruções do fabricante. A inserção da sequência gênica de interesse foi confirmada por digestão enzimática utilizando-se as enzimas *EcoRI* e *PmeI*. Não foi possível utilizar a enzima *XbaI* para este ensaio, pois esse sítio é metilado após sua síntese. Estes procedimentos foram realizados com o auxílio do pesquisador Dr. Marcelo Augusto Szymanski de Toledo no Instituto Butantan como uma das atividades propostas em seu período como bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial – DTI (CNPq).

O plasmídeo pVAX1RVGP possui, além do gene da RVGP, também a origem de replicação bacteriana pMB1, promotor do vírus CMV (citomegalovírus humano), região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH), e o gene de seleção em bactéria KanR, que confere resistência ao antibiótico kanamicina. O plasmídeo contém 4541 pb, sendo que o gene da RVGP possui 1575 pb. O mapa do vetor plasmidial pVAX1RVGP, apresentando as sequências descritas acima, pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Mapa do vetor plasmidial pVAX1RVGP construído com o uso do *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA). O plasmídeo contém 4541 pb e possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pUC, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH), e o gene de seleção em bactéria KanR, que confere resistência ao antibiótico kanamicina.

4.2. Sequenciamento do gene da RVGP no plasmídeo pVAX1RVGP

De modo a verificar toda a sequência do gene da RVGP inserido no plasmídeo pVAX1RVGP, novos *primers* foram desenhados para anelar na região intermediária do gene como pode-se observar na Tabela 1. Para a região inicial e terminal do gene foram utilizados *primers* comerciais de sequências já conhecidas (T7 e BGH, respectivamente) que reconhecidamente se anelam a sequências que flanqueiam o sitio de inserção do gene no plasmídeo. O sequenciamento foi realizado pela empresa Exxtend (Brasil), que utilizou a técnica de sequenciamento de Sanger.

Tabela 1 - Sequência e Temperatura de *Melting* (T_m) dos *Primers* Intermediários Direto e Reverso e desenhados para amplificar a região intermediária do gene da RVGP inserido no plasmídeo pVAX1.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	T_m (°C)
Intermediário Direto	TGTAAAAACCAAGGAGTCT	53,9
Intermediário Reverso	TTAAGACATTGCCGTCAG	50,3

Após o alinhamento realizado no *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA) da sequência de nucleotídeos obtida, a sequência foi submetida a análise de Homologia com o BLAST através da página da Web do NCBI.

4.3. Transformação de células *Escherichia coli* DH10B com DNA plasmidial

Células *Escherichia coli* DH10B previamente competentes obtidas através do método $MgCl_2$ - $CaCl_2$ (SAMBROOK; FRITCH; MANIATIS, 2001) foram transformadas com o plasmídeo pCMV-RVGP, segundo o método de choque térmico (*Heat Shock*) descrito por Froger e Hall (2007). A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A verificação do inserto foi confirmada por PCR utilizando *primers* que flanqueiam o gene. A quantidade de pares de base foi verificada através da linearização do plasmídeo por digestão enzimática com a enzima *EcoRI*, de acordo com o protocolo do fabricante (Fermentas, EUA).

O plasmídeo pCMV-RVGP gentilmente cedido pela pesquisadora Dra. Soraia Jorge do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pMB1, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), íntron quimérico dos genes da β -globina humana e cadeia pesada de imunoglobulina, região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do vírus SV40, e o gene de seleção em bactéria AmpR, que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

Esse plasmídeo contém ao todo 7950 pb, sendo que o gene da RVGP possui 1575 pb; e apesar de não ser o mais adequado para vacinas de DNA, possui todos os elementos necessários para a transcrição do gene RVGP em células de mamífero. O íntron quimérico presente na sequência do plasmídeo tem a função de aumentar a expressão heteróloga em células de mamífero (CHAPMAN *et al.*, 1991). É importante salientar que a cauda His presente não é transcrita, pois a sequência da RVGP possui um stop códon em sua terminação. A construção do plasmídeo está descrita por Bernardino (2015). O mapa do vetor plasmidial pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Mapa do vetor plasmidial pCMV-RVGP construído com o uso do *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA). O plasmídeo contém 7950 pb e possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pMB1, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), íntron quimérico dos genes da β -globina humana e cadeia pesada de imunoglobulina, região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do vírus SV40, e o gene de seleção em bactéria AmpR, que confere resistência ao antibiótico ampicilina.

4.4. Inserção da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1RVGP

Com o objetivo de adicionar a sequência de KOZAK (GCCACCATGG) à montante da sequência do gene da RVGP, *primers* foram desenhados contendo a sequência de KOZAK, bem como a sequência das enzimas de restrição *KpnI* e *XbaI*. Houve a preocupação da mudança de um nucleotídeo no *stop* códon no *primer* reverso (TTA ao invés de TAA), com o intuito de que novo plasmídeo não sofra metilação no sítio de restrição *XbaI*.

Utilizando-se o plasmídeo pVAX1RVGP, a sequência do gene foi amplificada por PCR com os *primers* descritos acima. Devido a metilação no sítio de restrição *XbaI*, a inserção do produto de PCR foi realizada através da substituição do gene repórter GFP do plasmídeo pVAX1GFP utilizando-se os sítios de restrição *KpnI* e *XbaI*, na proporção de 3:1.

Tabela 2 - Sequência e Temperatura de *Melting* (T_m) dos *Primers* KOZAK Direto e Reverso desenhados para amplificar o gene da RVGP inserido no plasmídeo pVAX1RVGP. Sequência de KOZAK representada em negrito, sequência da enzima de restrição *KpnI* em laranja, sequência da enzima de restrição *XbaI* em azul e nucleotídeo modificado no *stop* códon em vermelho.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	T _m (°C)
KOZAK Direto	TTAGGTACC GCCACC ATGGTTCCTCAGGCTCTC	67,5
KOZAK Reverso	GACGCGTCTAGATTACAGTCCGGTCTCCCA	65

O produto da reação de ligação, plasmídeo pVAX1kRVGP, foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B. Utilizou-se a mesma técnica descrita na seção 4.3. Transformação de células *Escherichia coli* DH10B com DNA plasmidial.

Colônias isoladas foram selecionadas em meio LB-ágar suplementado com 30 µg/mL de kanamicina e cultivadas em meio LB suplementado com 30 µg/mL de kanamicina a 37°C *overnight*. A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando-se o kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A inserção da sequência gênica de interesse foi confirmada por digestão enzimática utilizando-se a enzima *SpeI* e por sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (Campus de São Paulo), que utilizou a técnica de sequenciamento de Sanger. Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos descritos anteriormente na seção 4.2. Sequenciamento do gene da RVGP no plasmídeo pVAX1RVGP.

4.5. Ensaios de transfecção em células BHK-21 para expressão do gene da RVGP

4.5.1. Crescimento e passagem de células BHK-21

Os cultivos de células BHK-21 foram realizados em frascos T de 25 cm² (volume de trabalho de 5 mL) e em frascos T de 75 cm² (volume de trabalho de 12 mL); contendo meio de cultura DMEM (Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Life Technologies, EUA) livre de antibióticos; incubados a temperatura de 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂.

As passagens das células foram realizadas todas as vezes em que a confluência celular de aproximadamente 80% foi atingida, sendo necessária a lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) para a retirada do SFB e em seguida adição de Tripsina

(Life Technologies, EUA) para o desprendimento das células aderidas no frasco. A concentração celular foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer.

4.5.2. Ensaio de transfecção in vitro de células BHK-21 utilizando Lipofectamina e a proteína T-Rp3

A realização dos ensaios de transfecção com Lipofectamina 2000 (1 mg/mL) (Invitrogen, EUA) e com a proteína T-Rp3, foram realizadas em placas de 6 poços. Em cada poço adicionou-se 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB livre de antibióticos contendo células BHK-21 de modo a atingir-se a confluência requerida (entre 50% e 90%) após 24h de semeadura a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂.

O procedimento de formação de lipoplexos pDNA:lipofectamina foi realizado em tubos Eppendorf estéreis contendo meio Opti-MEM (Life Technologies, EUA) sem SFB e sem complementos a temperatura ambiente, sendo que as relações massa/volume (µg/µL) variaram em 1:1; 1:1,5; 1:2,5; 1:3 e 1:5. O mesmo procedimento foi realizado para a formação de complexos pDNA:T-Rp3, porém em relações molares que variaram em 1:1000; 1:8000 e 1:15000.

Em um tubo incubou-se pDNA em meio Opti-MEM, enquanto em outro incubou-se Lipofectamina ou T-Rp3 em meio Opti-MEM, durante 5 minutos. Em seguida, o conteúdo do tubo contendo o vetor de entrega foi adicionado no tubo contendo pDNA, conferindo um volume final de 500 µL. Após 10 minutos de incubação, para a T-Rp3 e 20 minutos para a Lipofectamina, o complexo formado foi gotejado no poço e a placa foi incubada a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 6 horas. Após esse tempo o meio contendo os complexos foram removidos e em cada poço adicionou-se 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB livre de antibióticos. As placas continuaram incubadas por tempos que variaram entre 24 e 120 horas, a partir do tempo zero de transfecção.

Para ensaios de transfecção sem SFB, o poço continha 500 µL de Opti-MEM no momento da transfecção, e para transfecções na presença de SFB o poço continha 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB livre de antibióticos, recém adicionado.

4.5.3. Preparação de amostras de células transfectadas para avaliação da expressão da RVGP

Alternativamente à Tripsina, uma solução de PBS 1X contendo 5 mM de EDTA foi utilizada para desprender as células BHK-21 após a transfecção, de modo a preservar a RVGP eventualmente localizada na membrana celular. O pellet de células obtido por centrifugação foi imediatamente utilizado em algum ensaio de avaliação de expressão do gene da RVGP ou armazenado em ultrafreezer (-80°C) após suspensão em tampão de congelamento (25 mM Tris, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 1 mM PMSF) com 20% de glicerol, para posterior análise.

4.6. Detecção da expressão do gene *RVGP* através de PCR quantitativo da transcrição reversa - qRT-PCR

De modo a confirmar e caracterizar o padrão da expressão da RVGP através de células BHK-21 transfectadas, ensaios de qRT-PCR foram realizados no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan de acordo com o protocolo desenvolvido por Puglia (2014) .

Inicialmente o material genético das células BHK-21 transfectadas foi extraído com o kit Pure Link™ RNA Mini Kit (Life Technologies, EUA), segundo as informações do fabricante. As amostras obtidas foram tratadas com DNase (Promega, EUA), e submetidas à síntese de cDNA por transcrição reversa com a enzima SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Com o objetivo de analisar o sucesso de cada passo do experimento, amplificações por PCR do material genético, do tratamento com DNase e da transcrição reversa foram realizados.

A qPCR foi realizada no equipamento StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). A mistura da reação foi realizada a partir da adição de *primers* na concentração de 50 nM, água, reagentes do kit Kapa Syber (Kapa Biosystems, EUA) e o volume equivalente 3 µg de cDNA. Cada amostra foi distribuída em um poço da placa MicroAmp (Applied Biosystems, EUA) em triplicatas. A placa foi selada, centrifugada e submetida ao seguinte ciclo de amplificação: 95°C /10 minutos, análise da curva de *melting* (60°C a 90°C) e 40 ciclos de (95°C /15 s, 55°C /15 s, 60°C /15 s, 70°C /10 s). A análise da curva de *melting* é realizada com o objetivo de verificar a especificidade da reação.

4.7. Detecção da expressão da proteína RVGP em células BHK-21 através de Imunofluorescência Indireta (IF-I)

Com o objetivo de visualizar a presença da RVGP na membrana celular de células BHK-21 transfectadas, análises em microscópio de fluorescência BX51 (Olympus, EUA), com auxílio do sistema de captação de imagem DP73 (Olympus, EUA) e do *software* CellSens Standard foram realizadas no Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan de acordo com o protocolo recentemente desenvolvido pela Mestranda Nayara Luiz Santos.

O experimento foi realizado em duplicata e utilizou-se duas lamínulas em cada lâmina. Para a aderência das células, a lamínula foi incubada 3 vezes durante 20 minutos. A primeira vez seguida da adição de 40 µL de Poly-D-Lysina (0,1 mg/mL), a segunda vez após a adição de 80 µL de células BHK-21 transfectadas na concentração celular de aproximadamente 3×10^5 células totais e pela última vez foi incubada a -20°C com paraformaldeído 4%. Em seguida a lamínula foi incubada a 4°C com anticorpo primário IgG2a monoclonal anti glicoproteína do vírus da raiva (RV1C5 - LSBio, EUA), que reconhece *full-length virus*, na diluição de 1:400 em PBS durante 1 hora e posteriormente incubada a 4°C com anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado a FITC na diluição de 1:500 em solução Azul de Evans durante 1 hora. De modo a preservar as células marcadas com fluorescência, o reagente SlowFade-Gold antifade reagent (Thermo Scientific, EUA) foi aplicado sobre a lâmina, e em seguida as lamínulas foram depositadas em cima do reagente. Finalmente as lâminas foram visualizadas no microscópio de fluorescência, no qual a amostra é excitada a 488 nm e a luz emitida entre 500 – 600 nm é medida. As imagens foram capturadas no aumento de 20x.

4.8. Quantificação da expressão da proteína RVGP em células BHK-21 através de Citometria de Fluxo

O protocolo descrito a seguir foi padronizado alternativamente a utilização do ELISA para quantificar a expressão da RVGP nas células BHK-21 transfectadas. A citometria de fluxo é um método que consiste em uma análise quantitativa que caracteriza populações celulares em nível individual enquanto são iluminadas por raio laser (DÍAZ *et al.*, 2010).

Amostras contendo 2×10^5 células transfectadas foram submetidas à centrifugação

(200g durante 5 minutos). O pellet de células obtido foi lavado com 100 µL de uma solução estéril de tampão PBS com 10% de SFB e centrifugado a 200g durante 5 minutos. Em seguida o pellet obtido foi incubado durante 30 minutos a 4°C após suspensão em 100 µL da diluição de 1:3500 do anticorpo IgG2a monoclonal anti-RVGP (RV1C5 - LSBio, EUA) em tampão PEB. Após a incubação a amostra foi centrifugada a 200g durante 5 minutos. Posteriormente, o pellet obtido foi incubado durante 30 minutos a 4°C no escuro após suspensão com 100 µL da diluição de 1:200 do anticorpo anti-camundongo IgG2a conjugado a FITC (Santa Cruz Biotechnology, EUA) em tampão PEB. Finalmente, o pellet obtido por centrifugação (200g durante 5 minutos) foi suspenso em 200 µL de tampão PEB e analisado por citometria de fluxo (BD FACS Canto II – BD, EUA), situado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Em cada análise, as amostras foram excitadas a 488 nm e a emissão foi medida com filtro de 525 nm. Para a quantificação da expressão, as análises se basearam na aquisição de 20.000 eventos por ensaio. Os limiares de fluorescência foram obtidos a partir de uma suspensão de células não transfectadas (controle negativo), portanto apenas valores acima do limiar, foram considerados como positivos na expressão de RVGP.

4.9. Expressão em *Escherichia coli* e purificação da proteína recombinante T-Rp3

Este protocolo foi desenvolvido no âmbito da dissertação de mestrado da aluna Marianna Favaro (FAVARO, 2012). Para a produção da proteína recombinante T-Rp3, células *Escherichia coli* BL21 (DE3) Rosetta contendo os plasmídeos de expressão da T-Rp3 foram cultivadas em 1 L de meio LB na presença de kanamicina sob agitação de 300 rpm a 37°C, até atingir a DO600 de 0,8. A expressão da T-Rp3 foi induzida com Lactose na concentração de 5,6 mM sob agitação de 200 rpm a 28°C. Após centrifugação o pellet de células foi suspenso em 50 mM Tris (pH=7,0), 1 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 15 mM β-mercaptoetanol e 1 mM PMSF. A lise celular foi realizada por sonicação (6 ciclos de 60 segundos), a T-Rp3 foi purificada por um único passo de cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA, e eluída com um gradiente de imidazol em tampão de suspensão. A avaliação da pureza da purificação foi realizada por eletroforese em gel de acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A

proteína foi dialisada em tampão MES 50 mM com pH=6,0, aliquotada em criotubos e armazenada em ultrafreezer a -80°C.

4.10. Determinação das características físico-químicas dos complexos binários formados com pDNA e Lipofectamina

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do potencial zeta, os complexos binários foram formados de acordo com a seção 4.5.2. Ensaio de transfecção *in vitro* de células BHK-21 utilizando Lipofectamina e a proteína T-Rp3, sendo que as relações massa/volume ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) variaram em 1:1; 1:3 e 1:5 com 1 μg de pDNA e um volume final de 40 μL para medições sem SFB. Para medições com SFB o volume final foi de 36 μL .

Após a formação do complexo foi adicionado 960 μL de água Milli-Q, totalizando um volume final de 1 mL, que foi transferido para a cubeta de análise (ZEN1002/ DTS 1061). De modo a mimetizar o complexo na transfecção com a presença de SFB, após a formação do complexo foi adicionado 4 μL de SFB (10% do volume final) e então 960 μL de água Milli-Q.

O meio Opti-MEM, o SFB e a água Milli-Q utilizados foram filtrados em membranas 0,22 μm anteriormente à formação de complexos. Todas as medidas foram feitas em duplicatas a 25°C, de modo que as amostras foram estabilizadas por 2 minutos no equipamento antes da leitura. Após a medida do diâmetro hidrodinâmico médio, realizou-se a medida do potencial zeta, para a mesma amostra. Todas as medidas de caracterização dos complexos foram realizadas no equipamento ZetaSizer (Malvern, GB) situado no laboratório coordenado pela professora Dra. Iolanda M. Cuccovia do Instituto de Química da USP.

4.11. Metodologia Estatística

Para a quantificação da dispersão dos dados experimentais obtidos neste trabalho, calcularam-se as médias e desvios padrões das amostras com o programa Microsoft Office Excel (Microsoft, EUA). As análises de variância (ANOVA) e testes de Tukey, com $\alpha=0,05$, foram realizadas no Excel a partir da extensão Action Stat Pro (Estatcamp, BR).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Clonagem e sequenciamento do gene RVGP no DNA plasmidial pVAX1

O plasmídeo pVAX1 é um vetor de uso comercial, desenvolvido pela Invitrogen, EUA, e designado para o uso no desenvolvimento de vacinas de DNA. Têm como característica o elevado número de cópias de replicação em *Escherichia coli* e o alto nível de expressão transiente da proteína de interesse na maioria das células animais. O vetor foi construído buscando-se seguir as diretrizes da *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) (LIFE TECHNOLOGIES, 2012).

Neste estudo, o primeiro passo foi a inserção do gene RVGP no plasmídeo pVAX1. O gene da RVGP foi amplificado a partir do plasmídeo pCMV-RVGP, gentilmente doado pela pesquisadora Dra. Soraia Jorge do Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan. No total, 12 clones foram isolados e avaliados para quanto a inserção do gene da RVGP. A confirmação da clonagem foi efetuada através de um ensaio de digestão com as enzimas *PmeI* e *EcoRI*, conforme a Figura 11.

Figura 11 - a) Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada como controle, contendo o gene RVGP do plasmídeo pCMV-RVGP. Legenda: M - marcador molecular; 1 - digestão da RVGP purificada, utilizada como inserto. b) Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção do gene *RVGP* no plasmídeo pVAX1 em diversos clones através de análise de restrição. Legenda: M - marcador molecular; 1 a 12 - digestão dos 12 clones do plasmídeo pVAX1RVGP com as enzimas de restrição *PmeI* e *EcoRI*, bandas com aproximadamente 1600 pb.

Pode-se observar que os clones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11 e 12, apresentaram fragmentos indesejados, indicando contaminação. Portanto o clone 9, que apresentou apenas as duas bandas desejadas foi escolhido, para novamente transformar células *Escherichia coli* DH10B. A transformação *via* eletroporação foi confirmada através de ensaios de purificação de DNA plasmidial e eletroforese em gel de agarose. Utilizando-se o plasmídeo purificado, ensaios de PCR e digestão foram realizados de modo a confirmar a presença do gene RVGP, conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção do gene *RVGP* no plasmídeo pVAX1 através de análise de restrição e amplificação do gene por PCR. Legenda: M - marcador molecular; 1 - amostra do plasmídeo pVAX1RVGP purificado (clone 9); 2 - resultado da reação de PCR para amplificação do gene *RVGP* do plasmídeo pVAX1RVGP (clone 9); 3 - digestão do plasmídeo pVAX1RVGP (clone 9) com a enzima de restrição *EcoRI*.

De modo a certificar que a sequência da *RVGP* foi inserida corretamente e que não apresenta mutações que interfiram em sua expressão, enviou-se amostras do plasmídeo pVAX1RVGP para o sequenciamento. A partir do alinhamento, que pode ser visto na Figura 13, é possível observar na posição 1721 uma Citosina ao invés de Timina. Apesar desta diferença na sequência de nucleotídeos, o mesmo aminoácido (Serina) é codificado, não sendo, portanto, um impedimento à continuidade dos trabalhos.

Figura 13 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos realizados utilizando-se o *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA) a partir do sequenciamento dos clones “9” e “A” do plasmídeo pVAX1RVGP, respectivamente.

Buscou-se também certificar que o códon encontrado não traria problemas à tradução da proteína em células de mamífero, por ser um “códon raro”. As células

BHK-21 são células de rim de hamster bebê, um roedor da espécie *Mesocricetus auratus*. Na Figura 14 é possível observar que o códon AGC possui grande quantidade de tRNAs, maior até que para o códon AGT (AGU) da sequência original. Portanto não é um códon raro e, teoricamente, a correta tradução da RVGP em células de mamífero BHK-21 não seria comprometida.

***Mesocricetus auratus* [gbrod]: 330 CDS's (141900 codons)**

fields: [triplet] [frequency: **per thousand**] ([number])

UUU 17.4(2474)	UCU 15.1(2139)	UAU 12.7(1802)	UGU 9.4(1338)
UUC 25.1(3557)	UCC 18.2(2578)	UAC 17.7(2507)	UGC 12.6(1788)
UUA 5.4(767)	UCA 10.5(1487)	UAA 0.7(93)	UGA 1.2(176)
UUG 13.2(1872)	UCG 4.0(566)	UAG 0.7(93)	UGG 12.9(1837)
CUU 12.6(1789)	CCU 17.8(2532)	CAU 10.0(1421)	CGU 4.9(700)
CUC 20.3(2878)	CCC 19.6(2786)	CAC 15.1(2138)	CGC 9.5(1351)
CUA 6.9(978)	CCA 17.1(2426)	CAA 10.7(1514)	CGA 6.3(892)
CUG 41.7(5918)	CCG 5.5(779)	CAG 34.9(4948)	CGG 9.8(1390)
AUU 15.6(2220)	ACU 13.5(1911)	AAU 15.9(2254)	AGU 11.7(1655)
AUC 24.1(3418)	ACC 21.8(3098)	AAC 23.1(3274)	AGC 18.9(2676)
AUA 6.3(897)	ACA 15.7(2225)	AAA 20.0(2844)	AGA 11.0(1555)
AUG 24.1(3420)	ACG 5.8(830)	AAG 35.6(5048)	AGG 11.1(1580)
GUU 9.4(1340)	GCU 19.3(2735)	GAU 19.7(2797)	GGU 11.6(1640)
GUC 16.2(2303)	GCC 27.2(3857)	GAC 28.5(4044)	GGC 21.3(3020)
GUA 6.6(936)	GCA 14.5(2056)	GAA 24.7(3501)	GGA 16.7(2373)
GUG 30.2(4285)	GCG 5.8(829)	GAG 38.7(5491)	GGG 16.0(2274)

Figura 14 - Códon da espécie *Mesocricetus auratus*. As células BHK-21 são células de rim de hamster bebê provenientes desta espécie de roedor. Em vermelho estão os códon AGU (sequência original da RVGP) e AGC (códon modificado). Ambos codificam para o aminoácido Serina (KAZUSA, 2007).

A análise de homologia realizada através da ferramenta BLAST (NCBI, EUA) resultou em 99% de identidade com a sequência completa da glicoproteína do vírus da raiva cepa PV11, o que confirmou a presença correta do gene da RVGP inserido no plasmídeo pVAX1.

Como comentado na seção anterior, o plasmídeo pCMV-RVGP foi utilizado com controle positivo nos ensaios de avaliação da expressão da RVGP em células BHK-21. Para isso, células *Escherichia coli* DH10B foram transformadas com o plasmídeo, o que foi confirmado através de ensaios de purificação plasmidial, amplificação por PCR e ensaio de digestão, esse último para confirmar seu tamanho. Os resultados podem ser vistos na Figura 15.

Figura 15 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção do gene *RVGP* no plasmídeo pCMV através de análise de restrição e amplificação do gene por PCR. Legenda: M - marcador molecular; 1 - amostra do plasmídeo pCMV-RVGP purificado; 2 - resultado da reação de PCR para amplificação do gene *RVGP* do plasmídeo pCMV-RVGP; 3 - digestão do plasmídeo pCMV-RVGP com a enzima de restrição *EcoRI*.

5.2. Avaliação da expressão do gene da RVGP

Após a confirmação do sucesso na clonagem, buscou-se avaliar e confirmar a expressão do gene da RVGP em células de BHK-21 transfectadas. De forma a garantir o sucesso na etapa de transfecção, utilizou-se a Lipofectamina como agente de transfecção. Após a transfecção com os complexos formados por pVAX1RVGP:Lipofectamina, as células foram analisadas através dos seguintes métodos: quantificação de mRNA da RVGP através de qRT-PCR, *Western Blotting*, Imunofluorescência Indireta, ELISA e Citometria de Fluxo. Como controle positivo destes experimentos foi utilizado o plasmídeo pCMV-RVGP. A seguir apresentam-se os principais resultados obtidos nessa etapa do estudo.

5.2.1. Quantificação de mRNA da RVGP através de qRT-PCR

De modo a confirmar a transcrição do mRNA contendo o gene do RVGP, amostras de células BHK-21 transfectadas com lipoplexos de pDNA:Lipofectamina na relação massa/volume de 1:1,5 com 5 µg de pDNA na confluência de 80% foram coletadas nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção. Utilizou-se como controle positivo (CP) o plasmídeo pCMV-RVGP e como controle negativo (CN), células BHK-21 não transfectadas.

As amostras de material genético extraído das células, submetidas a tratamento com DNase e transcrição reversa para a síntese de cDNA, foram amplificadas através de uma reação de PCR convencional. Nessa reação foi utilizado um par de *primers*

que amplificam fragmentos de 503 pb do gene RVGP. Para verificar a eficiência de cada etapa do experimento, as amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (APÊNDICE A - Eletroforese em Gel de Agarose realizada para análise de fragmentos amplificados nas etapas de extração de material genético, tratamento com DNase e síntese de cDNA).

Nos poços contendo material genético extraído das células transfectadas, é possível perceber que ambos os plasmídeos foram bem-sucedidos na entrada celular e que diversas bandas, além da esperada, aparecem também no controle negativo, indicando que os *primers* utilizados amplificaram sequências não específicas da BHK-21. Pôde-se também verificar que, no geral, o tratamento com DNase foi efetivo, apesar de aparecerem bandas bem fracas nas amostras de 48 horas de ambos os plasmídeos.

Quanto a síntese de cDNA, só é possível verificá-la mais fortemente nas amostras de 24 e 48 horas de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP, indicando que o mRNA é transcrito em pequenas quantidades após esse tempo. Ainda assim, existe dúvida quanto a real quantidade de cDNA na amostra de 48h, devido à baixa eficiência do tratamento com DNase. O fato de aparecerem bandas muito fracas nas amostras de células transfectadas com o plasmídeo pVAX1RGVP indica a baixa transcrição do mRNA e, portanto, baixa expressão da RVGP.

Após a confirmação de cDNA, mesmo em baixas quantidades, foi realizada quantificação em PCR em tempo real utilizando-se um novo par de *primers* que amplifica fragmentos menores, de 177 bp, pois os *primers* previamente utilizados amplificaram fragmentos genômicos da BHK-21. Na Figura 16 estão os gráficos contendo curvas de *melting* obtidos através da reação de qRT-PCR.

O primeiro gráfico (a) reflete a curva de *melting* de todas as amostras, nele é possível perceber que as amostras de água (picos menores), não foram amplificadas, indicando que a água utilizada neste experimento não continha contaminação com material genético. Nota-se a existência de curvas com dois picos nas amostras das células transfectadas, um na temperatura de $\approx 83^{\circ}\text{C}$ e outro em $\approx 87^{\circ}\text{C}$, resultantes da inespecificidade dos *primers* utilizados, apesar da utilização de pares diferentes, portanto, neste experimento não há como quantificar o mRNA produzido.

Nos gráficos b e c da Figura 16 são apresentadas as curvas de *melting* do controle positivo e controles negativos, separadamente. O controle positivo apresenta um

único pico, com temperatura de *melting* equivalente a $\approx 83^{\circ}\text{C}$ e os controles negativos, apresentam curvas com dois picos, um menor na temperatura de $\approx 83^{\circ}\text{C}$ e outro maior em $\approx 87^{\circ}\text{C}$, todas com o mesmo padrão.

Figura 16 - a) Perfis de *melting* de cDNA obtidos através de transcrição reversa submetidas a qPCR nos diferentes tempos pós-transfecção (24, 48, 72, 96 e 120 horas) dos plasmídeos pCMV-RVGP e pVAX1RVGP, bem como controles negativo, positivo e água. b) Perfil de *melting* contendo apenas a curva do controle positivo. c) Perfil de *melting* contendo apenas as curvas de controle negativo. d) Perfil de *melting* contendo controle positivo e amostras de 48 horas de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP. e) Perfil de *melting* contendo controle positivo, controle negativo e amostras de 48 horas de células transfectadas com o plasmídeo pVAX1RVGP.

Ainda que de forma qualitativa, é possível perceber que nos gráficos d e e,

amostras de 48 horas de cDNA do pCMV-RVGP e pVAX1RVGP, respectivamente, apresentam curvas com dois picos, um na temperatura de $\approx 83^{\circ}\text{C}$ e o outro em $\approx 87^{\circ}\text{C}$. Porém, o primeiro pico apresenta uma altura maior se comparado com o controle negativo, e a mesma temperatura de *melting* de $\approx 83^{\circ}\text{C}$ se comparado com o controle positivo, indicando que o mRNA da RVGP está sendo transcrito, após 48 horas de transfecção de ambos os plasmídeos.

5.2.2. Detecção da expressão da proteína RVGP

Ao verificar a indicação da transcrição do mRNA em células transfectadas a partir do plasmídeo pVAX1RVGP, um ensaio de *Western Blotting* nas mesmas condições que o ensaio de qRT-PCR (resultados não apresentados) foi realizado na tentativa de detectar a expressão da proteína RVGP, porém não foi possível visualizar nenhuma banda relacionada ao plasmídeo pVAX1RVGP, possivelmente indicando que a expressão da RVGP foi baixa demais para que pudesse ser confirmada através desse método de detecção.

Uma vez que por *Western Blotting* não foi possível detectar expressão em células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pVAX1RVGP, optou-se por verificar a expressão da proteína RVGP através do método de Imunofluorescência Indireta. Neste ensaio, utilizou-se células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP como controle positivo, células não transfectadas como controle negativo e a expressão do plasmídeo pVAX1RVGP foi analisada. As amostras de células foram coletadas 40 horas pós-transfecção.

Para a formação dos lipoplexos pDNA:lipofectamina, utilizou-se a relação massa/volume de 1:5 com diferentes quantidades de pDNA. A primeira com 2 μg de pDNA e 10 μL de lipofectamina e a segunda com 4 μg de pDNA e 20 μL de lipofectamina. A relação com 2 μg de pDNA foi utilizada baseando-se em um protocolo, descrito na literatura, que obteve sucesso na transfecção de células BHK-21, com lipofectamina, em placas de 6 poços utilizando-se um plasmídeo de tamanho similar ao pCMV-RVGP (QI *et al.*, 2015). A relação 4 μg de pDNA, foi utilizada de modo a buscar uma maior expressão da RVGP nos plasmídeos, uma vez que o dobro de pDNA foi utilizado.

O resultado do experimento pode ser visualizado na Figura 17. As células BHK-21 utilizadas são aderentes, mas como nesse experimento foram desprendidas da

placa e depositadas na lamínula, estão apresentando o formato esférico.

A partir da visualização da Figura 17a, é possível afirmar que houve especificidade dos anticorpos utilizados e, portanto, a expressão (em verde) que aparece nas figuras a seguir, deve ser relacionada unicamente à presença da proteína RVGP. A partir da inspeção visual das Figura 17b e Figura 17c, é possível verificar a alta expressão da RVGP na membrana celular a partir da transfecção do plasmídeo controle, pCMV-RVGP. A Figura 17b, possui muito mais células se comparada com a Figura 17c, indicando a alta toxicidade de utilização de elevadas quantidades de lipofectamina.

Figura 17 - Detecção da RVGP através do método de Imunofluorescência Indireta partir de células BHK-21 transfectadas, imagens capturadas no aumento de 20x. a) Controle Negativo - células BHK-21 não transfectadas. b) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pCMV-RVGP:lipofectamina na relação massa/volume 1:5 com 2 μ g de pDNA c) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pCMV-RVGP:lipofectamina na relação massa/volume de 1:5 com 4 μ g de pDNA. d) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pVAX1RVGP:lipofectamina na relação massa/volume 1:5 com 2 μ g de pDNA. e) Células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pVAX1RVGP:lipofectamina na relação massa/volume de 1:5 com 4 μ g de pDNA.

A partir da visualização das Figura 17d e Figura 17e, é possível verificar a expressão da RVGP na membrana celular a partir da transfecção do plasmídeo pVAX1RVGP foi baixa, ao menos nas condições utilizadas. Confirmou-se, dessa forma, que a baixa expressão apresentada a partir desse plasmídeo, foi o motivo da não aparição de bandas no método de *Western Blotting*. Este resultado se apresentou de acordo com o estudo de (WANG *et al.*, 2012), em que células BHK-21 foram transfectadas com um plasmídeo pVAX1 contendo a sequência da RVGP e a partir de imunofluorescência indireta também verificou-se um baixo número de células que apresentam expressão, com baixa intensidade de fluorescência.

Ainda que de forma desigual, foi possível verificar a expressão da RVGP a partir de todos os plasmídeos. O plasmídeo pCMV-RVGP apresentou maior eficiência se comparado ao pVAX1RVGP, provavelmente devido ao íntron quimérico presente em sua sequência, que aumenta a eficiência de expressão, ou ainda devido a outras diferenças, como a sequência de poliadenilação diferente (AZZONI *et al.*, 2007). Finalmente, em todos os casos foi possível observar a maior eficiência de transfecção com a utilização de 4 µg de pDNA em relação a 2 µg.

5.2.3. Quantificação da expressão da RVGP e padronização de método quantitativo através de Citometria de Fluxo

Em paralelo aos experimentos de detecção da expressão da RVGP, buscou-se implementar em nosso laboratório uma metodologia de quantificação da eficiência de transfecção de células de mamífero transfectadas pela RVGP. O método geralmente utilizado no Instituto Butantan para a quantificação da expressão da RVGP é o ELISA. Contudo, neste caso, esse método não se mostrou o mais adequado, tanto por problemas logísticos (transporte de amostras), pela grande frequência e número de ensaios a serem realizados, e também pela sensibilidade do método às diferenças apresentadas pelos diferentes vetores. Dessa forma, com o apoio dos pesquisadores do Instituto Butantan, buscamos o desenvolvimento de método de quantificação da expressão da RVGP através de citometria de fluxo.

Durante o desenvolvimento do método, diversos desafios precisaram ser superados, não apenas relativos às etapas de marcação com os anticorpos (diluições, tempo de incubação), mas também relativos ao próprio protocolo de transfecção e coleta das células. Como exemplo desses desafios, adaptações nos protocolos de

cultivo e transfecção precisaram ser feitas de forma a evitar a excessiva acidificação do meio de cultura contendo as células. Em valores de pH relativamente ácidos, obtidos nos poços em tempos prolongados de cultivo, a conformação das proteínas RVGP expostas nas membranas pode ser alterada, prejudicando a interação com o anticorpo utilizado no método de quantificação (GAUDIN *et al.*, 1993).

A seguir, são apresentados os principais resultados dos ensaios de transfecção obtidos utilizando-se o reagente Lipofectamina para a entrega dos plasmídeos pVAX1RVGP e pCMV-RVGP, visando principalmente o desenvolvimento do método de quantificação por citometria de fluxo.

Em um primeiro ensaio de transfecção e quantificação, foram utilizadas 1×10^6 células BHK-21 por amostra, coletadas 48 horas após a transfecção. A transfecção foi realizada utilizando-se uma relação massa/volume de 1:1,5 com 5 μ g de pDNA para a formação do lipoplexo pDNA:lipofectamina. As seguintes diluições de anticorpos foram empregadas na marcação das células coletadas: 1:500 para o anticorpo primário e 1:80 para o anticorpo secundário, equivalente a 0,5 μ g por amostra. Utilizou-se como controle negativo (CN), células BHK-21 não transfectadas. O resultado pode ser observado na Figura 18.

Figura 18 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas pelo lipoplexo pDNA:lipofectamina, na relação massa/volume de 1:1,5 com 5 μ g de pDNA. A diluição utilizada foi de 1:500 para o anticorpo primário e 1:80 para o anticorpo secundário (0,5 μ g/amostra).

Nessa figura é possível observar que apenas as células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP apresentaram expressão da RVGP em um nível detectável. Apesar da baixa expressão, a citometria demonstrou potencial como um método eficiente para a quantificação da expressão da RVGP, necessitando apenas de otimização, por se tratar-se de um ensaio preliminar.

De modo a otimizar o método, um ensaio de titulação de anticorpos foi realizado utilizando-se células transfectadas com o plasmídeo controle pCMV-RVGP, com a mesma relação massa/volume de 1:1,5 com 5 µg de pDNA. As diluições utilizadas foram: 1:200, 1:3500 e 1:500 para o anticorpo primário e 1:200, 1:267 e 1:400 (0,2; 0,15 e 0,1 µg/amostra, respectivamente) para o anticorpo secundário. O número de células utilizado por amostra foi equivalente a 2×10^5 , que foram coletadas após 40 horas de transfecção. Neste ensaio, houve a preocupação de tratar o controle negativo da mesma forma que as células transfectadas, de modo a verificar se não havia ligação inespecífica dos anticorpos primário e secundário. Na Figura 19 é possível observar os resultados deste experimento.

Figura 19 - Titulação de anticorpos para padronização da quantificação da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo. Legenda: S - Células não transfectadas tratadas com os anticorpos. T - Células transfectadas com o plasmídeo controle pCMV-RVGP. A diluição que aparece em frente ao traço é equivalente à diluição do anticorpo primário e, após o traço, ao anticorpo secundário. As diluições utilizadas para o anticorpo primário foram 1:200; 1:3500; 1:500 e para o anticorpo secundário foram 1:200; 1:267 e 1:400 (0,2; 0,15 e 0,1 µg/amostra, respectivamente).

As amostras contendo a letra S representam as células não transfectadas tratadas com os anticorpos, as que contêm a letra T, representam as células transfectadas com o plasmídeo controle. A diluição que aparece em frente ao traço é equivalente a diluição do anticorpo primário, e após o traço ao anticorpo secundário.

Foi possível verificar que as células controle, tratadas com os anticorpos, não apresentaram expressão, não havendo, portanto, ligações inespecíficas dos anticorpos. Nota-se que as amostras com diluição de 1:400 do anticorpo secundário resultaram em valores mais baixos de detecção da expressão. As outras combinações de diluições de anticorpos primário e secundário apresentaram resultados similares. No entanto, a diluição escolhida como padrão para os próximos experimentos foi de 1:3500 para o anticorpo primário e 1:200 para o anticorpo secundário, devido ao resultado ligeiramente mais alto.

Após a otimização e padronização do método e da confirmação da expressão da RVGP a partir da utilização do plasmídeo pVAX1RVGP através de Imunofluorescência Indireta, considerou-se avaliar a quantidade do agente de transfecção utilizado, uma vez que os pDNAs contendo o gene RVGP são maiores (em número de pares de base) que o normalmente utilizado em nosso laboratório (contendo o gene *GFP*). Então, decidiu-se testar diferentes relações massa/volume de pDNA e lipofectamina. As amostras de células foram coletadas 40 horas após a transfecção. Utilizou-se como controle negativo, células BHK-21 não transfectadas e como controle positivo o plasmídeo pCMV-RVGP.

Para a formação dos lipoplexos pDNA:lipofectamina, utilizou-se mais duas relações massa/volume, além da relação de 1:1,5 com 5 µg de pDNA. Uma relação de 1:5 com 2 µg de pDNA e uma relação de 1:2,5 com 4 µg de pDNA. O experimento foi realizado em duplicata, bem como a análise de resultados. A Figura 20, apresenta a média e o desvio dos resultados obtidos nesse experimento.

Foi possível observar que a porcentagem de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP na relação de 1:1,5 está de acordo com o resultado do ensaio de titulação de anticorpos. O ensaio indica um decaimento na expressão dos plasmídeos conforme a quantidade de pDNA aumenta, sugerindo que a relação mássica equivalente a 1:5 é mais eficiente. Os dados sugerem que a transfecção é mais eficiente em relações N:P (amina:fosfato) mais elevadas.

Apesar do pVAX1RVGP também apresentar esse mesmo padrão, os valores de

porcentagem de células transfectadas apresentaram-se baixos. Optou-se também por avaliar a eletroporação como método de transfecção. Como comparativo foi realizado uma transfecção com a mesma quantidade de pDNA, porém nus. Neste experimento utilizou-se o plasmídeo controle pCMV-RVGP e ambos os clones do pVAX1RVGP. No entanto, a eletroporação realizada não se mostrou eficaz para nenhum dos plasmídeos, inclusive o pCMV-RVGP (dados não apresentados).

Figura 20 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e os plasmídeos pCMV-RVGP e pVAX1RVGP, em diferentes relações massa/volume (1:5, 1:2,5 e 1:1,5), com 2 µg, 4 µg e 5 µg de pDNA por poço respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão entre duplicatas.

Na busca por explicações para a grande diferença em nível de expressão da RVGP entre os plasmídeos pCMV e pVAX1, identificou-se a presença de uma timina (pirimidina) na posição -3 da sequência KOZAK no plasmídeo pVAX1RVGP (GAA**T**TCATGG). A sequência ótima de iniciação do processo de tradução, especialmente em animais vertebrados, conhecida como a sequência de KOZAK, consiste em uma purina na posição -3 do códon ATG inicial, sendo normalmente adenina e uma guanina na posição +4 (GCC**A**CCATGG) (KOZAK, 1991). Experimentos indicaram que a transcrição pode ser de 5 a 10 vezes menor quando a

adenina na posição -3 e a guanina na posição +4 são trocados por uma pirimidina (KOZAK, 1987). Outra possível explicação para a diferença de expressão entre os plasmídeos deve-se as diferentes sequências de poliadenilação, SV40 no caso do pCMV e BGH no caso do pVAX1. Estudos anteriores mostraram que a expressão de transgenes (no caso a proteína GFP) podem ser fortemente alteradas por diferenças na sequência de poliadenilação do plasmídeo (AZZONI *et al.*, 2007). Outro estudo mostra que o promotor SV40 apresenta melhor resultando na expressão da RVGP em células BHK-21, sugerindo que o promotor CMV é menos eficiente nesta célula (XIANG *et al.*, 1995). Porém, neste trabalho ambos os plasmídeos pVAX1RVGP e pCMV-RVGP apresentam o promotor CMV, implicando que o promotor não é a causa da diferença de expressão. De qualquer maneira, há a possibilidade de troca dos promotores, do CMV para o SV40, gerando um aumento de expressão em ambos os plasmídeos.

A partir dessas explicações, optou-se então para a inserção da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1RVGP em busca de uma expressão mais alta da RVGP.

5.3. Clonagem e sequenciamento do pVAX1RVGP após inserção da sequência de KOZAK

A sequência do gene da RVGP com a sequência de KOZAK e com da mudança de um nucleotídeo no *stop códon* foi inserida no plasmídeo pVAX1, através da substituição do gene repórter GFP do plasmídeo pVAX1GFP utilizando-se os sítios de restrição *KpnI* e *XbaI*.

Após a transformação em bactérias *E. coli* DH10B, foram isolados 6 clones. Na Figura 21 pode-se observar que os clones 1, 2, 3, 5 e 6, que estão nos poços representados como 3, 4, 5, 7 e 8 respectivamente, possuem o mesmo tamanho molecular que o plasmídeo pVAX1GFP representado no poço 1, indicando que o inserto contendo a sequência de KOZAK e a do gene RVGP não foi adicionado a estes clones. Já o clone 4, representado no poço 6 apresentou o mesmo tamanho molecular que o plasmídeo pVAX1RVGP (poço 2), sendo então escolhido para análise de confirmação do inserto.

Figura 21 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a identificação de clones contendo a sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1. Legenda: M - marcador molecular; 1 - plasmídeo pVAX1GFP; 2 - plasmídeo pVAX1RVGP; 3 a 8 - clones purificados após transformação de plasmídeos em bactérias *E. coli* DH10B.

A confirmação da inserção da sequência de KOZAK no clone 4 foi efetuada através de um ensaio de digestão com a enzima *SpeI*. Esta foi escolhida, pois com a adição do inserto no plasmídeo um sítio seria removido, portanto este se apresentaria linearizado, enquanto que nos plasmídeos pVAX1GFP e pVAX1RVGP originais continuariam existindo os dois sítios, gerando assim dois fragmentos após o ensaio de restrição. A modificação pôde ser confirmada a partir do gel apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada para a confirmação da inserção da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1 através de análise de restrição. Legenda: M - marcador molecular; 1 - plasmídeo pVAX1GFP; 2 - digestão do plasmídeo pVAX1GFP com a enzima de restrição *SpeI*; 3 e 5 - plasmídeo pVAX1RVGP; 4 e 6 - digestão do plasmídeo pVAX1RVGP com a enzima de restrição *SpeI*; 7 - clone 4; 8 - digestão do clone 4 com a enzima de restrição *SpeI*.

Após a confirmação do inserto no plasmídeo pVAX1 através de ensaio de restrição, optou-se por verificar se a sequência de KOZAK e da RVGP foram inseridas corretamente, bem como confirmar se a mutação no *stop códon* foi bem-sucedida.

Espera-se que com essa mutação que o plasmídeo não sofra metilação no sítio de restrição *XbaI*. Amostras do clone 4 foram enviadas para o sequenciamento e a partir do alinhamento dos resultados, que pode ser visto na Figura 23, foi possível identificar algumas possíveis divergências.

Figura 23 - Alinhamento de sequências de nucleotídeos realizados utilizando-se o *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA) a partir do sequenciamento do clone 4 do plasmídeo pVAX1RVGP.

Estas divergências foram listadas na Tabela 3. A primeira delas é a uma Citosina ao invés de Timina na posição 1692.

Tabela 3 - Divergências identificadas a partir do alinhamento da sequência de nucleotídeos do clone 4 contendo a sequência de KOZAK e do gene da RVGP.

Posição	Resultado Sequenciamento	Código IUPAC	Resultado esperado
1692	C	C	T
1899	Y	C ou T	C
1994	Y	C ou T	C
2042	M	A ou C	A
2057	M	A ou C	A
2067	Y	C ou T	C
2086	Y	C ou T	C
2119	S	G ou C	G
2161	M	A ou C	A
2196	M	A ou C	A
2199	M	A ou C	A
2201	M	A ou C	A
2206	Y	C ou T	C
2215	M	A ou C	A
2236	M	A ou C	A
2246	R	A ou G	G
2276	M	A ou C	A

Devido a clonagem ter sido realizada em sítios de restrição diferentes, o tamanho do novo plasmídeo ficou um pouco menor se comparado com o pVAX1RVGP, passou

de 4541 pb para 4512 pb, portanto essa diferença no nucleotídeo é equivalente a que o plasmídeo pVAX1RVGP apresentou na posição 1721, uma vez que o plasmídeo pVAX1RVGP foi utilizado para a amplificação do gene da RVGP. Essa diferença não compromete a correta expressão do gene como descrito anteriormente.

As outras divergências encontradas foram incertezas quanto o nucleotídeo sequenciado, porém todos os nucleotídeos esperados estão de acordo com o código da IUPAC. A partir do sequenciamento foi possível também identificar que a mudança do nucleotídeo no *stop* códon foi bem-sucedida.

Uma vez que foi confirmada a inserção da sequência de KOZAK e do gene da RVGP no plasmídeo pVAX1, denominou-se este plasmídeo como pVAX1kRVGP. O mapa deste novo plasmídeo está apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Mapa do vetor plasmidial pVAX1RVGP construído com o uso do *software* SnapGene (GSL Biotech, EUA). O plasmídeo contém 4512 pb e possui, além do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pUC, promotor e *enhancer* do CMV (citomegalovírus humano), região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH), e o gene de seleção em bactéria KanR, que confere resistência ao antibiótico kanamicina.

O plasmídeo pVAX1kRVGP possui a sequência de KOZAK seguida do gene da RVGP, origem de replicação bacteriana pMB1, promotor do vírus CMV (citomegalovírus humano), região múltipla de clonagem (local de inserção da RVGP), sequência de poliadenilação do hormônio do crescimento bovino (BGH), e o gene de seleção em bactéria KanR, que confere resistência ao antibiótico kanamicina. O plasmídeo contém 4512 pb, sendo que o gene da RVGP possui 1575 pb.

5.4. Quantificação da expressão da RVGP a partir do complexo pVAX1kRVGP:Lipofectamina

Após a confirmação da inserção da sequência de KOZAK no plasmídeo pVAX1kRVGP, buscou-se avaliar e confirmar a expressão do gene da RVGP em células de BHK-21 transfectadas, bem como o perfil de expressão da RVGP utilizando-se a Lipofectamina para comparação futura com a expressão utilizando-se a proteína T-Rp3.

Para a formação dos lipoplexos pDNA:lipofectamina, utilizou-se a relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA, por ser a mais eficiente das relações testadas anteriormente. As transfecções foram realizadas em uma confluência celular de 70%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e como controle negativo, células BHK-21 não transfectadas. Os resultados apresentados são referentes à porcentagem de células que expressam o gene da RVGP. Os resultados referentes à mediana da intensidade de fluorescência estão disponíveis no APÊNDICE B - Resultados em Mediana da Intensidade de Fluorescência (AU) deste trabalho.

Nesta etapa, buscou-se também avaliar a diferença na expressão da RVGP a partir dos plasmídeos pVAX1RVGP e pVAX1kRVGP, bem como a presença de soro fetal bovino (SFB) no momento da transfecção. Utilizou-se como controle positivo o plasmídeo pCMV-RVGP. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção (Figura 25).

A partir dos resultados obtidos é possível observar que a presença de SFB no momento da transfecção foi prejudicial para a expressão da RVGP utilizando-se o complexo pDNA:Lipofectamina como vetor de transfecção. Esse resultado foi esperado, pois os complexos formados com pDNA e lipídeos catiônicos são conhecidos por terem sua ação prejudicada na presença de fluídos biológicos, como

o SFB. Segundo Nchinda, Uberla e Zschörnig (2002), o efeito inibitório causado pelo soro, leva a diminuição da quantidade de lipoplexos formados, além da diminuição da habilidade de entrega gênica dos lipoplexos restantes, devido à associação com proteínas presentes no soro.

A expressão obtida pelo plasmídeo pVAX1kRVGP sem a presença de SFB foi estatisticamente equivalente à do plasmídeo pCMV-RVGP na presença de SFB. É possível verificar também que a expressão obtida pelo plasmídeo pVAX1kRVGP foi maior que a obtida pelo plasmídeo pVAX1RVGP, porém estatisticamente essa diferença não foi significativa em um intervalo de confiança de 95%.

Figura 25 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e os plasmídeos pCMV-RVGP, pVAX1kRVGP e pVAX1RVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na presença de SFB. Células foram transfectadas com o plasmídeo pVAX1kRVGP nas mesmas condições sem a presença SFB. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Considerando esse resultado, as transfecções que se seguiram foram realizadas sem a presença de SFB. A seguir, buscou-se avaliar a influência da confluência celular no momento da transfecção com o complexo pDNA:Lipofectamina.

As confluências escolhidas foram de 60%, 70% e 80%. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. Houve a preocupação de se tratar os controles negativos nas diferentes confluências de maneira a confirmar que a

confluência das células no momento da transfecção não influencia na especificidade dos anticorpos (Figura 26).

Observando-se os resultados obtidos dentro dos limites estudados, é possível constatar que a confluência das células no momento da transfecção não interfere na especificidade de anticorpos, e também não interfere significativamente na porcentagem de células expressando a proteína RVGP. Os valores de expressão são muito próximos e estatisticamente equivalentes na faixa de confluência estudada.

Figura 26 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 após 48 horas da transfecção com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA, nas confluências celulares de 60%, 70% e 80% na ausência de SFB. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Posteriormente, decidiu-se avaliar a cinética de expressão da RVGP nas células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo. Os tempos escolhidos para esta avaliação foram de 24, 48, 72 e 96 horas. As amostras de células foram coletadas, tratadas e analisadas ao mesmo tempo. A Figura 27, apresenta a média e o desvio dos resultados obtidos nesse experimento.

A partir dos resultados apresentados é possível observar que a expressão da RVGP aumenta ao longo do tempo pós-transfecção, até o máximo em 72 horas,

seguindo de rápida diminuição da expressão da proteína. Portanto, o melhor tempo para coleta amostral é o de 72 horas utilizando-se a Lipofectamina como carreador de entrega gênica. Este dado pode ser relacionado com o resultado do ensaio de qRT-PCR, que indicou que o mRNA da RVGP foi transcrito em maior quantidade após 48 horas de transfecção com o plasmídeo.

Figura 27 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfetadas com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na ausência de SFB, após os seguintes tempos de expressão 24h, 48h, 72h e 96h. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Finalmente, buscou-se completar os ensaios já realizados para melhor avaliar a diferença de expressão da proteína RVGP a partir dos plasmídeos pVAX1RVGP e pVAX1kRVGP, assim como o efeito da presença de SFB no momento da transfecção. Diferentes relações massa/volume de pDNA:Lipofectamina foram avaliadas, conforme o ensaio de imunofluorescência indireta, além da transfecção com os plasmídeos pVAX1RVGP e pCMV-RVGP sem a presença de SFB.

Em acordo com o ensaio de cinética de expressão da RVGP, as amostras das células transfetadas foram coletadas 72 horas após a transfecção. A Figura 28, apresenta a média e o desvio dos resultados obtidos nesse experimento. Foi possível

constatar que o aumento do volume de Lipofectamina ao se formar o complexo leva ao aumento da expressão da RVGP, indicando que o aumento da relação N:P favorece a transfecção. Além disso, na presença de SFB a expressão da RVGP é menor, resultado que se repete notoriamente.

Novamente, sem a presença de SFB foi possível verificar que o plasmídeo contendo a sequência de KOZAK modificada possui eficiência de expressão da proteína RVGP ligeiramente mais alta.

Figura 28 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP nas relações massa/volume de 1:1, 1:3 e 1:5 com 2 µg de pDNA, na relação massa/volume de 1:5 com 4 µg de pDNA, na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na presença de SFB e na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg do plasmídeo pVAX1RVGP. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

5.5. Caracterização físico-química do complexo pVAX1kRVGP:Lipofectamina

Como apresentado anteriormente, a eficiência de transfecção para a expressão da RVGP utilizando a Lipofectamina como carreador de entrega gênica é diretamente vinculada à razão massa volume de pDNA:Lipofectamina utilizada na formação do complexo. Por esse motivo, decidiu-se reproduzir a formação desses complexos e avaliá-los quanto as suas características físico-químicas de maneira a melhor compreender seus efeitos sobre a transfecção.

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos a partir da determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta dos complexos pVAX1kRVGP:Lipofectamina nas relações massa/volume de 1:1; 1:3; 1:5 sem a presença de SFB (e na relação massa/volume de 1:5 na presença de SFB (*), todos os complexos formados em meio de cultura Opti-MEM. O controle negativo apresentado consiste no meio de cultura Opti-MEM sem a presença de complexos.

Tabela 4 - Diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade e potencial zeta dos lipoplexos pVAX1kRVGP:Lipofectamina formados nas relações massa/volume de 1:1; 1:3; 1:5 sem a presença de SFB e na relação massa/volume de 1:5 na presença de SFB (*), em meio Opti-MEM. O controle negativo apresentado consiste no meio de cultura Opti-MEM sem a presença de complexos.

Relação massa/volume	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Controle (-)	-	-	-17,1 ± 1,91
1:1	360 ± 83	0,916 ± 0,120	-22,0 ± 0,71
1:3	521 ± 23	0,816 ± 0,044	-22,9 ± 0,57
1:5	769 ± 86	0,647 ± 0,006	-21,1 ± 0,57
1:5*	672 ± 124	0,842 ± 0,018	-21,1 ± 0,64

Os resultados indicam um aumento do diâmetro hidrodinâmico médio dos complexos conforme o aumento do volume de Lipofectamina utilizado. Aparentemente, a formação do complexo na presença de SFB levou a ligeiro aumento no diâmetro, ainda que estatisticamente não haja diferença significativa entre eles, para $p < 0,05$. Considerando-se estes resultados, a transfecção e, consequentemente, expressão da RVGP foi mais alta com complexos significativamente maiores.

Nota-se que a polidispersidade em todos os experimentos se mostrou elevada, indicando a heterogeneidade das amostras, provavelmente devido à presença dos

diversos componentes presentes no meio de cultura. Apenas o resultado apresentado quanto à relação massa/volume equivalente a 1:5 demonstra-se confiável, pois seu índice de polidispersidade foi menor que 0,7. Os outros complexos que apresentaram índices maiores que 0,7 podem não ser apropriados para medição de tamanho nesta técnica utilizada, de acordo com Malvern Instruments (2011a).

Em relação aos resultados do potencial zeta, é possível identificar que os complexos formados possuem praticamente a mesma carga elétrica, não existindo diferença significativa entre elas. Portanto, não se pode verificar um efeito direto entre a eficiência de transfecção com os diferentes complexos pVAX1RVGP:Lipofectamina e o potencial zeta desses complexos. No entanto, os resultados, que variaram entre -21,1 e -22,9 mV, são similares aos apresentados por Son et al. (2000), que realizou medidas de complexos formados com pDNA e Lipofectamina nas relações mássicas de 1:1 e 1:3 com 2,5 µg de pDNA em meio de cultura sem SFB, sendo que os resultados de potencial zeta (em mV) foram de $-24,4 \pm 2,67$ e $-26,1 \pm 1,23$, respectivamente. A hipótese levantada pelo trabalho é a de que o DNA, carregado negativamente, envolve os lipossomas que condensam o DNA, de um modo semelhante ao de histonas em núcleos eucarióticos, conferindo uma carga líquida negativa aos lipoplexos.

Outra hipótese que pode ser levantada, mas no caso da presença de SFB é que partículas catiônicas tendem-se a ligar com proteínas aniônicas provenientes do SFB resultando em partículas com carga negativa, nas quais as proteínas do SFB se encontram na superfície da partícula formada (DOORLEY; PAYNE, 2011).

5.6. Expressão e purificação da proteína recombinante T-Rp3

Após a confirmação e quantificação da expressão da RVGP na membrana celular de células BHK-21 transfectadas a partir do plasmídeo pVAX1kRVGP, utilizando-se Lipofectamina, a proteína T-Rp3 foi produzida e purificada de modo a serem iniciados os estudos de transfecção e de caracterização de nanopartículas formadas a partir do complexo binário pVAX1kRVGP:T-Rp3, para a avaliação da T-Rp3 como carreador de entrega gênica em um protótipo de vacina de DNA antirrábica.

Inicialmente, a reprodução do protocolo de expressão e purificação da proteína T-Rp3 em nosso laboratório foi bem-sucedida, podendo ser confirmada através de SDS-PAGE (Figura 29). A proteína purificada foi dialisada em tampão MES 50 mM a pH

6,0, pois estudos realizados e ainda não publicados, pela doutoranda Marianna Favaro, de nosso grupo de pesquisa, mostraram que este tampão de diálise é o melhor a ser utilizado visando a estabilidade da T-Rp3 para posterior complexação com DNA plasmidial.

Figura 29 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) realizado para a confirmação da presença da proteína T-Rp3 após processo de purificação. Legenda: M - marcador molecular; 1 - Proteína T-Rp3 (controle positivo); 2 - Amostra da proteína T-Rp3 obtida após a eluição da coluna cromatográfica com Imidazol 200 mM; 3 - Amostra da T-Rp3 obtida após eluição em Imidazol 500 mM.

Contudo, após poucos ensaios iniciais, dificuldades consideráveis de expressão e purificação da proteína recombinante surgiram, interrompendo a realização dos ensaios subsequentes. A repetição do protocolo inicial não mais resultava na obtenção de proteína T-Rp3. Diversas hipóteses foram então levantadas e as seguintes ações foram realizadas:

- Células *E. coli* DE3 foram retransformadas com o plasmídeo contendo a sequência da T-Rp3;
- Todos os reagentes utilizados, desde o cultivo até a purificação foram trocados;
- O gene da T-Rp3 contido no plasmídeo foi sequenciado;
- Realizaram-se diferentes testes nas condições de ruptura das células através de ultrassom.

Apesar da sequência do gene da T-Rp3 estar correta no plasmídeo e da etapa de ruptura celular ter sido otimizada, a T-Rp3 continuou a ser encontrada em quantidades muito baixas, não sendo suficientes para continuação dos estudos. Portanto, visando a conclusão deste trabalho, optou-se por utilizar um lote da proteína T-Rp3 que foi

purificada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer, durante 10 meses, pela doutoranda Marianna Favaro. Fato que se demonstrou como uma oportunidade, no sentido de que o comportamento da proteína armazenada durante este período ainda não tinha sido estudado.

5.7. Quantificação da expressão da RVGP a partir do complexo pVAX1kRVGP:T-Rp3

De modo a verificar se a proteína T-Rp3, após 10 meses de armazenamento, continuaria a possuir a capacidade de complexar pDNA, um experimento de mobilidade em gel de agarose foi realizado utilizando-se relações molares equivalentes a 1:1000, 1:8000 e 1:15000. Estas relações foram escolhidas considerando-se o estudo anterior de FAVARO (2012), no qual apenas a relação molar de 1:8000 foi utilizada em ensaios de transfecção, apesar da relação de 1:1000 também se demonstrar capaz de complexar o pDNA. A relação de 1:15000 foi pensada como uma forma de avaliar se uma maior relação molar de T-Rp3 poderia levar a resultados de transfecção mais eficientes.

Ao analisar o gel de agarose (Figura 30) é possível perceber que os complexos formados nas diferentes relações molares, apresentados nos poços 2, 3 e 4, não migraram ao longo do gel, indicando que todo o plasmídeo utilizado foi complexado pela T-Rp3.

Figura 30 - Eletroforese em Gel de Agarose (0,8%) realizada como avaliação qualitativa da complexação do pDNA pela T-Rp3 em diferentes relações molares. Legenda: M - marcador molecular; 1 - plasmídeo pVAX1kRVGP, controle negativo; 2 - pVAX1kRVGP: T-Rp3 na relação molar de 1:1000; 3 - pVAX1kRVGP: T-Rp3 na relação molar de 1:8000; 4 - pVAX1kRVGP: T-Rp3 na relação molar de 1:15000.

A partir da confirmação da capacidade de complexação da T-Rp3, um ensaio de transfecção em células BHK-21 foi realizado com as mesmas relações molares. As células foram transfectadas com 70% de confluência, e as amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. Utilizou-se como controle positivo o lipoplexo pVAX1kRVGP:Lipofectamina na relação massa/volume 1:5 com 2 µg de pDNA. Os resultados estão apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP nas relações molares de 1:1000, 1:8000 e 1:15000 com 2 µg de pDNA, após 48 horas de expressão. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Esses resultados indicaram que houve a expressão da RVGP utilizando-se apenas a relação molar de 1:15000, e que essa expressão foi menor se comparada a obtida com a Lipofectamina como carreador de entrega. No entanto, conforme o trabalho de FAVARO (2012), esperava-se níveis razoáveis de transfecção utilizando-se o complexo na relação molar de 1:8000.

Uma vez que os ensaios indicaram a expressão da RVGP utilizando-se o complexo pVAX1kRVGP:T-Rp3 na relação molar de 1:15000, buscou-se avaliar o perfil de expressão da RVGP utilizando a proteína T-Rp3 através de ensaios de cinética de expressão e de transfecção em diferentes níveis de confluência.

Os resultados dos ensaios de transfecção em nas confluências celulares de 50, 60, 70, 80 e 90% estão apresentados na Figura 32. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção.

Figura 32 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfetadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, nas confluências celulares de 50, 60, 70, 80 e 90. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Este ensaio indicou que a eficiência de transfecção foi menor conforme em condições de baixa confluência celular, resultado este que se demonstrou diferente do esperado. Esperava-se que, ao menos nas confluências equivalentes as estudadas nos ensaios realizados com a Lipofectamina (60%, 70% e 80%), a confluência celular no momento da transfecção não seria um fator tão determinante da eficiência de transfecção e, consequentemente, de expressão da RVGP.

Esse ensaio indicou que não houve expressão significativa da RVGP em confluências celulares maiores que 80% e que a melhor confluência celular no momento da transfecção foi de aproximadamente 50%. Baseando-se neste resultado, transfecções para avaliar a cinética de expressão da RVGP foram realizadas nessa confluência (Figura 33).

Figura 33 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas na confluência de 50% com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, após os seguintes tempos de expressão 24h, 48h, 72h e 96h. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Observando os dados obtidos, percebe-se que há a tendência de formação de dois picos de expressão, um pico em 24 horas e outro em 96 horas, porém através de análises estatísticas, os valores em todos os tempos de expressão demonstraram-se iguais. Resultado que difere do esperado conforme a cinética obtida com a utilização de Lipofectamina. Esperava-se um aumento progressivo da expressão, seguido de um decaimento sugerindo a degradação dos vetores plasmidiais no interior da célula e da própria RVGP na membrana.

Devido a série de resultados inesperados utilizando-se a T-Rp3 como carreador de entrega, um novo experimento foi realizado utilizando-se como controle negativo o plasmídeo pVAX1Luc, de forma a avaliar a possibilidade de estar ocorrendo ligação inespecífica dos anticorpos (Figura 34) a proteína eventualmente ligada à membrana das células.

Considerando que a metodologia de complexação pDNA:T-Rp3 poderia ter relação com os resultados obtidos, transfecções foram realizadas a partir da formação do complexo pDNA:T-Rp3, com uma metodologia distinta, aqui denominada de “TP”.

Para a obtenção de complexos conforme o método “TP”, adicionou-se a T-Rp3 ao pDNA e após 10 minutos adicionou-se o volume de Opti-MEM (sem soro), para o mesmo volume final de 500 μ L.

Portanto, além de se verificar a especificidade dos anticorpos, decidiu-se verificar se a metodologia de complexação, ou mesmo a ausência de SFB no momento da transfecção, poderiam de alguma maneira comprometer os resultados.

Imagens foram capturadas nos tempos zero, 6 horas (imagem capturada antes de retirar o meio contendo o complexo) e 48 horas pós-transfecção (Figura 35). Essas imagens foram capturadas randomicamente, e não apresentam o poço inteiro, por isso podem não apresentar a confluência celular de 50%.

Figura 34 - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfetadas na confluência de 50% com a T-Rp3 e os plasmídeos pVAX1kRVGP e pVAX1Luc na relação molar de 1:15000 com 2 μ g de pDNA, em diferentes maneiras de complexação. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura 35 - Imagens capturadas no aumento de 20x em três diferentes tempos pós transfecção: t0, t6 e t48 de células BHK-21 transfectadas com o lipoplexo pVAX1k-RVGP:lipofectamina na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA, com o complexo pVAX1k-RVGP:T-Rp3 na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA na presença de SFB, *TP e na ausência de SFB. O controle (-) apresenta células BHK-21 não transfectadas.

Observando os resultados obtidos, pôde-se verificar que apenas as transfecções realizadas com o plasmídeo pVAX1Luc e Lipofectamina, não apresentaram expressão, indicando que de alguma forma a T-Rp3 estaria contribuindo para uma falsa quantificação de expressão. Todas as transfecções realizadas com o plasmídeo pVAX1kRVGP, apresentaram expressão, sendo que os valores em porcentagem foram iguais quando utilizado a T-Rp3 e a Lipofectamina, enquanto que foram menores na presença de SFB e com o complexo formado no método TP.

A partir das imagens, é possível verificar que, nas condições utilizadas, as transfecções realizadas utilizando a T-Rp3 resultaram em complexos na forma de agregados, e mesmo após a remoção do meio em que os complexos foram preparados, eles tendem a ficar fixados nas células e na superfície da placa. Finalmente, após 48 horas de transfecção, é possível perceber áreas mais limpas e agregados ainda maiores, se comparado com 6 horas após a transfecção, indicando a continuidade da tendência de agregação ao longo do tempo, podendo ser verificado principalmente nos experimentos realizados na presença de SFB (III) e com a utilização do método TP (V).

É importante salientar que a presença de SFB na transfecção se dá apenas no meio de cultura DMEM utilizado para o crescimento das células. Todos os complexos foram formados sem a presença de SFB.

Considerando o resultado apresentado no experimento de confluência celular, é possível perceber que quando há mais células na superfície da placa, a suposta expressão é baixíssima, próxima ao controle, indicando que quanto mais a superfície da placa está disponível para entrar contato com o complexo, mais formam-se agregados, contribuindo para uma falsa expressão da RVGP.

De maneira a melhor compreender a formação de agregados, complexos foram formados e colocados em contato com a placa de 6 poços na ausência de células. As imagens que foram capturas podem ser vistas na Figura 36.

Figura 36 - Imagens capturadas no aumento de 20x dos complexos formados em contato com a placa de 6 poços. a) Controle Negativo - poço contendo Opti-MEM. b) Lipofectamina em Opti-MEM. c) T-Rp3 em Opti-MEM. d) pVAX1kRVGP:T-Rp3 na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA.

Nos dois primeiros poços (Figuras 36a e 36b) que contém meio de cultura Opti-MEM e de Lipofectamina em Opti-MEM respectivamente, não apresentam a formação de agregados, conforme o esperado. Diferente dos poços contendo a T-Rp3, que indicaram a presença de agregados, sendo que estes são maiores na presença de o pDNA (Figura 36d). Entende-se que pelo fato da carga do pDNA ser negativa, os agregados de T-Rp3 acabam sendo atraídos para si.

Finalmente, de modo a assegurar que a ligação inespecífica de anticorpos não aconteceu, um ensaio de transfecção foi realizado. Amostras transfectadas foram analisadas sem marcação (SM), com marcação apenas do anticorpo secundário (SEC) e com marcação dos anticorpos primário e secundário (PRI+SEC), o resultado pode ser visto na Figura 37. A transfecção foi realizada de acordo com a metodologia utilizada em todos os experimentos anteriores, em que separadamente adiciona-se o meio Opti-MEM ao pDNA e à proteína, e após 5 minutos o conteúdo do tubo contendo a proteína é gotejado no tubo que contém o pDNA. Os complexos são formados na ausência de SFB.

Figura 37 - Análise da especificidade de anticorpos através da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA. Legenda: SM - sem marcação; SEC - marcação apenas com o anticorpo secundário (SEC); PRI+SEC - marcação com os anticorpos primário e secundário. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Como se pode observar, os controles negativos (células não transfectadas), não tiveram interação com nenhum dos anticorpos, reforçando mais uma vez que os anticorpos não interagem com as células não transfectadas.

A partir dos dados obtidos das transfecções utilizando Lipofectamina, é possível verificar que a células transfectadas apresentam certa fluorescência, corroborando a necessidade de certificar-se que a expressão é real em baixos níveis de expressão a partir de outras metodologias, como foi realizado neste trabalho com os ensaios de Imunofluorescência Indireta.

Apesar da amostra tratada com o anticorpo secundário ser maior que a sem marcação, essa diferença não é significativa, indicando que não há interação inespecífica.

As transfecções realizadas com a utilização da T-Rp3 apresentaram “expressão” mais elevada que a verificada nas transfecções com Lipofectamina nas amostras sem marcação, indicando que os agregados dos complexos formados são fluorescentes.

As amostras tratadas com os anticorpos primários e secundários apresentaram uma expressão mais alta, porém a diferença é muito próxima ao valor de significância, portanto, se existe a interação dos anticorpos, essa interação pode ser considerada desprezível.

Ainda nesse mesmo experimento, houve a preocupação de verificar se os complexos formados com a T-Rp3 seriam fluorescentes em outros comprimentos de onda. Considerando que, uma vez que o anticorpo secundário é específico, o fluoróforo poderia ser alterado, para que mesmo se houver agregação do complexo, a medição da expressão por citometria de fluxo poderia ser medida sem a interferência de sua fluorescência. Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Mediana de Intensidade de Fluorescência (AU) das amostras sem marcação em diferentes comprimentos de onda.

Amostra	Mediana de Intensidade de Fluorescência (AU)					
	APC	APC-Cy7	FITC	PE	PE-Cy7	PerCP
Controle (-)	56,8	20,5	25,2	53,5	32,4	54,8
pVAX1kRVGP:Lipofectamina (1:5)	157	58,8	47,9	128	92,8	160
pVAX1kRVGP:T-Rp3 (1:15000)	488	219	106	366	320	436

As células transfectadas sem marcação foram submetidas a diversos comprimentos de onda e os resultados indicaram que os agregados dos complexos são fluorescentes em todos os comprimentos de onda medidos, e curiosamente, o FITC que foi utilizado em todo o trabalho, apresenta a menor intensidade de fluorescência.

É importante refletir que neste trabalho procurou-se mimetizar as condições de complexação, da T-Rp3 com o pDNA, conforme o protocolo utilizado anteriormente com a Lipofectamina, considerando que a sua substituição pela T-Rp3 seria a única diferença, de modo a melhor comparar os resultados entre estes diferentes carreadores de entrega. Porém, nessas condições, os resultados demonstraram que a expressão da RVGP apontada nos experimentos de transfecção com os complexos de pDNA:T-Rp3, na relação molar de 1:15000, foi na realidade resultado da fluorescência dos agregados de complexos, que acabam por serem autofluorescentes em diferentes comprimentos de onda.

Então, no sentido de contornar o ocorrido, acredita-se que para a utilização de relações molares de T-Rp3 na grandeza equivalente a usada neste trabalho, deve-se realizar um estudo mais aprofundado quanto a metodologia de complexação da T-Rp3 com o pDNA, com a utilização de Soro Fetal Bovino no momento da transfecção.

Segundo Patiño (2011), o método de transfecção utilizando Fosfato de Cálcio, também possui a tendência de formar aglomerados quando em contato com meio de cultura, e essa tendência é menor na presença de Soro Fetal Bovino. Nos estudos anteriores de Favaro (2012) e Alves (2015) a formação do complexo pDNA:T-Rp3 foi realizado em relações molares menores e na presença de Soro Fetal Bovino, indicando que como o Fosfato de Cálcio, a T-Rp3 necessita de sua presença no sentido de evitar a formação de agregados. Em ambos os trabalhos, as relações molares foram equivalentes a 1:8000 e 1:10000, respectivamente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que os resultados deste trabalho sejam apenas iniciais no sentido de se desenvolver um protótipo de vacina de DNA contra a raiva, acabaram por contribuir significativamente com nosso grupo de trabalho, no sentido de ampliar nossos conhecimentos sobre cultivo de células BHK-21, sobre a expressão *in vitro* da proteína de membrana RVGP, desenvolvimento de métodos indiretos de quantificação de expressão da RVGP, bem como o comportamento da complexação da T-Rp3 com pDNA em condições não estudadas anteriormente.

Nosso grupo de pesquisa normalmente trabalha com células HeLa, na presença de antibióticos, e cultivadas em placa de 24 poços, portanto houve todo um processo de adequação às células de modo a entender bem seu comportamento e práticas laboratoriais mais eficientes no sentido de evitar contaminação. Nos trabalhos anteriores foram utilizadas proteínas repórteres para os estudos de entrega gênica a partir de carreadores lipídicos e proteicos, já neste trabalho, utilizou-se a proteína RVGP que desde o início foi um desafio, tanto para obter e quantificar sua expressão em células de mamífero, como garantir a preservação de sua atividade biológica. Houve a necessidade de se desenvolver um método de identificação da proteína de maneira indireta, com a utilização de dois anticorpos. Estes anticorpos ao longo de todo trabalho foram testados e demonstraram alta especificidade, demonstrando que o método desenvolvido é confiável e eficiente para a análise de expressão da RVGP em células, em especial quando o objetivo é a comparação da expressão utilizando-se diferentes vetores de entrega.

Ao longo do trabalho, pôde-se observar que a baixa expressão da RVGP a partir do plasmídeo pVAX1 foi recorrente, porém é importante salientar que a utilização de um sistema de expressão transiente neste caso, não é utilizado com a finalidade de produção massiva da glicoproteína do vírus da raiva. Para tanto, poderia ser utilizado o plasmídeo pCMV-RVGP, que se demonstrou ser muito mais eficiente para este fim.

É sabido que os resultados de estudos *in vitro* não necessariamente determinam sua eficácia *in vivo*, e apesar do objetivo ser produzir uma vacina de DNA, nada impede a continuação de estudos para a melhoria do aumento de expressão, tendo como benefícios mais segurança nos dados apontados e a redução de uso de animais para testes.

Também pudemos conhecer mais sobre a proteína T-Rp3, que aqui não demonstrou o desempenho biológico que esperávamos. Abriu-se caminho para mais estudos no sentido de compreender motivos para a baixa expressão e purificação, além de novos estudos de estabilidade e armazenamento.

A partir dos falsos resultados de expressão, tomamos a precaução de verificar os trabalhos anteriores, para ter a certeza de que a expressão reportada, também não seria fruto dos agregados de complexos fluorescentes. Analisamos os *gates* utilizados pelo aluno Rafael Alves em seus experimentos de citometria de fluxo e, na comparação com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível perceber uma população de células bem delineada e fluorescente, diferente dos debris/precipitados (menores que células) de alta complexidade que são autofluorescentes, encontrados nas condições apresentadas e já discutidas aqui.

Portanto, ainda que maiores estudos precisem ser desenvolvidos, este trabalho não descarta a potencialidade de utilização de complexos pDNA:T-Rp3, ressaltando a necessidade da presença de Soro Fetal Bovino durante a transfecção, o que pode indicar uma vantagem, pois ao contrário do que foi verificado com a utilização de lipofectamina, em que a presença de soro possui efeito inibitório, a necessidade de soro pela T-Rp3 pode indicar uma tendência de estabilidade em fluidos biológicos, capacidade essa, que pode ser promissora em futuros estudos *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho realizou-se a construção e a avaliação do plasmídeo pVAX1 contendo o gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) visando ao futuro desenvolvimento de um protótipo de vacina de DNA contra a raiva. A expressão do gene em células BHK-21 foi detectada e, além disso, foi desenvolvido um método rápido e eficiente para a quantificação de expressão da RVGP na membrana de células transfectadas, através de citometria de fluxo. A partir disso, foram realizados ensaios de transfecção *in vitro* utilizando-se os vetores não virais Lipofectamina e a proteína recombinante T-Rp3.

Ao longo do trabalho, notou-se com frequência a baixa expressão da RVGP a partir do plasmídeo pVAX1RVGP, mesmo com a modificação da sequência de KOZAK. Ensaios utilizando a Lipofectamina como agente carreador demonstraram que, dentro dos parâmetros estudados, não houve diferença na expressão da RVGP quanto à confluência celular no momento da transfecção e que a eficiência de transfecção foi dependente da presença de Soro Fetal Bovino no meio de cultura. Pôde-se verificar que o mRNA da RVGP é majoritariamente transcrito após 48 horas da transfecção, dado que se correlaciona com a cinética de expressão apresentada, em que a RVGP atinge o máximo de expressão após 72 horas da transfecção.

Nos ensaios de caracterização físico-química dos lipoplexos formados pelo DNA plasmidial e a Lipofectamina em meio de cultura Opti-MEM, na presença e na ausência de Soro Fetal Bovino, observou-se que, devido à alta polidispersidade, a técnica de espalhamento de luz não foi eficiente para a avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas estudadas. Porém, os resultados indicam que o diâmetro aumenta conforme o volume de Lipofectamina utilizado também aumenta. O potencial zeta dos complexos variaram entre -21,1 e -22,9 mV, indicando que possíveis fenômenos de oclusão dos complexos por moléculas do meio ou mesmo modificação da estrutura do lipoplexo, com a exposição do pDNA ao ambiente externo, devem ocorrer, ocasionando carga líquida negativa aos lipoplexos.

Os ensaios de transfecção com a T-Rp3 indicaram forte propensão a agregação na relação molar de 1:15000, enquanto que nas relações de 1:1000 e 1:8000 não se verificou esse comportamento. Apesar de possuir a capacidade de complexar *in vitro* o pDNA a T-Rp3 não demonstrou capacidade de entrega gênica nas condições

estudadas. É possível que a proteína não seja estável após longos períodos de armazenamento em ultrafreezer (aproximadamente 10 meses). Novos estudos, em especial visando à identificação de condições de não agregação a altas razões molares e na presença de SFB, seriam necessários para a melhor avaliação da T-Rp3 como um vetor não viral viável de entrega gênica.

Finalmente, acreditamos que essa dissertação acrescenta resultados relevantes para o desenvolvimento de uma vacina de DNA plasmidial contra a raiva, em especial no que diz respeito à comparação entre diferentes vetores de entrega e sua avaliação em estudos *in vitro*.

8. SUGESTÃO PARA A CONTINUAÇÃO DOS ESTUDOS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se os seguintes estudos a serem desenvolvidos:

- Continuação dos estudos da problemática na produção da proteína T-Rp3, considerando mudanças nos processos de *downstream*, como no processo de ruptura das células;
- Após a purificação da T-Rp3, estudos de estabilidade da proteína poderiam ser aprofundados, bem como protocolos de complexação com pDNA, compostos metálicos e anticorpos;
- Realização de cultivos em biorreator das células contendo o plasmídeo da T-Rp3 e sua purificação através de FPLC, analisando o aumento de custo e eficiência conforme o aumento de escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. F. *Desenvolvimento e caracterização de vetores não virais para entrega gênica baseados em proteínas e lipossomas*. 2015. 92 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2015.
- ANDRADE, J. E. *Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob influência do pH*. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Física, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2008.
- ARÍS, A.; VILLAVERDE, A. Modular protein engineering for non-viral gene therapy. *Trends in Biotechnology*, v. 22, n. 7, p. 371–377, 2004.
- AZZONI, A. R. *et al.* The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. *The journal of gene medicine*, v. 9, n. April, p. 389–402, 2007.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.
- BEHR, J.-P. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 34–36, 1997.
- BERNARDINO, T. C. *Expressão da glicoproteína rábica utilizando pseudo partículas virais*. 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- CANINE, B. F.; WANG, Y.; HATEFI, A. Evaluation of the effect of vector architecture on DNA condensation and gene transfer efficiency. *Journal of Controlled Release*, v. 129, n. 2, p. 117–123, 2008.
- CHAPMAN, B. S. *et al.* Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 14, p. 3979–3986, 1991.
- CHAVES, L. B. *Produção de anticorpos monoclonais para caracterização de variantes antigênicas brasileiras de vírus da raiva*. 2010. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Univerisdade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- COLEMAN, P. G.; FÈVRE, E. M.; CLEAVELAND, S. Estimating the Public Health Impact of Rabies. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 1, p. 140–142, 2004.
- DANI, S. U. Terapia gênica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 12, n. 1, p. 28–33, 2000.
- DÍAZ, M. *et al.* Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, n. 3, p. 385–407, fev. 2010.

DÖHNER, K.; NAGEL, C.-H.; SODEIK, B. Viral stop-and-go along microtubules: Taking a ride with dynein and kinesins. *Trends in Microbiology*, v. 13, n. 7, p. 320–327, 2005.

DOORLEY, G. W.; PAYNE, C. K. Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins. *Chem. Commun.*, v. 47, n. 1, p. 466–468, 2011. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C0CC02618B>>.

DOUGLAS, M. W. *et al.* Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 27, p. 28522–28530, 2004.

ERTL, H. C. J. Novel vaccines to human rabies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 9, 2009.

FAVARO, M. T. DE P. *Desenvolvimento de vetores não virais para entrega gênica baseados na cadeia leve de dineína RP3*. 2012. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

FAVARO, M. T. P. *et al.* Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide. *Journal of Biotechnology*, v. 173, n. 1, p. 10–18, 2014.

FEHLNER-GARDINER, C. *et al.* Comparing ONRAB® AND RABORAL V-RG® oral rabies vaccine field performance in raccoons and striped skunks, New Brunswick, Canada, and Maine, USA. *Journal. J Wildl Dis*, v. 48, n. 1, p. 157–167, 2012.

FERRER-MIRALLES, N.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Membrane-active peptides for non-viral gene therapy: making the safest easier. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. March, p. 267–275, 2008.

FROGER, A.; HALL, J. E. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. 6, p. 253, 2007.

GAUDIN, Y. *et al.* Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal of virology*, v. 67, n. 3, p. 1365–72, 1993.

GAUDIN, Y. *et al.* Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology journal*, v. 187, n. 2, p. 627–632, 1992.

HAUPT, W. Rabies - risk of exposure and current trends in prevention of human cases. *Vaccine*, v. 17, n. 13–14, p. 1742–1749, 1999.

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

HORIBA SCIENTIFIC. *Zeta Potential*. Disponível em: <<http://www.horiba.com/br/scientific/products/particle-characterization/technology/zeta-potential/>>. Acesso em: 28 out. 2016.

JOHN WILEY AND SONS LTD. *Gene Therapy Clinical Trials*. Disponível em: <www.wiley.co.uk/genmed/clinical>. Acesso em: 2 fev. 2016.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. *Química nova na escola*, n. 9, p. 9–13, 1999.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária DNA vaccines : general concerns and its applications in human and veterinary medicine. *Ciências Agrárias*, v. 28, n. 4, p. 709–726, 2007.

KAY, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nature reviews. Genetics*, v. 12, n. 5, p. 316–328, 2011.

KAZUSA. *Codon Usage Database - Mesocricetus auratus*. Disponível em: <<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=10036>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M. L.; TAKAOSKA, N. Y. Raiva – Aspectos gerais e clínica. *Manual Técnico do Instituto Pasteur*, v. 8, p. 49, 2009.

KOZAK, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *Journal of Cell Biology*, v. 115, n. 4, p. 887–903, 1991.

KOZAK, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, v. 196, n. 4, p. 947–950, 1987.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature reviews. Genetics*, v. 9, n. 10, p. 776–788, 2008.

LIFE TECHNOLOGIES. *pVAX1™ User Guide*. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pvax1_man.pdf>.

LIMA, M. C. P. DE *et al.* Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection. *Mol Membr Biol*, v. 16, n. 1, p. 103–109, 1999.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 31–69, 2010.

LO, S. L.; WANG, S. An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials*, v. 29, n. 15, p. 2408–2414, 2008.

MALVERN INSTRUMENTS. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104DynamicLightScatteringIntroduction.aspx>>. Acesso em: 10 set. 2015a.

MALVERN INSTRUMENTS. *Dynamic Light Scattering - Common Terms defined*. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/Whitepapers/WP111214DLSTermsDefined.aspx>>. Acesso em: 5 dez. 2016b.

MALVERN INSTRUMENTS. *Zeta potential: An Introduction in 30 minutes*. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.aspx>>. Acesso em: 10 set. 2015c.

MONTEIRO, D. C. V. *Purificação e imunogenicidade da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) expressa pelos sistemas células S2 e Semliki Forest Virus*. 2014. 137 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MOSCHOS, S. A. *et al.* Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, n. 5, p. 1450–1459, 2007.

NALDINI, L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, v. 526, n. 7573, p. 351–360, 2015.

NAYAK, S.; HERZOG, R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Therapy*, v. 17, n. 3, p. 295–304, 2011.

NCHINDA, G.; UBERLA, K.; ZSCHÖRNIG, O. Characterization of cationic lipid DNA transfection complexes differing in susceptibility to serum inhibition. *BMC biotechnology*, v. 2, p. 12, 2002.

NIGG, A. J.; WALKER, P. L. Prevention and Treatment of Rabies. *Pharmacotherapy*, v. 29, n. 10, p. 1182–1195, 2009.

NITIN, N. *et al.* Tat peptide is capable of importing large nanoparticles across nuclear membrane in digitonin permeabilized cells. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 37, n. 10, p. 2018–2027, 2009.

OPORTO, J. S. *et al.* Raiva. *Manual de Zoonoses*, v. 1, n. 1, p. 100–127, 2009.

OROPEZA, M. V. C. *Síntese e caracterização de nanopartículas núcleo-casca de poliestireno e polimetacrilato de metila obtidas por polimerização em emulsão sem emulsificante e fotoínicada*. 2011. 227 p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PATHAK, A.; PATNAIK, S.; GUPTA, K. C. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnology Journal*, v. 4, n. 11, p. 1559–1572, 2009.

PATÍÑO, S. F. S. *Avaliação da expressão transiente do gene da glicoproteína do vírus da raiva (RVGP) em células de inseto da linhagem Drosophila melanogaster S2*. 2011. 121 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

PUGLIA, A. L. P. *Obtenção e utilização do vetor viral SFV expressando GFP*. 2014. 2014.

QI, Y. *et al.* Expression and localization of exocytic and recycling Rabs from *Magnaporthe oryzae* in mammalian cells. *Methodos in Cell Biology - Sorting and Recycling Endosomes*. 1. ed. Amsterdam: Academic Press, 2015. p. 396.

REJMAN, J. *et al.* Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal*, v. 377, n. Pt 1, p. 159–69, 2004.

ROSS, B. A.; FAVI, C. M.; VÁSQUEZ, V. A. Glicoproteína del virus rábico: Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. *Rev Chilena Infectol*, v. 25, n. 2, p. 14–18, 2008.

RUPONEN, M. *et al.* Intracellular DNA release and elimination correlate poorly with transgene expression after non-viral transfection. *Journal of Controlled Release*, v. 136, n. 3, p. 226–231, 2009.

SACCARDO, P.; VILLAVERDE, A.; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N. Peptide-mediated DNA condensation for non-viral gene therapy. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 432–438, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. Protocol 25. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual on the Web*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 372.

SCHLEEF, M. *DNA-Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA Vaccination and Immunotherapy*. 1. ed. Bielefeld: WILEY-VCH, 2005.

SHAKIN-ESHLERNANS, S. H. *et al.* N-Linked Glycosylation of Rabies Virus Glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 15, p. 10690–10698, 1992.

SILVA, D. C. *Caracterização de nanopartículas pDNA-protamina e pDNA- protamina-lipossoma e avaliação da eficiência de entrega gênica a células de mamífero*. 2015. 65 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SON, K. K. *et al.* Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1466, n. 1–2, p. 11–15, 2000.

THERMO FISHER. *Lipofectamine® Reagent for the transfection of DNA into eukaryotic cells*. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/cell-culture/transfection-protocol/lipofectamine-reagent-suitable-for-the-transfection-of-dna-into-eukaryotic-cells.html>>. Acesso em: 31 jan. 2016.

TOLEDO, M. A. S. *et al.* Development of a recombinant fusion protein based on the dynein light chain LC8 for non-viral gene delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 159, n. 2, p. 222–231, 2012.

TORDO, N. *et al.* Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 83, n. 11, p. 3914–3918, 1986.

TREFALT, G.; BORKOVEC, M. *Overview of DLVO Theory*. Disponível em: <www.colloid.ch/dlvo>.

TZFIRA, T. On tracks and locomotives: The long route of DNA to the nucleus. *Trends in Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 61–63, 2006.

ULLAS, P. T. Rabies DNA Vaccines: Current Status and Future. *World Journal of Vaccines*, v. 2, n. 1, p. 36–45, 2012.

WANG, X. *et al.* Oral immunisation of mice with a recombinant rabies virus vaccine incorporating the heat-labile enterotoxin B subunit of Escherichia coli in an attenuated Salmonella strain. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 2, p. 675–681, 2012.

WHO. *Rabies - Fact Sheet*. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>. Acesso em: 13 jan. 2017.

WHO. Rabies vaccine: WHO position paper. *Weekly epidemiological record*, v. 85, n. 32, p. 309–320, 2010.

WIETHOFF, C. M.; MIDDAGH, C. R. Barriers to Nonviral Gene Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, n. 2, p. 203–217, 2003.

WON, Y.-W.; LIM, K. S.; KIM, Y.-H. Intracellular organelle-targeted non-viral gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 152, n. 1, p. 99–109, 2011.

XIANG, Z. Q. *et al.* Immune Responses to Nucleic Acid Vaccines to Rabies Virus. *Virology journal*, v. 209, p. 569–579, 1995.

YAMANO, S. *et al.* Modified Tat peptide with cationic lipids enhances gene transfection efficiency via temperature-dependent and caveolae-mediated endocytosis. *Journal of Controlled Release*, v. 152, n. 2, p. 278–285, 2011.

YANG, D. *et al.* The present and future of rabies vaccine in animals. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, v. 2, p. 19–25, 2013.

APÊNDICE A - Eletroforese em Gel de Agarose realizada para análise de fragmentos amplificados nas etapas de extração de material genético, tratamento com DNase e síntese de cDNA

Figura A1 - Eletroforese em Gel de Agarose 1,5% realizada para analisar os fragmentos amplificados nas etapas de extração de material genético, tratamento com DNase e síntese de cDNA. Legenda: M - marcador molecular; CP - Controle positivo (amplificação do plasmídeo pCMV-RVGP); CN - Controle negativo (amplificação do material genético extraído de células não transfectadas); 1 a 5 - amplificação do material genético extraído de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção respectivamente; 6 a 10 - amplificação do material genético extraído de células transfectadas com o plasmídeo pVAX1RVGP nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção respectivamente; 11 a 15 - amplificação do material genético extraído de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP tratadas com DNase nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção respectivamente; 16 a 20 - amplificação do material genético extraído de células transfectadas com o plasmídeo pVAX1RVGP tratadas com DNase nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção respectivamente; 21 a 25 - amplificação da síntese de cDNA obtida através do material genético extraído de células transfectadas com o plasmídeo pCMV-RVGP após tratamento com DNase nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção respectivamente; 26 a 30 - amplificação da síntese de cDNA obtida através do material genético extraído de células transfectadas com o plasmídeo pVAX1RVGP após tratamento com DNase nos tempos 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção respectivamente.

APÊNDICE B - Resultados em Mediana da Intensidade de Fluorescência (AU)

Figura B1 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 25** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e os plasmídeos pCMV-RVGP, pVAX1kRVGP e pVAX1RVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na presença de SFB. Células foram transfectadas com o plasmídeo pVAX1kRVGP nas mesmas condições sem a presença SFB. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B2 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 26** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 após 48 horas da transfecção com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA, nas confluências celulares de 60%, 70% e 80% na ausência de SFB. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B3 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 27** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na ausência de SFB, após os seguintes tempos de expressão 24h, 48h, 72h e 96h. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B4 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 28** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com lipofectamina e o plasmídeo pVAX1kRVGP nas relações massa/volume de 1:1, 1:3 e 1:5 com 2 µg de pDNA, na relação massa/volume de 1:5 com 4 µg de pDNA, na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg de pDNA na presença de SFB e na relação massa/volume de 1:5 com 2 µg do plasmídeo pVAX1RVGP. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B5 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 31** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfetadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP nas relações molares de 1:1000, 1:8000 e 1:15000 com 2 µg de pDNA, após 48 horas de expressão. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B6 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 32** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfetadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, nas confluências celulares de 50, 60, 70, 80 e 90. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B7 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 33** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas na confluência de 50% com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, após os seguintes tempos de expressão 24h, 48h, 72h e 96h. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B8 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 34** - Análise da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas na confluência de 50% com a T-Rp3 e os plasmídeos pVAX1kRVGP e pVAX1Luc na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA, em diferentes maneiras de complexação. As amostras de células foram coletadas 48 horas após a transfecção. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

Figura B9 - Mediana de Intensidade de Fluorescência referente ao ensaio apresentado na **Figura 37** - Análise da especificidade de anticorpos através da expressão da RVGP por Citometria de Fluxo de células BHK-21 transfectadas com a T-Rp3 e o plasmídeo pVAX1kRVGP na relação molar de 1:15000 com 2 µg de pDNA. Legenda: SM - sem marcação; SEC - marcação apenas com o anticorpo secundário (SEC); PRI+SEC - marcação com os anticorpos primário e secundário. As barras de erro indicam o desvio padrão entre triplicatas.

APÊNDICE C - Propriedades Físico-Químicas de Nanopartículas

Como citado, no item 3.3. Barreiras intracelulares à entrega gênica, o tamanho e carga das nanopartículas são fatores importantes quanto à entrega de material genético a células alvo. O tamanho pode ser obtido através da técnica de Diâmetro Médio Dinâmico e a carga através do Potencial Zeta.

Diâmetro Médio Hidrodinâmico

O Espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma técnica que mensura o movimento Browniano através da iluminação a laser de uma amostra contendo partículas suspensas em um líquido. A partir da taxa das flutuações de intensidade da luz espalhada, é possível obter a velocidade do movimento Browniano e então relacioná-lo ao tamanho das partículas na amostra, através da equação de Stokes-Einstein (MALVERN INSTRUMENTS, 2011a).

Através de algoritmos, o instrumento correlaciona as flutuações de intensidade da luz espalhada em função do tempo com uma função de decaimento exponencial dependente do índice de refração do dispersante, comprimento de onda do laser, ângulo de espalhamento de luz e o coeficiente de difusão translacional (MALVERN INSTRUMENTS, 2011a).

A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional (D) que depende do tamanho da partícula, da estrutura de superfície, bem como da concentração e tipo de íons do meio, pois estes podem afetar a velocidade de difusão da partícula porque mudam a espessura da dupla camada elétrica (MALVERN INSTRUMENTS, 2011a)

O movimento Browniano é o movimento randômico das partículas devido ao bombardeamento das moléculas do dispersante (fluido) em que estão contidas. Quanto maior a partícula mais lento é o movimento Browniano. Partículas menores movem-se mais rápido e acabam por ser arremessadas a uma maior distância pelas moléculas do solvente (MALVERN INSTRUMENTS, 2011a).

Para a obtenção do valor de diâmetro médio hidrodinâmico é fundamental que a temperatura esteja estável, pois correntes de convecção na amostra podem causar movimentos não aleatórios, o que comprometeria a interpretação do resultado. Seu valor exato também é necessário devido à viscosidade ser um termo requerido

(MALVERN INSTRUMENTS, 2011a).

O tamanho da partícula pode ser calculado a partir da Equação 1 apresentada a seguir:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

Onde:

$d(H)$ = diâmetro hidrodinâmico;

D = coeficiente de difusão translacional;

k = constante de Boltzmann;

T = Temperatura absoluta e η = viscosidade.

A partir da intensidade de espalhamento de luz, os resultados podem ser também apresentados como uma distribuição do número e do volume das partículas em função do diâmetro.

A distribuição em número é obtida segundo a aproximação de Rayleigh, em que a intensidade espalhada pela partícula é proporcional à sexta potência do seu diâmetro. A distribuição em volume é obtida através da aplicação da Teoria de Mie, que é uma complexa função de máximos e mínimos em relação ao ângulo de espalhamento de luz. As diferenças entre as distribuições de um mesmo experimento podem ser vistas na Figura C1 (MALVERN INSTRUMENTS, 2011a).

Figura C1 - Diferença entre distribuições de número, volume e intensidade de um mesmo experimento (ANDRADE, 2008).

O índice de polidispersidade (PDI) é uma estimativa da largura da distribuição, também é apresentado considerando uma única distribuição da população. Este dado fornece a informação sobre o grau de homogeneidade da amostra. O PDI, que é adimensional varia de 0 a 1, quanto menor este índice, mais monodispersa, portanto,

maior é a homogeneidade do diâmetro médio hidrodinâmico das partículas. Valores acima de 0,7 indicam que a amostra não é adequada para a técnica de DLS (MALVERN INSTRUMENTS, 2011b).

Estabilidade Coloidal, a Teoria DVLO e o Potencial Zeta

Um sistema coloidal pode ser definido pela mistura de partículas parcialmente insolúveis ou insolúveis, que podem estar em diferentes estados físicos (sólido, líquido e gasoso). Na Tabela C1 é possível observar a classificação do coloide conforme a fase em que está disperso de acordo com a fase do meio em dispersão (JUNIOR; VARANDA, 1999).

Tabela C1 - Classificação do coloide conforme a fase em que está disperso de acordo com a fase do meio em dispersão. Adaptado de (JUNIOR; VARANDA, 1999).

Coloide	Fase dispersa	Fase de dispersão	Exemplo
Aerossol líquido	Líquido	Gás	Neblina, desodorante
Aerossol sólido	Sólido	Gás	Fumaça, poeira
Emulsão	Líquido	Líquido	Leite, manteiga
Emulsão sólida	Líquido	Sólido	Margarina, pérola
Espuma	Gás	Líquido	Espuma retardante de fogo
Espuma sólida	Gás	Sólido	Isopor®
Sol	Sólido	Líquido	Tinta, pasta de dente
Sol sólido	Sólido	Sólido	Vidro, plástico pigmentado

Um sistema coloidal é considerado estável quando resiste à floculação ou a sedimentação. A formação de agregados de partículas em dispersão acontece através da adesão de umas às outras em determinadas circunstâncias. Esta formação pode ser reversível, processo denominado de floculação, ou irreversível, processo denominado de coagulação. A sedimentação de partículas ocorre devido à ação da força gravitacional. Na Figura C2 está representado esquematicamente os processos envolvidos no conceito de estabilidade de um sistema coloidal (ANDRADE, 2008; OROPEZA, 2011).

Figura C2 - Representação esquemática de processos de sedimentação, floculação e coagulação envolvidos no conceito de estabilidade de um sistema coloidal. (ANDRADE, 2008).

A teoria DVLO, criada pelos cientistas Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek, descreve a interação entre partículas coloidais e seu comportamento agregatório (TREFALT; BORKOVEC, 2014). Esta teoria propõe que a estabilidade do sistema coloidal só é possível se as forças repulsivas entre as partículas forem dominantes. A força repulsiva produz uma barreira energética que impede que duas partículas se agreguem, porém, se através da colisão de partículas acontecer a ultrapassagem dessa barreira ocorrerá uma aderência forte e irreversível, devido a força atrativa. Portanto, se as partículas se repelirem fortemente, o sistema será estável. Um método comumente utilizado para avaliar a estabilidade coloidal de um sistema é o potencial zeta (MALVERN INSTRUMENTS, 2011c).

Ao redor de uma partícula inserida em meio aquoso existe uma dupla camada elétrica, uma camada interior (*Stern Layer*) onde os íons estão fortemente ligados a partícula, e uma exterior, situada na região difusa, onde os íons estão menos fortemente associados (Figura C3). Quando a partícula se movimenta, os íons na dupla camada também se movimentam. O potencial zeta é o potencial na superfície de cisalhamento hidrodinâmico, ou seja, no limite da camada exterior (MALVERN INSTRUMENTS, 2011c).

Figura C3 - Representação de uma partícula em meio aquoso, sua dupla camada elétrica (interior e exterior) e ponto de medição do potencial zeta. Adaptado de (HORIBA SCIENTIFIC, [S.d.]).

De acordo com o comportamento de estabilidade dos coloides (Tabela), se as partículas em suspensão apresentarem um grande potencial zeta (geralmente entre +30 mV ou -30 mV), haverá estabilidade coloidal, portanto não haverá a tendência da união entre as partículas. É importante a partícula ter a mesma densidade do dispersante, caso contrário irá ocorrer à sedimentação (MALVERN INSTRUMENTS, 2011c).

Tabela C2 - Comportamento de estabilidade dos coloides de acordo com o Potencial Zeta (OROPEZA, 2011).

Potencial Zeta (mV)	Comportamento de estabilidade dos coloides
0 até ± 5	Rápida coagulação ou floculação
± 10 até ± 30	Instabilidade incipiente
± 30 até ± 40	Estabilidade moderada
± 40 até ± 60	Boa estabilidade
Mais de ± 61	Excelente estabilidade

Vários fatores influenciam o potencial zeta, o mais importante deles é o pH. Por exemplo, se uma proteína em suspensão coloidal possui o potencial zeta negativo, e álcali é adicionado à suspensão, as partículas tendem a adquirir mais carga negativa, devido à desprotonação de grupamentos amina ou imidazol. Se ácido é adicionado, em algum momento a carga será neutralizada, tendendo a se tornar positiva caso haja

mais adição de ácido. Neste caso o potencial zeta será positivo em baixo pH e negativo em alto pH (MALVERN INSTRUMENTS, 2011c; SILVA, 2015).

No ponto de intersecção do pH em que o potencial zeta é igual a zero (ponto isoelétrico) o sistema coloidal é menos estável. Na Figura , por exemplo, é possível observar como o pH influencia o potencial zeta. Entre os valores de pH=4 e pH=8 as partículas estão instáveis, o ponto isoelétrico é aproximadamente no pH=6 (ANDRADE, 2008). Essas características, da partícula e do meio onde ela se insere, são importantes, pois afetam a estabilidade e funcionalidade de partículas utilizadas como vetores não virais.

Figura C4 – Perfil do potencial zeta (mV) em função do pH (ANDRADE, 2008).