MARLOUS VINÍCIUS GOMES LANA

Utilização de shRNA anti-hexon, anti-IVa2 e anti-pol durante a produção de vírus adeno-associado como estratégia de eliminar Adenovírus helper: prova de princípio

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

MARLOUS VINÍCIUS GOMES LANA

Utilização de shRNA anti-hexon, anti-IVa2 e anti-pol durante a produção de vírus adeno-associado como estratégia de eliminar Adenovírus helper: prova de princípio

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lana, Marlous Vinícius Gomes

Utilização de shRNA anti-hexon e anti-IVa2 durante a produção de vírus adenoassociado como estratégia de eliminar adenovírus helper : prova de príncipio / Marlous Vinícius Gomes Lana. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Descritores: 1.Adenoviridae 2.Interferência de RNA 3.Terapia genética 4.Replicação viral 5.Vírus auxiliares 6.Proteína hexon de adenovírus

USP/FM/DBD-459/15

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador e chefe, Prof. Dr. Bryan Eric Strauss pela oportunidade de estar em seu laboratório, pela confiança e pelos valores ensinados. Obrigado por acreditar em mim!

Ao Prof. Dr. Roger Chammas pelo apoio em diversas formas, obrigado também pela oportunidade!

Aos colegas do Laboratório de Vetores Virais, Aline Hunger, Daniela Zanatta, Gissele Rolemberg, Igor de Luna, João Paulo Catani, Paulo Del Valle, Rodrigo Tamura, Ruan Medrano, Ruana Calado, Samir Andrade, Taynah Ibrahim e Zenóbio Viana pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular Incor, onde parte deste trabalho foi realizado.

Aos alunos e funcionários do Centro de Investigação Translacional em Oncologia, onde parte deste trabalho foi realizado.

À Luciana Vasques pela ajuda no design dos shRNAs.

À Vinicius Bassaneze e à Unifesp pela ajuda no cell sorting.

Aos meus amigos de Botucatu que mesmo estando longe se fizeram muito presentes nesses anos. Muito obrigado à Tchuin, Dyaxu, Ploc, Takííí, Istraiss e em especial Póket. Amiga, você faz muita falta!

À minha família que sempre me apoiou incondicionalmente. Aos meus pais Manoel e Lourdes, minhas irmãs Andréia e Andreíza e por fim minha sobrinha Manuela. Amo muito vocês!

Lista de	Figuras	8
Lista de	tabelas	. 10
Resumo		. 11
Abstract		. 12
1. Intr	odução	1
1.1.	Adenovírus	1
1.1.	l. Estrutura da partícula do Ad	1
1.1.2	2. Estrutura do genoma do Ad e cascata de transcrição	4
1.2.	Vetores adenovirais	6
1.3.	RNAi	8
1.3.	1. MiRNA vias canônica e não canônica	9
1.3.2	2. Sistema de expressão por shRNA	. 11
1.4.	Uso de RNAi para bloquear a replicação de Ad	. 13
1.5.	Vírus Adenoassociado	. 13
1.6.	Vírus Adenoassociado recombinante	. 15
1.7.	Utilização de vetores híbridos para a produção de AAV	. 17
2. Just	ificativa	. 19
3. Obj	etivos	. 21
3.1.	Objetivos específicos	. 21
4. Mat	eriais e Métodos	. 22
4.1.	Manutenção das linhagens celulares	. 22
4.2.	Estoques de Adenovírus	. 22
4.3.	Clonagem	. 22
4.4.	Produção de estoques virais	. 25
4.5.	Transdução e seleção com antibiótico das linhagens HEK 293T anti-IV	⁷ a2,
anti-h	exon e anti-pol	. 26
4.6.	Análise por citometria de fluxo e cell sorting	
4.7.	Expansão clonal das linhagens	
4.9.	Ensaio de cinética da infecção com Ad-LacZ nas linhagens criadas	
4.10.	Ensaio de transdução das células HT1080 com Ad-LacZ	
4.11.	Coloração com X-gal	
4.12.	RT-qPCR	. 28
4.13.	Imunofluorescência para detectar hexon	. 29
4.14.	Análises por microscopia eletrônica de transmissão da célula infectada	. 30
4.15.	1 , 0	
116	hexon	31
4.16.	Análise estatística	
o. Kesi	ultados	. 33

	5.1.	Construção dos vetores lentivirais Lego anti-IVa2, Lego anti-hexon e Lego	anti-
		pol	33
5	.2.	Caracterização das linhagens que expressam shRNA	36
	5.2.1.	Caracterização por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo	36
	5.2.2.	Caracterização funcional por RT-qPCR	39
	5.2.3.	Caracterização funcional por ensaio de cinética de produção de Ad-Lac	Z . 40
5	.3.	Caracterização da linhagem 293T anti-hexon após cell sorting	41
	5.3.1.	Caracterização por citometria de fluxo	41
	5.3.2.	Caracterização funcional por RT-qPCR	41
	5.3.3.	Caracterização funcional pela cinética de produção de Ad-LacZ	42
	5.4.	Caracterização dos clones selecionados a partir da linhagem 293T anti-hexo	on PS
			43
5	.4.1.	Caracterização por citometria de fluxo	43
	5.4.2.	Caracterização funcional por RT-qPCR	45
	5.4.3.	Caracterização funcional por ensaio de imunofluorescência	45
	trans	5.4.4. Caracterização funcional através da produção de Ad-Ladução do lisado em HT1080	
5	.5. A	Avaliação da eficiência de inibição através de microscopia eletrônica	47
5	.6. A	Avaliação do título viral na produção em larga escala	49
6.	Discu	ISSÃO	51
7.	Conc	lusão	57
8.	Refer	ências	58
Ane	exo I –	Comprovante de aprovação pelo Comitê de Ética	62
		- Capítulo de livro	

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática da partícula adenoviral	2
Figura 2 Representação esquemática do genoma do Adenovírus humano tipo 5	4
Figura 3 Diferenças entre as gerações de vetores adenovirais.	8
Figura 4 Esquema de ativação do RNAi.	11
Figura 5 Esquema de um cassete de expressão de shRNA	12
Figura 6 Desenho representando a estrutura do AAV	15
Figura 7 Representação esquemática de um sistema para produção de rAAV	16
Figura 8 Oligonucleotídeos que codificam shRNA contra proteínas adenovirais que fo	ram
inseridos nos vetores lentivirais Lego.	23
Figura 9 Posição dos shRNAs no genoma adenoviral.	33
Figura 10 Mapa do vetor Lego anti-IVa2	34
Figura 11 Verificação do clone do vetor Lego anti-IVa2.	34
Figura 12 Verificação do clone do vetor Lego anti-IVa2.	34
Figura 13 Mapa do vetor Lego anti-hexon	35
Figura 14 Verificação do clone do vetor Lego anti-hexon	35
Figura 15 Mapa do vetor Lego anti-pol	36
Figura 16 Verificação do clone do vetor Lego anti-pol.	36
Figura 17 Análise das células por microscopia confocal	37
Figura 18 Perfil da intensidade de fluorescência nas linhagens selecionadas	38
Figura 19 Expressão relativa de mRNA viral nas linhagens que contem shRNA	39
Figura 20 Ensaio de cinética Porcentagem de células HT1080 b-gal positivas	40
Figura 21 Perfil da intensidade de fluorescência nas linhagens selecionadas	41
Figura 22 Expressão relativa de mRNA para o gene hexon na linhagem 293T anti-hexon PS	42
Figura 23 Ensaio de cinética da infecção por Ad-LacZ.	43
Figura 24 Caracterização dos clones obtidos a partir da linhagem 293T anti-hexon PS	44

Figura 25 RT-qPCR para gene hexon dos clones	45
Figura 26 Imunofluorescência para hexon.	46
Figura 27 Avaliação funcional dos clones através da transdução de células HT1080 com	os
	_
lisados	47
Figura 28 Perfil das células das linhagens infectadas com Ad-LacZ	48
Figura 29 Quantificação das partículas adenovirais analisadas por microscopia eletrônica	49
Figura 30 Título infeccioso das produções de Ad-LacZ na 293T e clone 2	50

Lista de tabelas

Tabela 1 Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a RT-qPCR	29
Tabela 2 Porcentagem das células eGFP+ nos clones dervidados da linhag	gem 293T anti-hexor
PS	44

Resumo

O Adenovírus (Ad) é um agente etiológico que causa infecções em diversas espécies e também pode ser utilizado na forma de vetor como ferramenta tecnológica para terapia gênica. O Controle sobre a replicação de Ad pode trazer beneficio para o combate de infecções e para as tecnologias de transferência genica. Porém, poucas ferramentas existem que podem inibir a replicação de Ad. Uma aplicação importante seria a inibição da replicação de Adenovírus helper utilizado na produção de Vírus Adenoassociado recombinante (rAAV), assim minimizando contaminação da produção de rAAV com o virus helper. Dessa maneira o objetivo desse trabalho foi investigar se há inibição da replicação do Ad mediada por RNA de interferência (RNAi) direcionada para alvos adenovirais chaves. Para isso foram construídos vetores lentivirais que codificam shRNAs para os genes hexon, IVa2 e pol. Em seguida foram criadas linhagens que expressam constitutivamente os shRNAs em 293T, células onde os vetores adenovirais conseguem se replicar. Os shRNAs específicos para hexon e IVa2 promoverem significantemente a redução dos níveis destes mRNAs conforme revelado utilizando RT-qPCR para quantificação dos transcritos adenovirais. Em seguida, knockdown do gene hexon se mostrou promissor em inibir a replicação do Ad, visto como redução de vírus produzido em células 293T anti-hexon. O knockdown do transcrito de hexon e a redução em replicação de Adenovírus foram mais acentuados após cell sorting e obtenção de clones celulares a partir da linhagem anti-hexon. O clone anti-hexon mostrou significante redução na quantidade de partículas adenovirais visualizadas por microscopia eletrônica e redução de 92% das partículas infecciosas em relação a 293T quando a produção foi realizada em larga escala. Esses resultados indicam que a tecnologia de shRNA para inibir a replicação do Ad é promissora e representa o primeiro passo de desenvolvimento de uma estratégia para a produção de rAAV livre de contaminação com Ad helper.

Abstract

Adenovirus (ad) is an etiologic agent that causes infections in diverse species and can also be used as a technologic resource, such as a vector applied in gene therapy. Control over Ad replication could be beneficial for the combat of infections and for the technology of gene transfer. However, few tools exist that may useful for the inhibition of Ad replication. One important application would be to impede replication of helper adenovirus utilized in the production of recombinant Adenoassociated Virus (rAAV), thus minimizing the contamination of the rAAV production with helper virus. The objective of the study was to investigate the use of RNA interference (RNAi) directed against key adenoviral targets as an inhibitor of Ad replication. For this, lentiviral vectors encoding shRNAs for hexon, IVa2 and pol were constructed. Next, constitutive expression of the shRNAs was established in 293T cells, the parental cell line that is permissive for adenovirus replication. The shRNAs specific for hexon or IVa2 significantly promoted reduction in the level of these mRNAs as revealed by RT-qPCR quantification of the adenoviral transcripts. Next, knockdown of hexon was shown to be promising as an inhibitor of Ad replication, seen as the reduction of Ad produced in the 293T anti-hexon cell line. Both the knockdown of the hexon transcript and reduction in adenovirus replication were accentuated after cell sorting and isolation of cellular clones from the anti-hexon cell line. The anti-hexon clone showed significant reduction in the quantity of adenovirus particles when visualized by electron microscopy and 92% fewer infectious particles as compared to the parental 293T cells when full scale production was made. These results indicate that the use of shRNA technology for the inhibition of Ad replication is promising and represents the first step for the development of a strategy for the production of rAAV free from helper virus contamination.

1. Introdução

1.1.Adenovírus

O Adenovírus (Ad) é um vírus implicado em várias patologias em diversas espécies. As infecções por Ad em humanos ocorrem predominantemente em adultos jovens e crianças, causando, por exemplo, problemas respiratórios e intestinais (1). O Ad foi isolado pela primeira vez em 1953 por Rowe e colaboradores, sendo descrito como agente que causava degeneração espontânea de células epiteliais, a partir de tecido adenoide removido cirurgicamente de crianças e militares com doença febril (2). Os Ads são vírus não envelopados, de simetria icosaédrica, possuem de 70 a 100 nm de diâmetro (3). Os Adenovírus possuem um genoma de DNA linear com fita dupla, de tamanhos que variam entre 30 e 40 kb, sendo que o Adenovírus humano tipo 5 possui 35.935 pb.

Os Adenovírus possuem cinco gêneros distintos, sendo os Adenovírus humanos pertencentes ao gênero *Mastadenovirus*. Atualmente existem sete espécies de Ad humanos (de A a G) e 67 tipos, nos quais de 1 a 51 foram determinados por sorotipagem e os demais (52 a 67) foram identificados por análises de genômica e bioinformática (4).

1.1.1. Estrutura da partícula do Ad

Didaticamente, podemos dividir a estrutura do vírion em três porções distintas. Capsídeo externo, capsídeo interno e core viral. A Figura 1 ilustra o esquema de uma partícula adenoviral.

O capsídeo externo é a porção mais superficial da partícula, ele é responsável por interagir com os receptores celulares e suas proteínas são o principal alvo da ação de anticorpos neutralizantes durante a infecção. Seus componentes são as proteínas hexon,

fibra, base pentônica e IX. O hexon é a proteína que compõe majoritariamente o capsídeo viral, sendo o principal componente do mesmo. É conhecido que as porções C e N terminais dos monômeros de hexon interagem e adotam diferentes conformações para interagir com outros monômeros de hexon ou com proteínas do capsídeo interno (5). A base pentônica e a fibra compõem os vértices da partícula adenoviral e exercem função chave nos estágios iniciais da infecção. A porção C terminal da fibra, denominada knob, é responsável pela interação inicial da partícula com a célula hospedeira, através da ligação com *coxsackie adenovirus receptor* (CAR), na maioria dos sorotipos humanos. Então o motivo RGD da base pentônica se liga integrinas $\alpha_v \beta_3$ e $\alpha_v \beta_5$ permitindo a internalização da partícula via endocitose (5). A proteína IX é a menor proteína localizada na parte externa do capsídeo. Ela interage com a proteína hexon e confere estabilidade da partícula. É interessante ressaltar embora exerça esse papel, IX é dispensável para a montagem do capsídeo (6).

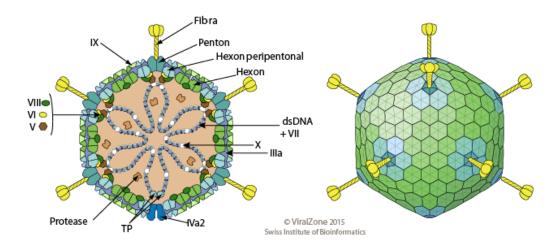


Figura 1 Representação esquemática da partícula adenoviral. A partícula da esquerda mostra em detalhes todos os componentes estruturais do capsídeo externo, o capsídeo interno e do core viral. À direta está representado o capsídeo externo com as projeções da proteína da fibra no formato icosaédrico. (Adaptado deViralZone: www.expasy.org/viralzone,SIB Swiss Institute of Bioinformatics).

As três proteínas que formam o capsídeo interno são IIIa, VI e VIII. A proteína IIIa interage com a proteína hexon. A função dessa proteína está ligada à estabilidade da região do vértice e do genoma empacotado na montagem, sinalização para o vértice e liberação do genoma durante o desnudamento da partícula (5). A proteína VI é dita como multifuncional. Dentre suas diversas funções estão as de permitir o escape do vírus do endossomo para o citosol, facilitar o tráfego da partícula via microtúbulos e auxiliar o transporte da proteína hexon recém sintetizada para o núcleo (5). O papel da proteína VIII ainda é pouco conhecido. Mutações em seu gene resultou em um fenótipo termolábil, o que sugere sua contribuição para a arquitetura do capsídeo (7).

O core viral é formado pelas proteínas V, VII, X, TP, protease e IVa2 juntamente com o genoma viral. A proteína V tem a função de ancorar o DNA viral ao capsídeo por meio da interação com a base pentônica (8). A TP (terminal protein) é uma proteína que se liga covalentemente próximo às ITRs (estrutura genômica do Ad, descrita a seguir) e exerce papel na replicação do DNA viral agindo como primer para a iniciação (9). A protease viral é necessária para processar alguns componentes estruturais e garantir a maturação do virion (10). Interessantemente a protease viral dos Adenovírus se destaca de outras proteases virais por usar como cofator o DNA viral. Tem sido proposto que a protease viral utiliza o DNA viral como trilha para se difundir dentro do capsídeo e alcançar todos os seus substratos. (11). A IVa2 é importante para a montagem do capsídeo (12) e também para encapsidação do genoma viral pela ligação ao sinal de empacotamento como um complexo multimérico com a proteína não estrutural codificada pelo vírus L1 52/55K (13-15). Foi demonstrado que vírus mutantes com falta de IVa2 são incapazes de formar capsídeos virais (12).

1.1.2. Estrutura do genoma do Ad e cascata de transcrição

O genoma dos Adenovírus constituído por DNA de fita dupla é flanqueado, em suas extremidades por ITRs (*inverted terminal repeats*), que funcionam como origem de replicação. Próximo à ITR esquerdo está o sinal de empacotamento, necessário para a internalização do genoma no capsídeo (3). Além das ITRs o genoma do Ad pode ser dividido em duas regiões principais, de acordo com a ordem de expressão no ciclo replicativo: *early* (precoce) e *late* (tardia). A Figura 2 exemplifica a estrutura do genoma de um Ad, no caso Adenovírus humano tipo 5.

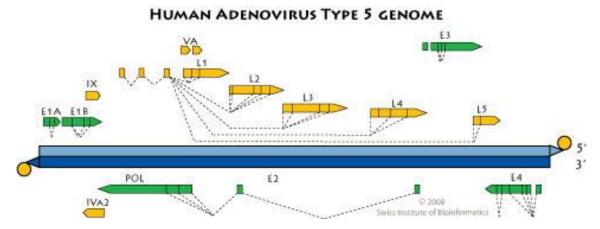


Figura 2 Representação esquemática do genoma do Adenovírus humano tipo 5. Os genes em verde representam os genes *early* e os amarelos os genes *late* (ViralZone: www.expasy.org/viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)

A região *early* possui quatro unidades de transcrição, E1, E2, E3 e E4, possuindo cada uma delas um promotor específico (5). Os genes *early* correspondem aos genes que são expressos no início do ciclo de replicação. Esses genes correspondem à genes não estruturais que vão modular o metabolismo da célula para que essa se torne mais susceptível à replicação viral (3).

A cascata de expressão das proteínas adenovirais pode ser dividida em três fases: precoce, intermediária e tardia. O gene E1A é transcrito imediatamente após o genoma viral entrar no núcleo. A proteina E1A inativa Rb (retinoblastoma) liberando ativadores

transcricionais celulares, como E2F1, levando a célula a entrar na fase S do ciclo celular e iniciando a expressão dos demais genes *early* (3). Já a região E1B codifica duas proteínas que tem a função de inibir a apoptose. A proteína E1B-19K interage com membros da família Bax, que induzem apoptose na célula (16). A proteína E1B-55K interage com a proteína p53, um supressor tumoral que regula ciclo celular e pode induzir a célula a apoptose ou senescência (3).

Os produtos da região E2 permitem a replicação do genoma viral. São eles E2A (*DNA-binding protein* ou DBP) e E2B (TP e Pol). A DBP se liga ao DNA fita dupla ou fita simples mudando sua estrutura drasticamente. Ela coopera para a replicação do material genético de diversas formas. Além de aumentar a atividade da Pol, muda sua sensibilidade a inibidores (9).

A região E3 varia entre as espécies de Ad. Dentre suas funções estão principalmente a de inibição da célula hospedeira a apoptose e modular a resposta do sistema imune e, portanto, não são atividades necessárias para a replicação viral em cultura de células (17). Dentre seus transcritos destaca-se a ADP (*adenovirus death protein*) única proteína que é expressa na fase tardia e auxilia na lise celular (18).

A região E4 apresenta seis polipeptídeos que principalmente tem a função de aumentar o metabolismo do mRNA viral juntamente com proteínas da região E1B, promover a replicação do DNA viral e parar a síntese de proteínas do hospedeiro (3).

A região intermediária transcreve apenas duas proteínas: IX e a IVa2. O proteína pIX é uma proteína estrutural que auxilia a proteína hexon, conferindo estabilidade à mesma (4). Já a proteína IVa2 se liga ao promotor tardio principal (MLP) de uma maneira sequência específica e assim atua como um intensificador da transcrição dos genes *late* (19).

A região *late* é formada por cinco transcritos principais: L1, L2, L3 L4 e L5. Os genes *late* possuem transcrição comandada pelo MLP. A expressão de L4-22K pelo promotor L4 ativa ao máximo a expressão do MLP (20). As proteínas L4-22K e L4-33K regulam o padrão de splicing dos transcritos (21). Uma vez inteiramente ativado produz os transcritos de L1 a L5 permitindo a síntese que todas as proteínas estruturais que vão compor a partícula viral. Dentre os transcritos estruturais do Ad, L1 gera a proteína IIIa, L2 gera a base pentônica, VII, V e X. L3 gera VI, hexon e protease, L4 gera pVIII e L5 gera a fibra (3).

1.2. Vetores adenovirais

Além de ser agente etiológico, o Ad recombinante é amplamente utilizado no campo da terapia gênica como ferramenta de entrega de material genético. Mundialmente o Ad é o vírus mais utilizado como vetor viral nos protocolos clínicos de terapia gênica, sendo atualmente 480 protocolos clínicos, o que representa 22,2% de todos os vetores (22). Dentre as vantagens da utilização dos vetores adenovirais está na escalabilidade de sua produção, com altos títulos (cerca de 10¹² partículas/mL), eficiente transferência genica *in situ* e amplo tropismo.

Por motivo de segurança, os vetores recombinantes derivados do Ad em geral não são capazes de se replicar fora do laboratório. A chave genética que controla a replicação de Ad está no gene E1, como descrito anteriormente. Na ausência das funções do gene E1, o Ad perde a capacidade de se replicar, mas não de transduzir uma célula. Os vetores recombinantes não possuem o gene E1 e, portanto, não podem se replicar.

Em geral a produção do Ad é feita em células HEK293 (do inglês, *Human Embryonic Kidney*) ou um dos seus derivados, como 293A (um clone celular disponível

comercialmente) ou 293T (uma sub-linhagem que expressa o *Large-T antigen*, derivada em 1987 por DuBridge e colaboradores (23). As células HEK293 expressam o gene E1 e, então, fornecem as proteínas E1A e E1B necessárias para produção de Ad recombinante. O processo de produção consiste na amplificação do vírus em HEK293 e posterior purificação por gradiente de cloreto de césio (CsCl) ou iodixanol (3, 24, 25).

A compreensão detalhada da regulação transcricional e das funções das várias proteínas virais no ciclo de vida dos Ads permitiu o desenvolvimento dos vetores adenovirais replicativos deficientes de primeira geração. Esses vetores possuem os genes E1 e/ou E3 deletados de seu genoma (26). Vetores que contém a região E1 deletada são incapazes de se replicar *in vivo* e a remoção da região E3 aumenta a capacidade de inserção do transgene nesses vetores (27). A maioria dos vetores utilizados em estudos pré-clínicos e protocolos clínicos são baseados em vetores de primeira geração.

Existem também os vetores adenovirais de segunda geração, que possui toda a região *early* deletada. Esses vetores possuem uma maior capacidade de inserção do transgene. Porém, a incapacidade de desenvolver linhagens celulares adequadas para a produção *in vitro* tem dificultado seu desenvolvimento posterior (26).

Os vetores adenovirais de terceira geração contém toda a sequência do genoma viral deletada, exceto as ITRs e a sequência de empacotamento, sendo conhecidos como Adenovírus "gutless" (do inglês, "sem vísceras"), ou Adenovírus de alta capacidade, ou Adenovírus helper dependentes. A produção desses vetores requer a coinfecção da célula produtora com um vírus helper e emprego de um sistema molecular que impede a encapsulação do genoma helper na progênie viral. A maior vantagem na utilização desses vetores é a capacidade de inserir sequências de até 36 kb, a duradora expressão

viral e a diminuição da resposta imune contra as proteínas virais devido à expressão do vetor, que acontece nos vetores de primeira e segunda geração (26). A grande desvantagem da utilização desse vetor é justamente a contaminação das preparações finais com vírus *helper*. Nesse sentido o uso de sistema de recombinação para evitar o empacotamento do vírus *helper* é um exemplo da tentativa de superar essa limitação (28). A Figura 3 esquematiza de forma simplificada as diferenças entre as gerações dos vetores adenovirais.

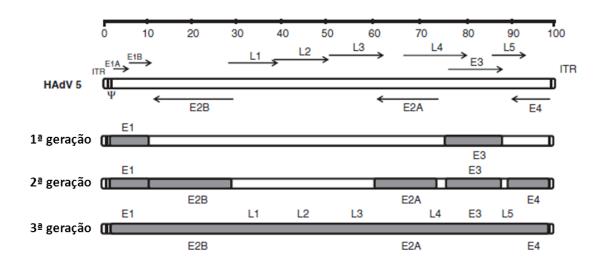


Figura 3 Diferenças entre as gerações de vetores adenovirais. As regiões em cinza representam as regiões deletadas nos vetores. O esquema superior mostra o genoma do Adenovírus humano tipo 5 inalterado. Logo Abaixo são mostrados os vetores de primeira geração que possuem as regiões E1 e E3 deletadas. Em seguida os vetores de segunda geração que possuem todos os genes *early* deletados. O último esquema mostra os vetores de terceira geração que contém apenas as ITRs como sequência viral. Adaptação de (28).

1.3.RNAi

RNA de interferência (RNAi) é um fenômeno de silenciamento gênico póstranscricional mediado por RNA (29). É um mecanismo evolutivamente conservado para resistir à invasão por vírus e a transferência gênica. Em 1998, Fire e colaboradores propuseram o termo RNAi após descobrir que era RNA de fita dupla (dsRNA) o responsável pelo sileciamento gênico, estudando C. elegans (30). Em 2006 Andrew Z.

Fire e Craig C. Mello ganharam o Prêmio Nobel de Fisiologia após tal descoberta. MicroRNAs (miRNA), small interfering RNA (siRNA) exógeno e short hairpin RNA (shRNA) são exemplos fisiológicos, sintéticos ou recombinantes, respectivamente, de pequenos RNAs que englobam uma variedade de funções desde regulação da expressão gênica a defesa contra vírus (31).

1.3.1. MiRNA vias canônica e não canônica

Dentro do genoma humano os miRNAs são transcritos a partir de várias regiões intergênicas e intragênicas pelas RNA polimerases II e III (32). Em geral miRNAs intergênicos tem seu próprio sistema de expressão, incluindo região promotora e sequência terminadora, localizando-se entre genes codificadores de proteínas. Porém, cerca de um terço dos miRNAs estão localizados dentro de íntrons de sequências codificadoras ou não de proteínas e são transcritos a partir dos promotores dessas sequências, sendo chamados de miRNAs intragênicos ou mirtrons (31). Por causa de sua complexidade essas vias são divididas em duas principais: canônica e não canônica.

A via canônica se inicia a partir de síntese de uma estrutura secundária especial do tipo *hairpin* chamada miRNA primário (pri-miRNA), que permitirá a ligação de um complexo microprocessador à sua estrutura. Drosha, uma nuclease da família das RNAses III, DGCR8, uma heme proteína com duplo Fe⁺³ ligado a císteina, e HDAC1, histona deacetilase 1, são os principais componentes desse complexo. HDAC1 é responsável por aumentar a afinidade de DGCR8 ao pri-miRNA (33). DGCR8 é um regulador intermediário, que reconhece o pri-miRNA e se liga à Drosha. Drosha é responsável por reconhecer e clivar o pri-miRNA. Em resumo, o complexo microprocessador reconhece, se liga e cliva o pri-miRNA, formando o chamado miRNA precursor (pre-miRNA) (31).

O pre-miRNA, uma sequência de 60 a 70 nucleotídeos contendo uma região de loop, se liga à Exportina-5, proteína bem descrita na literatura envolvida no transporte núcleo-citoplasma, e é lançado para o citoplasma, onde encontra a ribonuclease Dicer (31). Dicer é responsável por clivar o pre-miRNA, liberando uma sequência de dsRNA com 19-25 nt de tamanho (29). Essa por sua vez, chamado de miRNA maduro, se liga ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que seleciona uma das fitas desse pequeno RNA para se ligar e ir diretamente na fita de RNA mensageiro (mRNA), podendo levar a sua degradação, bloqueando assim a tradução daquela sequência (29). A Figura 4 esquematiza de forma simplificada esse processo.

O microprocessamento não é necessário para expressão de todos os miRNAs. Mirtrons e simtrons, mirtrons independentes de splicing, são exemplos dessas via chamada de não canônica. Mirtrons são derivados de introns em uma maneira dependente de spliceossoma e independente do complexo microprocessador. Já os simtrons são derivados de introns e são spliceossoma independentes, mas dependem do complexo microprocessador (34).

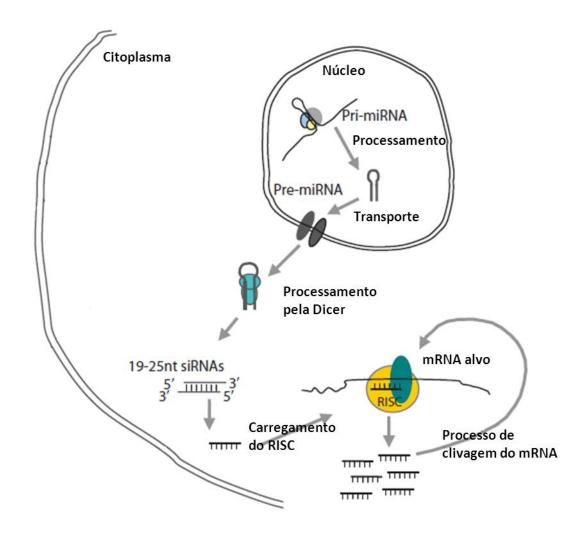


Figura 4 Esquema de ativação do RNAi. A cascata se inicia no núcleo com a transcrição e processamento do pri-miRNA em pre-miRNA. Em seguida no citoplasma há o processamento do pre-miRNA pela Dicer que culmina na formação de um siRNA, que vai compor o complexo proteico RISC para inibir a tradução do mRNA alvo. Adaptação de (29).

1.3.2. Sistema de expressão por shRNA

Para o uso em células de mamíferos, siRNAs são geralmente sintetizados quimicamente ou podem ser gerados a partir da digestão de dsRNA por RNAse III e sua aplicação em células depende em um processo de transfecção. Isto implica que o sucesso no impedimento da tradução de um mRNA alvo depende dos seguintes fatores: o desenho do siRNA, a eficiência da transfecção e a permanência do siRNA dentro da célula. E como consequência, seu efeito poderá ser perdido após proliferação celular.

Alternativamente, estes dsRNAs podem ser expressos a partir de vetores baseados em DNA, nos quais se incluem transpons, vírus e plasmídeos que são modificados para expressar *small hairpin* RNA (shRNA) (29).

Os vetores de expressão de RNAi baseados em DNA, especialmente os lentivírus, são amplamente utilizados nos laboratórios. Dentre as vantagens de se utilizar um vetor de expressão estão a possibilidade de controlar e obter uma alta expressão do gene de interesse. Os vetores lentivirais são capazes de transduzir uma ampla variedade de células que se dividem ou não. Além disso, eles se integram no genoma da célula, permitindo uma expressão estável em longo prazo, diferentemente de siRNAs transfectados que são perdidos durante a divisão celular (35). A estrutura básica de um vetor de expressão de shRNA contém um promotor em conjunto com uma sequência *sense* de 19 a 22 nucleotídeos, uma sequência base loop de 3 a 10 nucleotídeos seguido da sequência *antisense* complementar e uma terminação de 4 a 6 Timinas, como um terminador da transcrição (36), conforme mostra Figura 5. Geralmente os promotores utilizados são do tipo Pol III, tais como U6 e H1(37). Promotores do tipo Pol II também são utilizados, mas para expressar miRNAs artificais e não shRNAs (29).

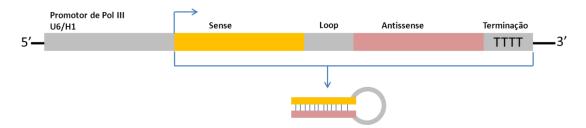


Figura 5 Esquema de um cassete de expressão de shRNA que poderia ser inserido em vetor de transferência gênica. Esses vetores possuem um promotor específico para Pol III no qual a transcrição termina com a formação de um *short hairpin*, consistindo das sequências *sense* e *antisense* pareadas seguida de uma região de *loop*.

1.4.Uso de RNAi para bloquear a replicação de Ad

Devido à sua importância como agente etiológico, novas abordagens terapêuticas têm sido feitas para o tratamento da infecção por Ad, visto que até o momento apenas a droga cidofovir é utilizada para a infecção por Ad. O cidofovir é um nucleosídeo monofosfato análogo a 2-deoxyguanosina. Ele é um substrato para a DNA polimerase viral (38). Sendo que as opções farmacológicas são extremamente limitadas para combater infecção por Ad, os siRNAs tem sido empregados. Em 2007 Chung e colaboradores mostraram a redução da replicação de um Ad selvagem tipo 11 utilizando um siRNA que tinha como alvo o gene E1A (39). Em 2010, Eckstein e colaboradores utilizaram siRNA para inibir a replicação de um Ad selvagem tipo 5, tendo como alvos E1A, IVa2 e hexon (40). Já em 2012 Kneidinger e colaboradores testaram mais de 5 alvos diferentes para inibir a replicação do Ad (41). Como detalhado a seguir, o poder de controlar replicação de Ad teria aplicação além do controle de infecção por vírus selvagem e poderia ser utilizado no campo de transferência genica.

1.5. Vírus Adenoassociado

Já o vírus adenoassociado (AAV) foi descoberto em 1965 como um contaminante de uma preparação de Ad (42). O AAV é um vírus não envelopado que possui um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 22 nm (Figura 6), sendo um dos menores vírus descobertos até o momento (43). Por causa da necessidade de sua coinfecção com vírus helper para que ocorra uma infecção produtiva, o AAV foi classificado num gênero distinto da família *Parvoviridae* designada *Dependovírus*. Possui genoma composto por uma fita simples de DNA linear com tamanho de aproximadamente 4.7 kilobases (Kb). As porções terminais do genoma viral consistem em ITRs (*inverted terminal repeats*) que são sequências com 145 nucleotídeos e formam uma estrutura secundária devido a

regiões palindrômicas (44). As ITRs flanqueiam os dois genes presentes no genoma: *rep* (replicação) e *cap* (capsídeo), codificando proteínas não estruturais e estruturais, respectivamente. O gene *rep* codifica quatro proteínas regulatórias nomeadas Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40. As proteínas Rep78 e Rep68 participam no processo de replicação do DNA do AAV nas suas interações com as ITRs (45). Já as proteínas Rep52 e Rep40 estão envolvidas na geração e acúmulo das fitas simples do genoma viral (46). O gene *cap* codifica as proteínas que compõem o capsídeo viral, VP1 VP2 e VP3.

Treze sorotipos de AAV foram isolados e caracterizados a partir de humanos e primatas e estudos de PCR de tecidos de ambos primatas não humanos e humanos identificaram vários outros genomas de AAV (47). Dentre todos os sorotipos o AAV2 o mais estudado. É interessante observar que o sorotipo do AAV pode determinar o seu tropismo (48). AAV utiliza como receptor para adsorção na célula HSPG (heparan sulfate proteoglycan) (49) e cinco correceptores: Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblasto (FGR 1), Fator de crescimento de hepatócito (HGFR), e integrinas (ανβ5, α5β1) (50, 51). Após a entrada na célula hospedeira o AAV pode seguir dois caminhos diferentes: o ciclo lítico, que se desenvolve na presença de um vírus helper tal como Ad ou herpes simplex virus (HSV), ou na ausência do vírus helper, os AAV entram no ciclo latente e se integram preferencialmente na região AAVS1, localizada na banda cromossômica 19q13.3-qter (52).

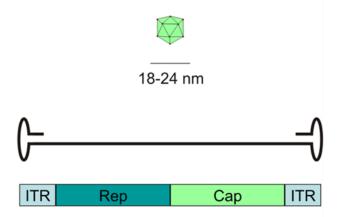


Figura 6 Desenho representando a estrutura do AAV. São mostrados, de cima para baixo, a partícula viral, estrutura terciária do genoma viral e também as principais sequências virais. ITR, inverted terminal repeat; Rep, gene que codifica as proteínas envolvidas em replicação viral; Cap, gene que codifica as proteínas que compõem o capsídeo viral. Adaptado de (53).

1.6. Vírus Adenoassociado recombinante

Historicamente, a maioria dos vetores rAAV são baseados no sorotipo 2 (54, 55). Tipicamente, partículas de rAAV são geradas pela transfecção de células produtoras, em geral a 293T, um subtipo de HEK293, com um plasmídeo contendo o genoma do rAAV clonado, composto do transgene de interesse flanqueado pelos ITRs, e uma construção expressando em trans os genes virais *rep* e *cap*. Na presença das funções de um Ad *helper*, o genoma do rAAV é submetido ao processo lítico de um AAV tipo selvagem, sendo resgatado a partir do plasmídeo suporte, replicado e empacotado em capsídeos de AAV pré-formados como moléculas de fita simples (56).

As funções do Ad *helper* eram originalmente fornecidas pela infecção das células produtoras do rAAV com um Ad tipo selvagem. A subsequente eliminação do vírus *helper* dos estoques de rAAV dependia de propriedades físicas distintas entre Ad e AAV, tais como diferenças na termoestabilidade e densidade em ultracentrifugação em gradiente isopícnico de CsCl. Múltiplos problemas essencialmente relacionados à Ad contaminante limitaram o uso desse método para a preparação de material clínico (57). O achado que as funções do Ad *helper* eram geradas pela expressão dos genes E1A,

E1B, E2A, E4ORF6 e VA RNAs, permitiu uma produção de rAAV livre de Ad, incorporando as sequências de VA RNAs, E2a e E4ORF6 num plasmídeo e transfectando-o juntamente com o plasmídeo codificando o genoma do rAAV e mais o plasmídeo codificando rep e cap em células expressando E1A e E1B (58-60), conforme apresentado na Figura 7. Diversos grupos independentemente encontraram que o uso de plasmídeos para expressar os genes do Ad *helper* numa transfecção transiente resulta numa melhor eficiência na produção de rAAV do que usando a infecção com Ad, talvez por causa da viabilidade reforçada das células produtoras ou pela falta de competição com o vírus *helper* pela maquinaria de replicação do DNA (58-61). Tradicionalmente a transfecção transiente tripla era realizada em placas de células, na "*Nunc cell factory*" ou em garrafas *roller* (58, 62, 63).

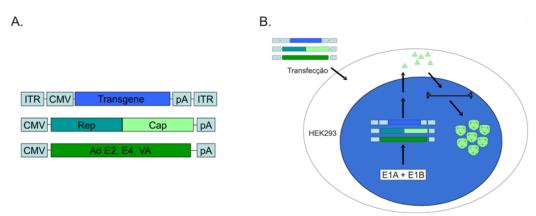


Figura 7 Representação esquemática de um sistema para produção de rAAV. (A) Plasmídeos codificando componentes do rAAV são cotransfectados (B) em células HEK293, que fornecem a expressão dos genes adenovirais E1A e E1B. A progênie viral fornece somente o transgene para células alvo, sendo que as sequências Rep, Cap, E1, E2, E4, VA não são encapsuladas. Assim, replicação do rAAV é limitada e não ocorre fora das condições descritas aqui. Adaptado de (53).

Embora esses métodos melhorem a produção de rAAV, eles são muito difíceis de se aumentar a escala de produção, devido a dependência da transfecção. Tem se buscado o desenvolvimento de métodos de produção em larga escala independentes de transfecção, devido à necessidade de altos títulos do vetor para aplicar em modelos animais grandes e ensaios clínicos humanos (56). Uma das estratégias de produção

independente de transfecção envolve a geração de uma linhagem de células empacotadoras tendo os genes *rep* e *cap* do AAV estavelmente integrados no genoma. A respeito de altos rendimentos do vetor relatados com linhagens celulares produtoras estáveis (64), os maiores desafios estão frequentemente encontrados em estabelecer uma linhagem celular produtora de rAAV estável, tal como a amplificação dos genes *rep* e *cap* integrados. Uma das explicações para esse problema é a ativação mediada por E1A dos promotores do AAV p5 e p19 que controlam as proteínas Rep do AAV. Sabe-se que essas por sua vez são citostáticas (65) e até mesmo citotóxicas (66) se constantemente expressas.

1.7. Utilização de vetores híbridos para a produção de AAV

Vetores híbridos podem ser definidos como vetores quiméricos compostos por elementos de dois ou mais vírus ou vetores combinados com outras proteínas ou componentes genéticos. Esses vetores tem sido continuamente engenheirados para reduzir toxicidade e aumentar a eficácia terapêutica (67). Outra possibilidade é o uso de vetores híbridos para a produção e ampliação de escala.

Na produção de vírus Adenoassociado os pesquisadores tem buscado o uso de Vírus Herpes Simplex (HSV) (68) ou Baculovírus em linhagens celulares de inseto (69). A estratégia é a mesma. Utilizar dois ou mais vetores que vão codificar separadamente os genes *helper*, os genes necessários ao capsídeo do AAV, e por fim um último vetor que contem a sequência do AAV que será empacotada. Esses vetores coinfectam ou cotransduzem a célula produtora para dar origem às partículas de AAV. O Ad foi utilizado em algumas tentativas para produção de AAV. Uma delas separou em dois vetores, um com os genes *rep* e *cap* e outro com a sequência para empacotamento (70). A outra utilizou apenas um vetor Ad-AAV com a sequência com o genoma do AAV

seguido de transfecção dos outros plasmídeos (71). Durante a produção que utiliza um Ad para infectar a célula produtora é necessário aquecer a amostra a 56° por 30 min, na tentativa de eliminar a contaminação por vírus helper. Entretanto, sabe-se que pode restar Ad contaminante, ainda que essa contaminação seja de na casa de 1 u.f.p. (unidade formadora de placa) em 1x10¹⁰ UT (unidades transduzintes) de rAAV (70) Um estudo anterior mostrou que a persistência do Ad contaminante pode durar até semanas *in vivo*, o que leva a necessidade de otimização dos protocolos que utilizam vírus *helper* (72).

2. Justificativa

Na terapia gênica a demanda de AAV para serem utilizadas como vetor em protocolos clínicos é cada vez maior. Um grande estudo em animais ou um ensaio clínico humano pode requerer 10¹⁵ partículas do vetor, as quais envolveriam mais de 10¹¹ células 293T usando cerca de 5000 frascos de T-175 cm2 (69). Estima-se que mais de 20.000 garrafas roller são necessárias para gerar rAAV suficiente para tratar 50 pacientes (73). Dada a necessidade de métodos que aperfeiçoem a produção do vetor muitos estudos foram e continuam sendo feitos a respeito da melhoria da produção. O método da transfecção tripla citado na introdução acima e demonstrado na Figura 7 consome muito tempo, e é muito laborioso, particularmente quando se deseja expandir o processo. É notável que para a produção em escala industrial é inviável a produção de uma grande quantidade de plasmídeo purificado seguida de transfecção em placas de cultura de células. Existem métodos que utilizam Ad recombinante para produzir rAAV. Nestes, as sequências AAV são codificados em vetores adenovirais. Ou seja, vetores híbridos entre AAV e Ad. Assim, células HEK293 podem ser transduzidas com os vetores híbridos Ad-AAV e replicação do AAV capacitada. Entretanto os métodos existentes permitem a replicação do Ad e contam com métodos físicos para eliminação do Ad contaminante. Mesmo com estas medidas de purificação, a contaminação das produções com Ad persiste.

A presente estratégia envolve a eliminação de replicação do Ad durante a produção do rAAV. Ou seja, propõe-se uma estratégia que permite a replicação de rAAV, mas inibe a replicação de Ad, durante o processo de produção. Isto combinado com os métodos de purificação deve ser eficaz em minimizar, se não eliminar, a contaminação com Ad *helper* nas preparações de rAAV. Nós propomos que o silenciamento de genes adenovirais via RNAi pode ser empregado para inibir a

replicação adenoviral. Especificamente, a inibição de IVa2, hexon ou pol deve impedir a formação de partículas Ad viáveis, mas não ter impacto na replicação de rAAV. Se for bem sucedido, vetores Ad-AAV híbridos serão construídos. Imagina-se que um vetor Ad-AAV codificará os genes *rep* e *cap* e um segundo vetor AAV/Ad codificará o gene de interesse flanqueado pelos ITRs do AAV. A produção de cada vetor AAV/Ad seria realizada pelos protocolos tradicionais de Ad. Porém, para iniciar a produção de rAAV, estes serão coinfectadas em células HEK293 portadoras de shRNA especifico para bloquear a tradução de proteínas adenovirais chaves. Assim, será uma combinação entre silenciamento gênico via RNAi e produção utilizando vírus híbrido que permitirá a produção de rAAV sem dependência em transfecção, visando desenvolver um método que possa permitir uma produção de rAAV eficiente, menos laboriosa, ampliável em escala industrial e cujo produto seja livre de partículas Ad *helper* contaminantes.

A meta final desse trabalho é desenvolver um método de produção de vetor viral Adenoassociado independente da transfecção de plasmídeos e que minimize o risco de contaminar o estoque de AAV com vírus *helper*. Para o presente trabalho, foram propostos ensaios funcionais de simples execução para verificar se o *knockdown* de hexon, IVa2 ou Pol inibe replicação de Ad. Na próxima etapa, a prova de princípio seria a produção de AAV utilizando Ad *helper*, mas limitando a replicação do Ad devida a ação do shRNA. Com o sucesso da prova de princípio, futuramente serão montados e testados vetores Ad/AAV híbridos que serão utilizados para produção de rAAV na presença dos shRNAs que inibem replicação do *helper*. Assim, a produção de rAAV não envolverá transfecção (devido o uso do vetor hibrido) e o Ad helper será eliminado (devido a ação do shRNA).

3. Objetivos

O Objetivo geral deste trabalho foi investigar se o *knockdown* de hexon, IVa2 ou pol elimina replicação adenoviral através de ensaios funcionais.

3.1.Objetivos específicos

Construção de vetores lentivirais contendo shRNA anti-hexon, anti-IVa2 ou anti-pol.

Construção de linhagens celulares que expressam shRNAanti-hexon, anti-IVa2 ou anti-pol.

Avaliar a eficiência do *knockdown* na replicação de Adenovírus devido a ação dos shRNAs.

4. Materiais e Métodos

4.1. Manutenção das linhagens celulares

A linhagem transformada por Adenovírus HEK293 (human embrionic kidney 293) foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO-BRL, Grand Island, New York, EUA) suplementado com 10% de BCS (bovine calf serum) Hyclone Defined, (Hyclone, Logan Utah, EUA), 50 μg/mL de gentamicina, 25 μg/mL de ampicilina e 2,5 μg/mL de fungizona (anfotericina B), sendo mantida a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

4.2. Estoques de Adenovírus

O vetor Adenoviral que expressa o gene da β -galactosidase (Ad-LacZ, Invitrogen, Life Technologies) utilizado nos experimentos para esse projeto foi previamente produzido, titulado e armazenado em alíquotas a -80 °C.

4.3.Clonagem

As preparações de plasmídeos foram realizadas utilizando o kit comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fornecedor. A concentração final de cada preparação foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 260 e 280nm.

As digestões realizadas para os passos de clonagem foram feitas utilizando 20 μg de DNA inicial, 20 U de enzima em um volume final de 60 μL , seguindo sempre as orientações de cada fabricante.

Os pares oligonucleotídeos mostrados na Figura 8 abaixo representam o inserto introduzido nos vetores. Eles contem um sítio de *Bam*HI na extremidade 5' para facilitar

a verificação do clone e a outra extremidade *overhang* de *Xho*I, para serem inseridos nos sítios de *Hpa*I e *Xho*I dos vetores lentivirais Lego 1xT/Bsd e Lego G/Neo-opt (gentilmente fornecidos pelo Kristoffer Weber Riecken, University Medical Center, Hamburg, Germany). Os oligonucleoídeos passaram por tratamento com T4 Kinase (Invitrogen), sendo incubados a 37°C por 30 minutos, em seguida incubação a 95°C 5 minutos para inativação da enzima, seguido de resfriamento lento até a temperatura ambiente para hibridização das fitas complementares. A reação seguiu as recomendações do fabricante.

```
Shrna anti-Iva2
5' GGATCCGTTAGTGATCCCAGAAATATTCAAGAGATATTTCTGGGATCACTAACTTTTTGGAAAC 3'
3' CCTAGGCAATCACTAGGGTCTTTATAAGTTCTCTATAAAGACCCTAGTGATTGAAAAAACCTTTGAGCT 5'

Shrna anti-Hexon
5' GGATCCGCTAGAAAGTCAAGTGGAATTCAAGAGATTCCACTTGACTTTCTAGCTTTTTTGGAAAC 3'
3' CCTAGGCGATCTTTCAGTTCACCTTAAGTTCTCTAAGGTGAACTGAAAGATCGAAAAACCTTTGAGCT 5'

Shrna anti-Pol
5' GGATCCCAACGTCTTCCAGCGTCCAACCAAGAGAGAGTTGGACGCTGGAAGACGTTGTTTTTTGGAAAC 3'
3' CCTAGGGTTGCAGAAGGTCGCAGGTTGGTTCTCTCAACCTGCGACCTTCTGCAACAAAAACCTTTGAGCT 5'
```

Figura 8 Oligonucleotídeos que codificam shRNA contra proteínas adenovirais que foram inseridos nos vetores lentivirais Lego.

A reação com fosfatase alcalina (CIAP) foi feita utilizando 2/3 do vetor linearizado. Assim, pudemos utilizar o 1/3 restante como controle. Nessa reação usamos 10U de enzima CIAP, tampão 1X e água para $60~\mu L$ finais. A reação teve duração de 1 hora a 37~° C.

Quando necessária, a purificação do DNA foi realizada por extração de fenol:clorofórmio e precipitação com etanol. Para isso, adicionamos à solução de DNA um volume igual de fenol:clorofórmio, centrifugamos a amostra e coletamos o sobrenadante. Após, adicionamos ao sobrenadante 2X o volume de etanol 100% e um volume de 10% de NaOAc 3M pH 5,2. A mistura é então centrifugada e o sobrenadante

descartado. Adicionamos ao pellet de DNA 200 µL de etanol 70%, centrifugamos e descartamos o sobrenadante novamente, secando o DNA, o qual é após ressuspendido em água ou TE 1X.

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose 1 %, TAE 1X e brometo de etídio (1 µg de brometo de etídeo por mL de gel). Posteriormente, a visualização do DNA foi realizada por exposição à luz UV. Os géis foram fotografados para análise utilizando-se câmera digital (Alpha Innotech Corporation).

Para as construções de cada vetor e etapas de clonagem utilizamos as técnicas de DNA recombinante conforme descrito por (74).

Para ligação usamos 200 ng de vetor, tratado ou não com CIAP, e uma relação de molaridade de duas vezes mais inserto. Na primeira de 4 reações diferentes, havia apenas o vetor linearizado, porém não tratado com CIAP, e água para 20 μL finais. Dessa forma, após a transformação das bactérias saberíamos se a digestão para abrir o vetor foi eficaz. Na segunda reação, utilizamos o mesmo vetor e 400U da enzima *T4 DNA ligase*, além de tampão 1X e água para 20 μL finais, para que assim, se víssemos que na primeira reação a digestão ocorreu de forma apropriada, agora saberíamos se a reação de ligação estaria funcionando corretamente. Já na terceira reação começamos a utilizar o vetor tratado com CIAP juntamente com a enzima *T4 DNA ligase*, tampão 1X e água para 20 μL finais. Dessa forma, saberíamos se a reação com a fosfatase alcalina funcionou como esperado. Por último, na quarta reação, utilizamos o vetor tratado com CIAP, o inserto de interesse, a enzima *T4 DNA ligase*, tampão 1X e água para 20 μL finais, sabendo que, se todas as outras reações funcionaram corretamente, existiriam grandes chances de obtermos nosso clone de interesse nessa reação.

Para a clonagem e manutenção dos fragmentos de DNA obtidos, utilizamos a linhagem de *Escherichia coli* OneShot® Stbl3™ (Invitrogen). As células foram cultivadas em meio LB ou LB-ágar (74), contendo antibióticos apropriados, a 37°C. A indução de competência de Escherichia coli para transformação por métodos químicos seguiu (74).

Todos os plasmídeos obtidos foram mantidos em TE 1X e estocados a -80°C, bem como em clones bacterianos estocados em glicerol a -80°C.

4.4.Produção de estoques virais

Os vetores de transferência Lego anti-IVa2, Lego anti-pol e Lego anti-hexon foram utilizados para a produção de vírus, a partir das construções plasmidiais (maxi-preps). Cada vetor foi cotransfectado na quantidade de 10 μg juntamente com os vetores de empacotamento pMDL-gag/pol (6,5 μg), pRSV-Rev (2,5 μg) e PCMV-VSVg (3,5 μg) em células 293T.

A transfecção do DNA viral foi feita por precipitação com cálcio-fosfato em células 293T mantidas em meio DMEM com 10% de soro de bezerro bovino. Protocolo adaptado de Naviaux et al. (1996) (75). Foram semeadas, com 24h de antecedência, 10⁶ células da linhagem 293T para transfecção em placas 6,0 cm previamente tratadas com gel EIA 0,1%. Os DNAs foram misturado em 250μL de cloreto de cálcio 0.25M, e precipitados com a adição de 250μL do tampão fosfato de sódio/HEPES HBS-2x pH 7,05 (cloreto de sódio 274mM, HEPES 40mM, fosfato monoácido de sódio 2,8mM), sob agitação. A suspensão contendo o precipitado de DNA foi gotejada sobre o meio de cultura das células plaqueadas, seguindo-se incubação por 4h. Após este período, as células foram submetidas a um tratamento com PBS-1x contendo 15% de glicerol

(choque de glicerol) durante 3 minutos, lavadas com PBS-1x e, a seguir, adicionou-se meio DMEM com 10% de soro bovino. Vinte e quatro horas após o início da transfecção as culturas tinham o meio coletado e armazenado a -80°C. O meio era reposto e depois de outras vinte e quatros horas era novamente coletado e armazenado a -80°C.

4.5.Transdução e seleção com antibiótico das linhagens HEK 293T anti-IVa2, antihexon e anti-pol

As células 293T foram plaqueadas 1x10⁵ células/poço em placa 6-poços e após 24h transduzidas com 500μl do vírus do sobrenadante viral, na presença de polibreno (8 μg/mL). Após 24h de transdução foi adicionado o antibiótico correspondente para seleção de cada vírus. Para a Blasticidina foi usada na concentração de 10 μg/mL. Foram plaqueados também controles (sem transdução) onde foi adicionado o antibiótico para monitorar a seleção. Após a morte do controle as células selecionadas permaneceram por mais uma semana com a metade da concentração de antibiótico.

Análise por citometria de fluxo e cell sorting

As células transfectadas com construções contendo o gene marcador eGFP e dTomato foram analisadas através de citometria de fluxo (FACS SCALIBUR, Becton Dickinson-EUA), com o auxílio do software Cell Quest (Becton Dickinson, EUA), avaliando-se a porcentagem de células transduzidas e o nível de expressão, considerando-se a intensidade média das células transduzidas. Para que fosse realizado o *cell sorting*, as células foram expandidas e diluídas na concentração de 10⁶ células/mL em tampão PBS 1X acrescido de 2% de Soro Fetal Bovino e 0,02% de azida sódica. A separação ocorreu por meio do citometro FACSAria II (Becton Dickinson, EUA). Após a seleção as células foram replaqueadas em cultura sob meio normalem placas de 6

poços. A partir de então elas foram expandidas e armazenadas a -80°C (para uso diario) e um estoque criopreservado em nitogênio líquido (LN₂) tambem foi montado.

4.6.Expansão clonal das linhagens

A linhagem 293T anti-hexon que passou pelo *cell sorting* foi plaqueada na diluição de 10 céluas/mL em placas de 96 poços contendo 100 μl por poço. Após o acompanhamento da formação das colônias na placa de 96 poços, os clones viáveis foram expandidos e armazenados a -80°C.

4.7. Análise por microscopia confocal

As linhagens HEK293 anti-IVa2, anti-hexon e anti-pol foram plaqueadas 1x10⁴ células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm. Após 24 horas o meio foi retirado das células, depois as células foram delicadamente lavadas com PBS 1X e montaram-se as lâminas com adição de glicerol 50% nas lamínulas. Após a montagem as células foram levadas imediatamente para o microscópio confocal (LSM 510 Meta/UV com base invertida, Zeiss).

4.8. Ensaio de cinética da infecção com Ad-LacZ nas linhagens criadas

As linhagens 293T, 293T anti-IVa2, 293T anti-hexon e 293T anti-pol foram plaqueadas 5 x 10⁵ células por poço em placas de 35 mm. Após 24 horas as células foram infectadas com um vetor adenoviral que expressa o gene da β-galactosidase (Ad-LacZ) em Multiplicidade de Infecção (MOI) 1. De 12 a 72h após transdução, o sobrenadante juntamente com as células foi coletado e congelado a –80 °C. Após 3 seções de congelamento/descongelamento seguidas o lisado foi centrifugado a 1000 rpm por 5' para retirada de debris celulares, e por fim, aliquotado e armazenado a -80°C.

4.9. Ensaio de transdução das células HT1080 com Ad-LacZ

A linhagem HT1080 foi plaqueada 5 x 10⁴ células por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas as células foram transduzidas com 5 μl dos lisados acrescidos com meio DMEM sem soro num volume total de 500 μl em cada poço. Após 4h foi adicionado 1,5 mL de DMEM + 10% BCS e as células foram incubadas durante 48 horas.

4.10. Coloração com X-gal

Os poços nos quais células HT1080 foram previamente transduzidas com Ad-LacZ foi retirado o meio, adicionado PBS 1X para lavagem e fixadas a 4 °C por 5' com 1 mL do fixador (tampão fosfato 0,1M pH 7,3; 2% paraformaldeído; 0,2% glutaraldeído). Imediatamente após 5' o fixador foi aspirado, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e foi adicionado 1 mL do corante contendo X-gal (0,1M fosfato pH 7,3; 2 mM MgCl₂; 5 mM K₄Fe(CN)₆-3H₂O; 5 mM K₃Fe(CN)₆; X-gal 1 mg/mL). A placa foi protegida da luz e incubada a 37 °C *overnight* para posterior análise.

4.11. RT-qPCR

As linhagens foram plaqueadas 5 x 10⁵ células em placa de 35 mm e após 24 horas foram infectadas com Ad-LacZ em MOI 1. Após 24, 36 e/ou 60 horas de infecção as células foram coletadas com 500 µl de Trizol, onde o RNA total foi extraído. O protocolo de extração foi feito seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita através da leitura por espectofotometria (Nanodrop) bem como a qualidade do RNA extraído foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose 1% para visualização das bandas de RNA ribossomal 18 e 25S. A sequência dos primers para detecção dos genes hexon, IVa2, pol e 18S (gene de referência) Os primers foram

utilizados de acordo com os trabalhos de Kneidgner 2012 (pol) e Eckstein 2010 (IVa2 e hexon) (40, 41) (Tabela 1). Todos os primers foram padronizados para ter eficiência próxima a 100%. A fase de transcrição reversa foi feita a partir de 2 μg de RNA, utilizando transcriptase reserva MMLV (Invitrogen) e *random primers*. Após a transcrição reversa a qPCR foi montada para um volume final de 10 μl, sendo: 6,25 ng de cDNA, 4 pmol de cada primer e 5 μl de SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen). As amostras foram testadas em duplicata e as condições da reação foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C 1, 60°C 1 minuto. O termociclador utilizado para amplificação foi o 7500 e a análise das amostras foi feita pelo programa 7500 software (Applied Biosystems). O método utilizado para a quantificação relativa foi 2-ΔΔCt.

Tabela 1 Sequência dos primers utilizados para a RT-qPCR

Gene	Sequência foward	Sequência reverse
Hexon	5'-CACATCCAGGT GCCTCAGAA-3'	5'-GGTGGCGTAAA GGCAAATG3-'
IVa2	5'-CGTCTCTGGGG TGGAGGTAG-3'	5'-TCCCAGCTTAA CCGCTTTGT-3'
Pol	5'-ATGGCCTTG GCTCAAGCTC-3'	5'-GCGTAGGTTG CTGGCGAAC-3'
18S	5'-CCCCTCGATGC TCTTAGCTG-3'	5'-TCGTCTTCGAAC CTCCGACT-3'

4.12. Imunofluorescência para detectar hexon

As linhagens foram plaqueadas 1,2 x 10⁵ células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro previamente tratadas com gel E1A 0,1%. Após 24 horas as células foram infectadas com Ad-LacZ na MOI 1 e fixadas após 36 horas com PFA 4% por 20 minutos a 4°C. Após fixadas os poços foram lavados com PBS 1X e em seguida permeabilizados com PBS + nonidet p40 0,1% (v/v) por 30 minutos a 37°C e

bloqueadas em PBS + 1% albumina para evitar interação não específica do anticorpo. As células foram novamente lavadas com PBS, incubadas com o anticorpo primário anti-hexon (Abcam) produzido em camundongo, na diluição 1:1000 por 1 hora a 37°C. Após lavagem nas mesmas condições anteriores, as células foram incubadas com o anticorpo secundário contra IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa-Fluor 594 (Thermofisher) na diluição 1:500 por 1 hora a temperatura ambiente. Após mais uma sessão de lavagem as células foram incubadas com Hoescht a 20 μg/mL por 30 minutos a temperatura ambiente. Após sessão de lavagem as lamínulas foram montadas com glicerol 50% e seladas com esmalte.

4.13. Análises por microscopia eletrônica de transmissão da célula infectada

As linhagens 293T e clone 2 foram plaqueadas 5 x 10⁵ células por poço em placas de 35 mm e após 24 horas as células foram infectadas com Ad-LacZ em MOI 1. Após 36 horas as células foram coletadas mecanicamente, centrifugadas a 300 x g por 5' e ressuspendidas em glutaraldeído 2%, onde foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Seguindo a incubação as células foram novamente centrifugadas nas mesmas condições e ressuspendidas em PBS 1X. A partir daí as amostras foram enviadas ao serviço de microscopia da FMUSP. Onde foram processadas e os cortes ultrafinos foram feitos e depositados sobre tela de cobre para microscopia eletrônica. As telas foram analisadas no Microscópio eletrônico de transmissão JOEL-1100. Para contagem das partículas foram analisados apenas núcleos que continham partículas para todas as linhagens. Foram tiradas fotos de cinco campos aleatórios de cada núcleo e contadas 10 células de cada condição.

4.14. Ensaio de produção em larga escala de Ad-LacZ na presença de shRNA anti-hexon

Para cada linhagem, 293T e clone 2, foram plaqueadas 6 X 10⁶ células por placa em 25 placas de 150 mm. Após 24 horas as linhagens foram infectadas com Ad-LacZ MOI 1 e foi utilizado DMEM sem soro num volume de 5 mL como meio mínimo, seguido de incubação por 4 horas em estufa CO₂ a 37°C e posterior adição de 15 mL de DMEM 10% FBS. Após 60 horas as células foram coletadas mecanicamente. Após 3 seções de congelamento e descongelamento o lisado foi purificado por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de iodixanol, no qual foi montado um gradiente em tubos Beckman claros 14 x 89 mm da parte inferior para a superior na seguinte ordem: 0,5 mL de 54% (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 mL de 40% (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 mL de 25% (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl; 2 mL de 15% (w/v) iodixanol em PBS contendo 1 M NaCl, 1 mM MgCl₂ e 25 mM KCl. O lisado foi adicionado cuidadosamente em cima do gradiente e então centrifugado a 35.000 rpm a 10°C por 1 hora utilizando o rotor SW 41 Ti (Beckman). O Adenovírus formou uma banda interface das soluções de 25 e 40%. A banda foi coletada com o auxílio de seringa para perfurar o tubo e após a coleta a solução passou por dessalinização em coluna PD-10 contendo resina SephadexTM G-25 (GE). Após a eluição do vírus em frações de 500 µl, as frações mais concentradas, que apresentaram cor mais esbranquiçada, foram juntadas onde foi adicionado glicerol 50% para ficar na concentração final de 7% e assim foram aliquotadas e estocadas a -80°C. O título infeccioso das alíquotas virais das produções em 293T e no clone 2 foram feitas através do kit Adeno-X rapid titer (Clontech) seguindo instruções do fabricante.

4.15. Análise estatística

As análises estatísticas deste trabalho foram feitas através do *software GraphPad*Prism 5. Os testes utilizados em cada experimento estão indicados na legenda de cada

Figura e os dados foram considerados significativos quando p<0.05.

5. Resultados

5.1.Construção dos vetores lentivirais Lego anti-IVa2, Lego anti-hexon e Lego antipol

A Figura 9 esquematiza a posição dos shRNAs no genoma adenoviral, indicando seus respectivos alvos. Para o desenho do shRNA foram utilizadas as sequências de trabalhos anteriores (40, 41). As sequências (Figura 3) foram desenhadas em conforme descrito na introdução, onde as sequências *sense* e *antisense* (21 nucleotídeos) são divididas por uma sequência não pareada de *loop*.

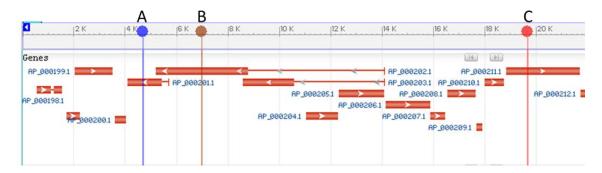


Figura 9 Posição dos shRNAs no genoma adenoviral. (A) shRNA anti-IVa2, (B) shRNA anti-pol, (C) shRNA anti-hexon. Imagem gerada a partir do Gene Bank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) onde a sequência do genoma adenoviral utilizada como molde foi AC_000008.

A Figura 10 representa o mapa do Lego anti-IVa2, onde é esquematizado o shRNA inserido no vetor. Para sua montagem, o vetor Lego 1xT/BSD foi digerido com as enzimas *Hpa*I e *Xho*I e a sequência de shRNA anti-IVa2 foi introduzida. As Figuras 11 e 12 mostram os sítios de restrição para a verificação da clonagem, onde o vetor digerido com *Bam*HI libera uma banda de 624 bp, o que já é confirmatório para verificação do clone devido ao sítio *Bam*HI pré-existente no oligo. Outras digestões que podem ser feitas de forma a complementar a verificação são, digerindo com *Xho*I e *Xba*I separadamente lineariza o vetor, digerindo com *Xho*I + *XbaI* libera uma banda de 385 bp e *Hpa*I não deve digerir o vetor O backbone do vetor contem os genes dTomato (proteína fluorescente vermelha) e BSD como gene repórter e gene de seleção pelo antibiótico Blasticidina, respectivamente.

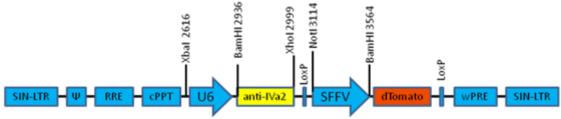


Figura 10 Mapa do vetor Lego anti-IVa2. Acima estão indicados os principais sítios para enzimas de restrição. No mapa também se pode observar o promotor U6, específico para Pol III e o promotor SFFV para expressão do gene repórter.

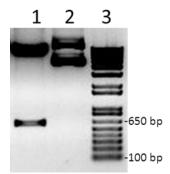


Figura 11 Verificação do clone do vetor Lego anti-IVa2. Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% da digestão de 700 ng do plasmídeo para cada poço. (1) digestão com *Bam*HI, que é confirmatória para clonagem. (2) Vetor não digerido. (3) Marcador 1Kb plus ladder (Thermofisher).

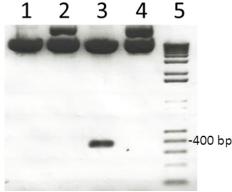


Figura 12 Verificação do clone do vetor Lego anti-IVa2. Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% da digestão de 700 ng do plasmídeo para cada poço. (1) Digestão com XbaI. (2) Digestão HpaI. (3) Digestão XbaI + XhoI. (4) Vetor não digerido. (5) Marcador 1Kb plus ladder (Thermofisher).

O Lego anti-hexon também foi construído com a inserção da sequência shRNA, agora para hexon, conforme mostra a Figura 13. Já a Figura 14 ilustra a verificação do clone seguindo o mesmo padrão, onde o vetor digerido com *Bam*HI libera uma banda de 624 bp, digerindo com *Xho*I e *Xba*I separadamente lineariza o vetor e digerindo com *Xho*I + *Xba*I libera uma banda de 385 bp e *Hpa*I não deve digerir o vetor. O backbone do vetor contem os genes eGFP (proteína

fluorescente verde) e NeoR como gene repórter e gene de seleção pelo antibiótico G418 ou Neomicina, respectivamente.

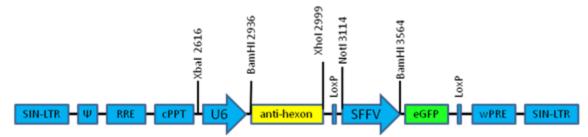


Figura 13 Mapa do vetor Lego anti-hexon. Acima estão indicados os principais sítios para enzimas de restrição. No mapa também se pode observar o promotor U6, específico para Pol III e o promotor SFFV para expressão do gene *reporter*.

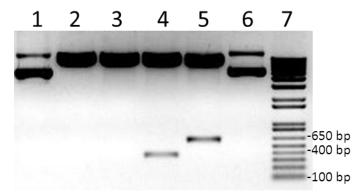


Figura 14 Verificação do clone do vetor Lego anti-hexon. Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% da digestão de 700 ng do plasmídeo para cada poço. (1) Vetor não digerido. (2) Digestão com *Xba*I. (3) Digestão com *Xho*I. (4) Digestão *Xba*I+*Xho*I. (5) Digestão com *Bam*HI que é confirmatória da clonagem. (6) Digestão com *Hpa*I. (7) Marcador 1Kb plus ladder (Thermofisher)

Semelhantemente, o vetor Lego anti-pol também foi construído com a inserção do oligo conforme mostra a Figura 15. Já a Figura 16 ilustra a verificação do clone seguindo o mesmo padrão, onde o vetor digerido com *Bam*HI libera uma banda de 624 bp, digerindo com *Xho*I separadamente lineariza o vetor e *Hpa*I não deve digerir o vetor. O backbone do vetor contem os genes dTomato (proteína fluorescente vermelha) e BSD como gene repórter e gene de seleção pelo antibiótico Blasticidina, respectivamente.

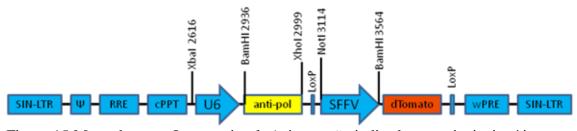


Figura 15 Mapa do vetor Lego anti-pol. Acima estão indicados os principais sítios para enzimas de restrição. No mapa também se pode observar o promotor U6, específico para Pol III e o promotor SFFV para expressão do gene repórter.

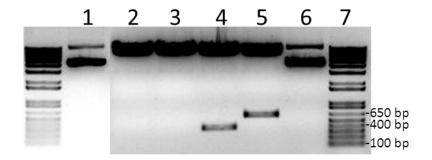


Figura 16 Verificação do clone do vetor Lego anti-pol. Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% da digestão de 700 ng do plasmídeo para cada poço. (1) Vetor não digerido. (2) Digestão com *Xba*I. (3) Digestão com *Xho*I. (4) Digestão *Xba*I+*Xho*I. (5) Digestão com *Bam*HI que é confirmatória da clonagem. (6) Digestão com *Hpa*I. (7) Marcador 1Kb plus ladder (Thermofisher).

5.2. Caracterização das linhagens que expressam shRNA

5.2.1. Caracterização por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

Após a produção dos vetores lentivirais e transdução da linhgem 293T, as linhagens foram selecionadas a partir do tratamento com o antibiótico apropriado, quando possível, e então caracterizadas. Pela Figura 17 pode-se notar que as linhagens celulares obtidas, 293T anti-hexon, anti-IVa2 e anti-pol, expressam os genes *reporters* dTomato e eGFP, correspondente a cada vetor construído. Nota-se também que as células expressam as proteínas fluorescentes com maior ou menor intensidade, possivelmente decorrente de diferenças no numero de cópias dos vetores lentivirais inseridos no genoma de cada célula.

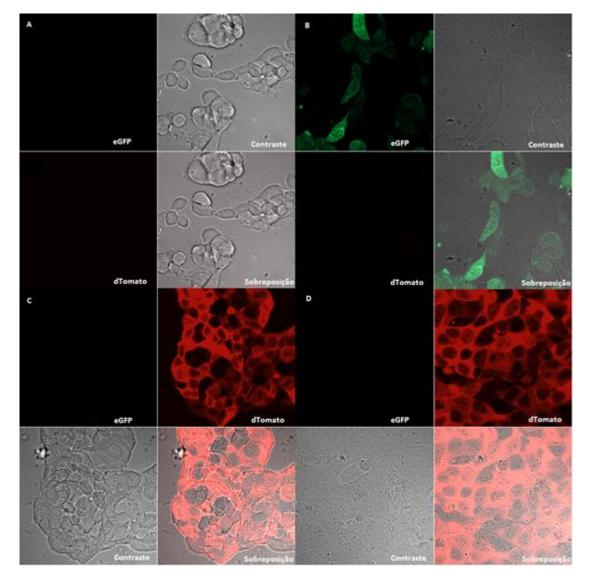


Figura 17 Análise das células por microscopia confocal. As. Células foram levadas a fresco para o microscópio confocal. Cada linhagem expressa seu respectivo gene *reporter*. (A) 293T., onde espera-se ausência de fluorescência verde e vermelha (B) 293T anti-hexon, onde espera-se apenas fluorescência verde para eGFP. (C) 293T anti-IVa2, onde espera-se apenas fluorescência vermelha para dTomato. (D) 293T anti-pol, onde espera-se apenas fluorescência vermelha para dTomato.

As linhagens também foram caracterizadas quanto à expressão do gene repórter por citometria de fluxo, como representado na Figura 18. A análise por citometria de fluxo mostra a intensidade da fluorescência que as linhagens criadas expressam. O canal FL1 indica a fluorescência no comprimento de onda próximo ao eGFP e o canal FL2 indica a fluorescência no comprimento de onda próximo ao dTomato. Os gráficos da análise da citometria de fluxo comparam a fluorescência FL1 x FL2 formando quatro quadrantes diferentes. Onde UL (*upper left*) denota as células exclusivamente dTomato

positivas, LL (*lower left*) as células negativas para as duas proteínas fluorescentes, LR (*lower right*) as células exclusivamente eGFP positivas e UR (*upper right*) as células positivas para as duas proteínas fluorescentes. Na Figura 18, todas as linhagens criadas contêm mais de 92% das células em seu respectivo quadrante.

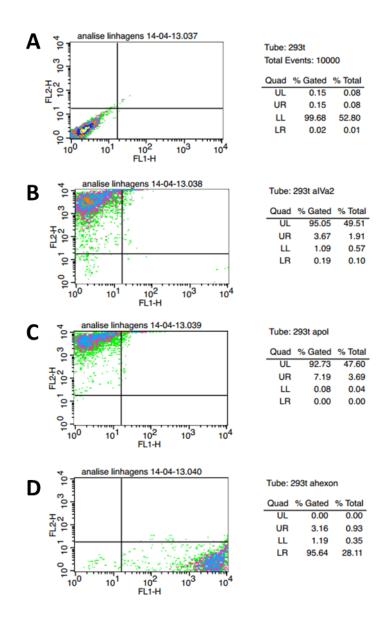


Figura 18 Perfil da intensidade de fluorescência nas linhagens selecionadas. (A) 293T, (B) 293T anti-Iva2 e (C) 293T anti-pol e (D) 293T anti-hexon. LL representa o quadrante no qual estão as células negativas, UL representa o quadrante no qual se encontram as células positivas para dTomato e LR representa o quadrante no qual se encontram as células positivas para eGFP.

5.2.2. Caracterização funcional por RT-qPCR

Para verificar e funcionalidade do shRNA em inibir o mRNA para o determinado gene adenoviral, foi realizado o RT-qPCR. As linhagens que contem o shRNA foram infectadas com Ad-LacZ onde em 24, 26 e 60 horas o RNA foi extraído e a expressão relativa de mRNA viral foi avaliada para cada alvo como mostrado na Figura 19.

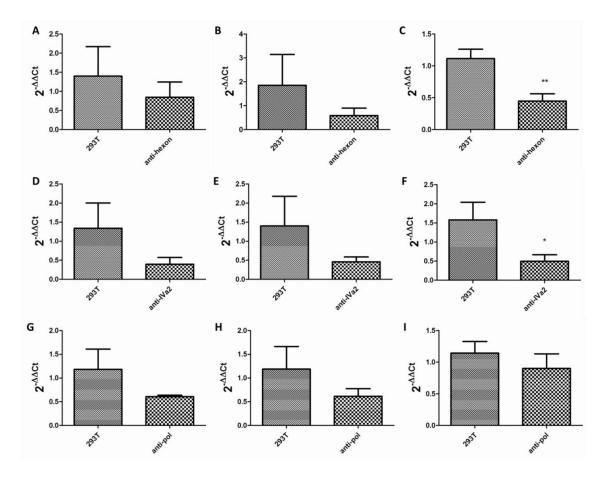


Figura 19 Expressão relativa de mRNA viral nas linhagens que contem shRNA. Expressão relativa do hexon em 24 (A), 36 (B) e 60 horas (C). Expressão relativa do IVa2 em 24 (D), 36 (E) e 60 horas (F). Expressão relativa do pol em 24 (G), 36 (H), e 60 horas (I). Células foram infectadas com MOI 1 e coletadas com seus respectivos horários de coleta. O RNA total foi extraído e processado para RT-qPCR. O método de análise foi 2-DDCt e os dados estão apresentados em comparação à célula 293T transduzida com Ad-LacZ. Os dados representam a média e o desvio padrão de cinco experimentos independentes. *p<0.05.**p<0,01. Teste T- student foi aplicado.

Pode-se perceber que houve a diminuição da quantidade de mRNA em comparação à 293T em todos os tempos para todas as linhagens. Entretanto essa

diferença foi estatisticamente significante apenas paras as linhagens anti-hexon e anti-IVa2 no tempo de 60 horas. Dessa forma foi verificado o *knockdown* do mRNA viral nas linhagens que contém shRNA.

5.2.3. Caracterização funcional por ensaio de cinética de produção de Ad-LacZ

As 293T que expressam shRNA foram infectadas com Ad-LacZ, com MOI 1 e a cada 12 horas recolheu-se o vírus produzido, em forma de lisado celular, a partir dessa infecção. O lisado que passou por processo de congelamento/descongelamento foi usado para transduzir a linhagem HT1080, onde o Ad não consegue se replicar, e houve fixação e coloração após 48 horas de transdução, conforme mostra a Figura 20.

A partir da Figura 20 percebe-se que a partir de 36 horas de coleta há diferença na quantidade de células transduzidas pelos lisados, entre a 293T e a 293T anti-hexon. Essa diferença se acentua e atinge o seu ápice em 60 horas de coleta e diminui singelamente em 72 horas. A princípio a linhagem anti-hexon se mostrou mais promissora na diminuição da produção de Ad.

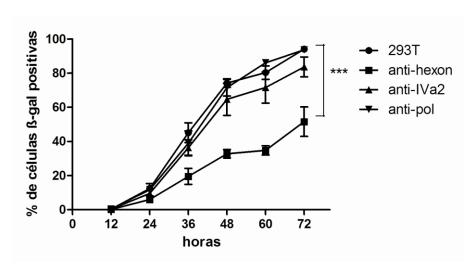


Figura 20 Ensaio de cinética Porcentagem de células HT1080 b-gal positivas. $5x10^5$ células foram infectadas com Ad-LacZ MOI 1 e coletadas 12 a 72 horas. O lisado de cada linhagem foi usado para transduzir 10^5 células HT1080. Os dados apresentados representam a média e o desvio padrão das células β -gal positivas. ***p<0.001. Two-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni foram aplicados.

5.3. Caracterização da linhagem 293T anti-hexon após cell sorting

5.3.1. Caracterização por citometria de fluxo

A linhagem 293T anti-hexon, a qual não é possível selecionar com Neomicina devido resistência pre-existente, foi submetida ao *cell sorting* e também caracterizada quanto a expressão do gene *reporter*, sendo chamada de 293T anti-hexon PS (póssorting). Em sua caracterização é possível observar que a população se concentrou no que diz respeito à intensidade da fluorescência, mas praticamente não alterou a porcentagem de células transduzidas (Figura 21).

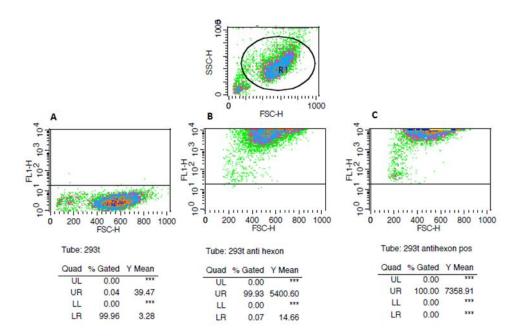


Figura 21 Perfil da intensidade de fluorescência nas linhagens selecionadas. (A) 293T, (B) 293T anti-hexon e (C) 293T anti-hexon PS. LR representa o quadrante no qual estão as células negativas e UR representa o quadrante no qual se encontram as células positivas para eGFP.

5.3.2. Caracterização funcional por RT-qPCR

Assim como as outras linhagens a 293T anti-hexon PS também foi infectada com Ad-LacZ e teve seu RNA coletado nos tempos de 24, 36 e 60 horas conforme indicado na Figura 22.

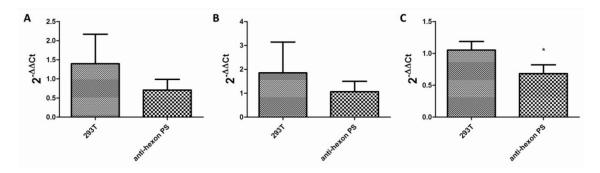


Figura 22 Expressão relativa de mRNA para o gene hexon na linhagem 293T anti-hexon PS em 24 (A), 36 (B) e 60 horas (C). Células foram infectadas na MOI 1 e coletadas com seus respectivos horários de coleta. O RNA total foi extraído e processado para RT-qPCR. O método de análise foi 2-DDCt e os dados estão apresentados em comparação à célula 293T transduzida com Ad-LacZ. Os dados representam a média e o desvio padrão de 5 experimentos independentes. *p<0.05. Teste T- student foi aplicado.

Pode-se perceber que semelhantemente à linhagem 293T anti-hexon, houve a diminuição dos níveis de mRNA em todos os tempos e essa diferença também foi estatisticamente significativa somente em 60 horas.

5.3.3. Caracterização funcional pela cinética de produção de Ad-LacZ

A linhagem 293T anti-hexon PS também foi infectada com Ad-LacZ na MOI 1 e teve seu lisado coletado a cada 12 horas. Posteriormente o lisado foi utilizado para transduzir células HT1080 que foram fixadas e coradas com X-gal 48 horas após a transdução. Conforme mostra a Figura 23.

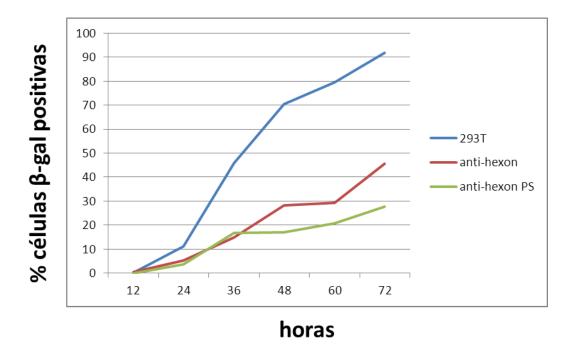


Figura 23 Ensaio de cinética da infecção por Ad-LacZ. 5x10^5 células foram infectadas com Ad-LacZ MOI 1 e coletadas 12 a 72 horas. O lisado de cada linhagem foi usado para transduzir 10⁵ células HT1080.

Pela Figura 23 observa-se que o desempenho da 293T anti-hexon PS em inibir a infecção por Ad-LacZ mostrou-se aparentemente superior à linhagem parental 293T anti-hexon.

5.4. Caracterização dos clones selecionados a partir da linhagem 293T anti-hexon PS

5.4.1. Caracterização por citometria de fluxo

Após a verificação da funcionalidade da linhagem 293T anti-hexon PS, a mesma foi submetida a subclonagem celular para obter uma maior eficiência em inibição da replicação do Ad, na qual as células foram contadas e diluídas de tal forma que quando plaqueadas em placa de 96 poços restasse apenas uma célula por poço. Os clones obtidos foram expandidos e também caracterizados assim como as demais linhagens. A caracterização quanto à expressão do gene repórter é indicada na Figura 24.

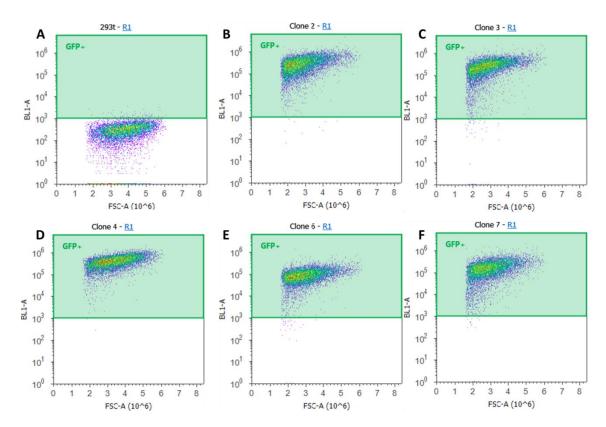


Figura 24 Caracterização dos clones obtidos a partir da linhagem 293T anti-hexon PS.(A) 293T (B) clone 2 (C) clone 3 (D) clone 4 (E) clone 6 (F) clone 7. O quadrante superior na cor verde corresponde às células eGFP positivas.

Pode-se notar pela Figura 24 que todos os clones expressam o gene repórter. Todos os clones apresentaram a expressão de eGFP em mais de 99% das células. A porcentagem das células eGFP positivas pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 Porcentagem das células eGFP+ nos clones dervidados da linhagem 293T antihexon PS

Linhagem	Porcentagem de células eGFP+ (%)
clone 2	99,86
clone 3	99,52
clone 4	99,98
clone 6	99,68
clone 7	99,82

5.4.2. Caracterização funcional por RT-qPCR

Na tentativa de encontrar um melhor clone os clones foram submetidos à RTqPCR após ensaio de infecção com Ad-LacZ na MOI 1. Os tempos de coleta foram 36 e 60 horas conforme indicado na Figura 25.

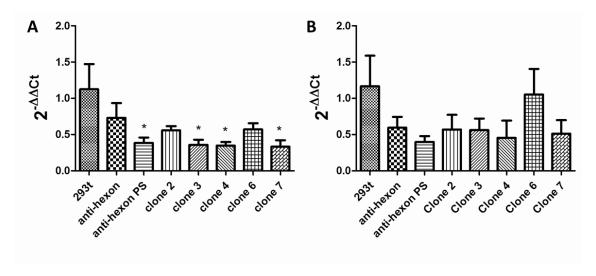


Figura 25 RT-qPCR para gene hexon dos clones em 36 (A) e 60 horas (B). Células foram infectadas na MOI 1 e coletadas no horário indicado. O RNA total foi extraído e processado para RT-qPCR. O método de análise foi 2-DDCt e os dados estão apresentados em comparação à célula 293T transduzida com Ad-LacZ. Os dados representam a média e o desvio padrão de quatro experimentos independentes. *p<0,05. One-way ANOVA seguido de Tukey's Multiple comparisont pós-teste foi aplicado.

Nota-se na Figura 25 que houve diferença na expressão do mRNA para o gene hexon na maioria dos clones e essa diferença foi estatisticamente significativa apenas para o tempo de 36 horas.

5.4.3. Caracterização funcional por ensaio de imunofluorescência

Para verificar a inibição em nível de proteína, foi feito um ensaio de imunofluorescência para detectar a proteína hexon nos clones celulares que foram infectados com Ad-LacZ na MOI 1, as células foram fixadas em 36 horas conforme mostra a Figura 26. Nota-se que os clones 2 e 7 apresentaram menor quantidade de células hexon positivas.

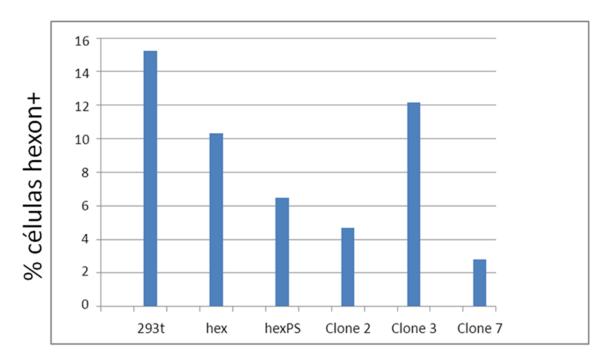


Figura 26 Imunofluorescência para hexon. 1,25 x 105 células foram plaqueadas e infectadas com Ad-LacZ na MOI 1. Após 36 horas as células foram fixadas e incubadas com anticorpos para detecção da proteína hexon.

5.4.4. Caracterização funcional através da produção de Ad-LacZ e transdução do lisado em HT1080

Para provar a inibição da replicação de Ad de modo funcional, os clones foram infectados com Ad-LacZ na MOI 1, tendo seu lisado coletado em 60 horas. Após sessão de congelamento e descongelamento esse lisado foi utilizado para transduzir células HT1080, conforme indicado na Figura 27.

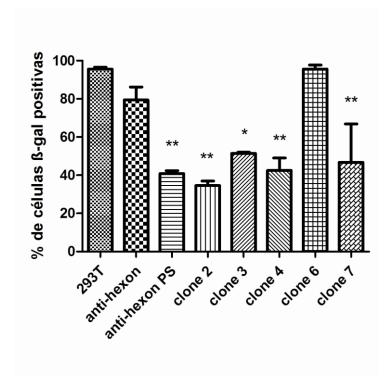


Figura 27 Avaliação funcional dos clones através da transdução de células HT1080 com os lisados. Foram plaqueadas $5x10^5$ células, posteriormente infectadas com Ad-LacZ MOI 1 e coletadas em 60 horas. O lisado de cada linhagem foi usado para transduzir 10^5 células HT1080. *p<0,05. **p<0.01. One-way ANOVA seguido de Tukey's Multi comparisont pós-teste foram aplicados.

Conforme demonstrado na Figura 27, a maioria dos clones responderam de forma esperada para a inibição da replicação por Ad-LacZ, sendo o clone 2 o que foi mais efetivo. Sendo o escolhido para os ensaios posteriores.

5.5. Avaliação da eficiência de inibição através de microscopia eletrônica

A ação do shRNA anti-hexon deve inibir a formação de novas partículas adenovirais. Entretanto não se sabe se essa interferência se dá apenas no número absoluto de partículas ou se há formação de partículas malformadas ou defectivas,. Com a finalidade de obter evidências visuais da produção de Adenovírus, a linhagem 293T e o clone 2 foram infectados com Ad-LacZ na MOI 1 e após 36 horas as células foram fixadas para posterior análise conforme indicado nas Figuras 28 e 29.

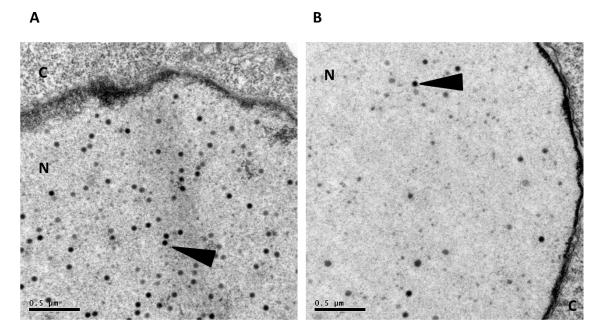


Figura 28 Perfil das células das linhagens infectadas com Ad-LacZ. 5 x 10⁵ células foram plaqueadas e infectadas com Ad-LacZ MOI 1 após 24 horas. As células foram fixadas em 36 horas após infecção. 293T (A) e clone 2 (B). A letra C indica citoplasma e N núcleo. As setas pretas indicam as partículas virais.

Na Figura 28 há a exemplificação de um núcleo de 293T versus clone 2 onde é visualmente notória a diferença entre as duas linhagens. Pela visão destas fotos, podemos afirmar, qualitativamente, que encontra menos partículas no clone 2 do que na célula parental, 293T, mas que o formato das partículas não apresenta diferenças óbvias. A quantificação dessa diferença está demonstrada na Figura 29, mostrando que houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens.

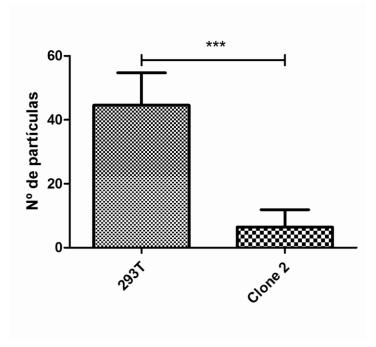


Figura 29 Quantificação das partículas adenovirais analisadas por microscopia eletrônica. As células foram transduzidas conforme descrito na Figura 26 e 5 campos de 10 células de cada grupo foram contadas. Os dados representam a média e desvio padrão do número de partículas encontrado por núcleo em dois experimentos independentes. *p<0,05. Teste T student foi aplicado.

5.6. Avaliação do título viral na produção em larga escala

As linhagens 293T e clone 2 foram utilizadas para produção de partículas adenovirais em larga escala e o vírus foi purificado por gradiente de iodixanol. O título viral da produção em 293T foi de 1,9 x10¹¹ IVP/mL (*infectious virus particles*/mL) e o da produção no clone 2 foi 1,4 x 10¹⁰ IVP/mL, representado pela Figura 30.

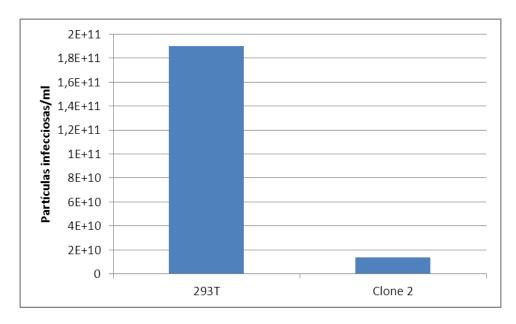


Figura 30 Título infeccioso das produções de Ad-LacZ na 293T e clone 2. As células foram plaqueadas em 25 placas de 150 mm, infectadas com Ad-LacZ na MOI 1, incubadas por 60 horas e o vírus produzido foi purificado por gradiente de iodixanol. Após remoção salina por cromatografia, o vírus purificado foi submetido a titulação biológica.

6. Discussão

A tecnologia do RNAi tem sido empregada amplamente para inibir replicação viral. Com relação a Adenovírus essa tecnologia tem sido utilizada tendo como alvo diferentes genes virais. No presente trabalho utilizamos como alvo três genes diferentes, que correspondem a proteínas das três fases distintas da replicação viral, *early* para Polimerase viral, *intermediate* para IVa2 e *late* para hexon. As sequências utilizadas foram desenhados em base dos trabalhos Kneidgner 2012 (pol) e Eckstein 2010 (IVa2 e hexon) (40, 41).

Após a construção dos vetores, sublinhagens derivadas do 293T foram estabelecidas e caracterizadas, por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, antes de iniciar os testes para comprovar o *knockdown* das expressão das proteínas virais e mensurar seu impacto na replicação de Ad. Dentro do nosso protocolo de produção de vetor adenoviral as células são coletadas entre 48 e 72 horas. Nesse período uma maneira de otimizar o título nas produções é visualizar o efeito citopático característico nas placas, que no caso do Adenovírus trata-se da presença de células flutuando na placa e se descolando agregadamente formando "cachos de uva", e coletar o vírus neste momento. Por esse motivo a MOI 1 foi utilizada nos nossos ensaios, pois ela mimetizaria em pequena escala o que aconteceria numa produção rotineira do laboratório, tornando mais factível a realização dos ensaios. É importante perceber que todas as linhagens apresentaram efeito citopático nos ensaios de infecção.

Para mostrar diminuição do nível de mRNA viral foram feitas coletas em tempos diferentes, já que cada alvo atua de forma singular no ciclo de replicação viral, possivelmente haveriam cinéticas distintas de atuação. Percebemos que durante os períodos de 24, 36 e 60 horas (Figura 19) há inibição dos níveis de mRNA viral de cada

alvo para o seu shRNA em relação à 293T. Entretanto apenas em 60 horas houve diferença estatisticamente significante para os genes hexon e IVa2. Em 2012 Kneidigner e colaboradores mostraram a sequência do siRNA para pol sendo a mais promissora em inibir a replicação por Ad (41). Essa mesma sequência foi utilizada para construir o vetor shRNA. A sequência original era composta por 25 nucleotídeos. Porém, para o desenho do shRNA seriam necessários retirar 4 bases. O mesmo não foi necessário para hexon e IVa2, cujas sequências já haviam sido desenhadas com 21 nt. A ausência da inibição para pol poderia ser explicada talvez para o fato de que retirar nucleotídeos pode interferir na efetividade da sequência. Para que esse problema pudesse ser minimizado foram retirados os quatro últimos nucleotídeos da sequência sense, já que a Dicer elimina as últimas bases da sequência durante seu processamento (76). Esse comportamento da variação da inibição dos níveis de mRNA poderia ser um viés ao passo que o knockdown não ocorreria de forma eficiente e portanto não bloqueando a replicação do Ad. Entretanto deve-se ressaltar que há duas maneiras de atuação do RNAi, uma onde o bloqueio da tradução leva à degradação do mRNA e outra onde há bloqueio na tradução devido ao impedimento físico de ligação da sequência interferente no mRNA, sem degradação (29). É possível que em nosso sistema ocorra mais da segunda forma de bloqueio do mRNA.

No presente trabalho, não há ensaios que combinam mais de um shRNA na mesma célula para bloquear o Ad. Na literatura efeito da combinação de vários siRNAs para alvos diferentes sugere que não há sinergismo para a combinação de siRNAs para inibir a replicação de Ad. Em 2010 Eckstein e colaboradores não viram efeitos sinérgicos na combinação dos siRNAs para E1A, IVa2 e hexon (38). Já em 2012, Kneidigner e colaboradores também não encontraram efeitos sinérgicos na combinação de mais de um siRNA (39). Já em 2013 utilizando miRNA artificiais pesquisadores mostraram que

houve efeito aditivo apenas na combinação de siRNA com cidofovir (77) e em 2015 Pozzuto e colaboradores concluíram que a combinação de siRNAs não aumenta a supressão da replicação viral comparada com sua aplicação individual (78). No genoma adenoviral, a sobreposição de genes implica que um único shRNA poderia ter efeito na tradução de varias proteínas. Por este motivo, os alvos e o desenho do shRNA foram escolhidos para minimizar esta possibilidade. Apenas os genes IVa2 e pol estão próximos entre si e um descuido no desenho do shRNA de um poderia gerar um produto que interfere na expressão do outro gene. Entretanto, conforme mostra a Figura 9, as sequências dos shRNAs não se pareiam em nenhum outro gene adenoviral.

O primeiro ensaio biológico que sugere que há diminuição na produção das partículas Ad envolveu a infecção das linhagens que expressam shRNA e posterior coleta por sessão de congelamento/descongelamento para liberação das partículas virais. Dessa forma o lisado feito a partir das linhagens com shRNA eficaz conteria menos partículas do que o lisado obtido através da 293T. Esses lisados foram testados transduzindo-se células HT1080, na qual o Ad não consegue se replicar. Então em 48h após a transdução pelos lisados as células HT1080 foram fixadas e coradas com X-gal, onde as células transduzidas se tornaram positivas e foi possível quantificar a porcentagem de células positivas para β-galactosidase. Além disso, acompanhar a cinética de inibição de 12 a 72 horas foi crucial para o delineamento de outros experimentos.

Conforme mostrado na Figura 20 a linhagem anti-hexon se mostrou mais promissora na inibição da replicação do Ad-LacZ, onde a partir de 36h já é possível notar diferença estatisticamente significativa e a maior diferença entre os grupos se dá no período de 60 horas. A linhagem anti-IVa2 mostrou uma singela inibição, porém

estatisticamente não significante. Essa observação nos levou a nortear e prosseguir com os demais experimentos dando ênfase no alvo hexon.

A linhagem anti-hexon, mais promissora no ensaio biológico de cinética da replicação apresentava um viés. A construção Lego anti-hexon, possui como gene de seleção o Neo^R (*neomicin resistance gene*) e a 293T é resistente a esse antibiótico (23), não sendo possível selecioná-la. Apesar de sempre apresentar expressão robusta do gene *reporter*, a linhagem foi submetida a *cell sorting* para garantir que houvesse apenas células transduzidas. Conforme mostra a Figura 21, a linhagem 293T anti-hexon PS apresenta uma população mais homogênea que a 293T anti-hexon, mas o número de células positivas permaneceu equivalente. Semelhantemente a linhagem 293T anti-hexon, os níveis de mRNA na linhagem 293T anti-hexon PS foram inibidos e estas diferenças se tornaram estatisticamente significantes na coleta realizada 60 horas após a transdução. Com relação ao ensaio de cinética, a linhagem 293T anti-hexon PS obteve eficácia ligeiramente melhor que a linhagem 293T anti-hexon.

Quando transduzidas por lentivírus, é possível que algumas células recebam mais cópias do vetor e outras menos, de forma aleatória. Como consequência, as linhagens shRNA são compostas por um *pool* de células, nas quais há células que potencialmente expressam mais e células que expressam menos shRNA. Essa diferença na expressão pode representar um viés experimental e implica que uma subpopulação poderia existir que apresenta um desempenho melhor do que visto no *pool*. Por este motivo a linhagem anti-hexon PS, além da seleção por *cell sorting*, passou por uma seleção clonal, na qual os clones obtidos a partir de uma única célula se comportariam de forma mais homogênea perante os ensaios. Da mesma forma que as linhagens, os clones obtidos a partir da linhagem 293T anti-hexon PS foram caracterizados. Dentre os clones analisados foi levado em consideração o clone que se saiu melhor no ensaio biológico

de inibição no tempo de 60 horas, que foi o clone 2. Diversos clones obtiveram eficácia na inibição da replicação via ensaio de atividade de β-galactosidase. Interessantemente clone 6 não foi capaz de inibir a replicação, mesmo sendo derivado da linhagem que obteve o maior efeito sobre o Ad. Pela sua inibição promissora, o clone 2 foi escolhido para ensaios posteriores.

Para corroborar os resultados encontrados nos testes de β-gal, a 293T e o clone 2 foram infectados e fixadas após 36 horas, quando foram submetidos a microscopia eletrônica de transmissão na qual foi possível visualizar as partículas sendo formadas no núcleo (Figuras 28 e 29). A quantificação dessas partículas mostrou que havia um número de partículas significantemente menor no núcleo das células do clone 2. É importante ressaltar que para a análise foram contadas apenas células positivas para Ad, ou seja, onde foi possível visualizar partículas sendo formadas. Essa forma de análise de certa forma subjuga os resultados obtidos para o clone 2, já que não foi levado em consideração as células negativas que contribuiriam para a porcentagem de partículas por célula. Entretanto, nesse ponto não é possível afirmar que as células negativas na microscopia eletrônica são negativas porque a inibição foi eficaz ou porque elas simplesmente não foram infectadas.

Por fim a linhagem 293T e clone 2 foram utilizadas na produção de Ad em larga escala. Todos os passos foram realizados em paralelo, lado a lado, para as duas linhagens, assim minimizando diferenças experimentais. Essa produção permitiu avaliar o rendimento e a titulação mostrou uma redução de 90% de partículas infeciosas no clone 2 em comparação à 293T. Em trabalhos anteriores (41, 77) também foi avaliado a redução no título de partículas infecciosas, porém em contextos diferentes. Kneidgner e colaboradores obtiveram uma redução de 94,9% das partículas infecciosas utilizando um siRNA contra hexon após 48 horas de infecção em células A549 (41). Contudo o

ensaio de produção em larga escala foi executado apenas uma vez e necessita dados complementares.

É possível que haja diferença no crescimento entre as linhagens e, portanto, talvez seja um viés para o trabalho. Para tanto um ensaio de curva de crescimento está atualmente em andamento, para inferir que a inibição da replicação se deve ao fato da célula.

O knockdown da proteína viral hexon por meio de shRNA representa um avanço na inibição da replicação do Ad. Sugerindo que essa tecnologia pode ser útil para um sistema de produção de AAV. Imaginando que uma produção em larga escala, reduzir em 90% a quantidade de vírus *helper* seria uma estratégia interessante. Além disso, sendo o Ad um agente etiológico de diversas infecções, o uso do shRNA para inibição da sua replicação com fins terapêuticos abrange mais uma utilidade, juntamente com combinação de drogas antivirais, como tem sido mostrado recentemente (78).

7. Conclusão

Com o presente trabalho foi possível criar linhagens celulares que expressam constitutivamente shRNA direcionado para transcritos adenovirais hexon, IVa2 e pol. Foi possível inibir a replicação viral através do *knockdown* da proteína hexon, e que o *knockdown* mediado por RNAi foi capaz de reduzir em 92% a quantidade de partículas em uma produção em larga escala. Portanto a prova de princípio foi estabelecida, o que permite estudos posteriores para ser utilizada como estratégia na produção de AAV.

8. Referências

- 1. Lenaerts L, De Clercq E, Naesens L. Clinical features and treatment of adenovirus infections. Rev Med Virol. 2008;18(6):357-74.
- 2. ROWE WP, HUEBNER RJ, GILMORE LK, PARROTT RH, WARD TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med. 1953;84(3):570-3.
- 3. Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. J Gen Virol. 2000;81(Pt 11):2573-604.
- 4. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2014;27(3):441-62.
- 5. San Martín C. Latest insights on adenovirus structure and assembly. Viruses. 2012;4(5):847-77.
- 6. Colby WW, Shenk T. Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. J Virol. 1981;39(3):977-80.
- 7. Liu GQ, Babiss LE, Volkert FC, Young CS, Ginsberg HS. A thermolabile mutant of adenovirus 5 resulting from a substitution mutation in the protein VIII gene. J Virol. 1985;53(3):920-5.
- 8. San Martín C, Burnett RM. Structural studies on adenoviruses. Curr Top Microbiol Immunol. 2003;272:57-94.
- 9. Hoeben RC, Uil TG. Adenovirus DNA replication. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(3):a013003.
- 10. Webster A, Russell S, Talbot P, Russell WC, Kemp GD. Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. J Gen Virol. 1989;70 (Pt 12):3225-34.
- 11. McGrath WJ, Baniecki ML, Li C, McWhirter SM, Brown MT, Toledo DL, et al. Human adenovirus proteinase: DNA binding and stimulation of proteinase activity by DNA. Biochemistry. 2001;40(44):13237-45.
- 12. Zhang W, Imperiale MJ. Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. J Virol. 2003;77(6):3586-94.
- 13. Gustin KE, Lutz P, Imperiale MJ. Interaction of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein with the IVa2 gene product during infection. J Virol. 1996;70(9):6463-7.
- 14. Zhang W, Low JA, Christensen JB, Imperiale MJ. Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. J Virol. 2001;75(21):10446-54.
- 15. Tyler RE, Ewing SG, Imperiale MJ. Formation of a multiple protein complex on the adenovirus packaging sequence by the IVa2 protein. J Virol. 2007;81(7):3447-54.
- 16. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. Genes Dev. 1996;10(4):461-77.
- 17. Robinson CM, Rajaiya J, Zhou X, Singh G, Dyer DW, Chodosh J. The E3 CR1-gamma gene in human adenoviruses associated with epidemic keratoconjunctivitis. Virus Res. 2011;160(1-2):120-7.
- 18. Tollefson AE, Scaria A, Hermiston TW, Ryerse JS, Wold LJ, Wold WS. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. J Virol. 1996;70(4):2296-306.
- 19. Tribouley C, Lutz P, Staub A, Kedinger C. The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. J Virol. 1994;68(7):4450-7.
- 20. Backström E, Kaufmann KB, Lan X, Akusjärvi G. Adenovirus L4-22K stimulates major late transcription by a mechanism requiring the intragenic late-specific transcription factor-binding site. Virus Res. 2010;151(2):220-8.
- 21. Biasiotto R, Akusjärvi G. Regulation of human adenovirus alternative RNA splicing by the adenoviral L4-33K and L4-22K proteins. Int J Mol Sci. 2015;16(2):2893-912.
- 22. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 an update. J Gene Med. 2013;15(2):65-77.

- 23. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. Mol Cell Biol. 1987;7(1):379-87.
- 24. Roy-Chowdhury J, Horwitz MS. Evolution of adenoviruses as gene therapy vectors. Mol Ther. 2002;5(4):340-4.
- 25. Peng HH, Wu S, Davis JJ, Wang L, Roth JA, Marini FC, et al. A rapid and efficient method for purification of recombinant adenovirus with arginine-glycine-aspartic acid-modified fibers. Anal Biochem. 2006;354(1):140-7.
- 26. Appaiahgari MB, Vrati S. Adenoviruses as gene/vaccine delivery vectors: promises and pitfalls. Expert Opin Biol Ther. 2015;15(3):337-51.
- 27. Small JC, Ertl HC. Viruses from pathogens to vaccine carriers. Curr Opin Virol. 2011;1(4):241-5.
- 28. Vetrini F, Ng P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives. Viruses. 2010;2(9):1886-917.
- 29. Liao Y, Tang L. Inducible RNAi system and its application in novel therapeutics. Crit Rev Biotechnol. 2014:9.
- 30. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998;391(6669):806-11.
- 31. Azimzadeh SJ, Azadian E, Masoudi-Nejad A. Human RNAi pathway: crosstalk with organelles and cells. Funct Integr Genomics. 2014;14:16.
- 32. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. RNA. 2010;16(3):495-505.
- 33. Wada S, Obika S, Shibata MA, Yamamoto T, Nakatani M, Yamaoka T, et al. Development of a 2',4'-BNA/LNA-based siRNA for Dyslipidemia and Assessment of the Effects of Its Chemical Modifications In Vivo. Mol Ther Nucleic Acids. 2012;1:e45.
- 34. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. Nucleic Acids Res. 2012;40(10):4626-40.
- 35. Singer O, Verma IM. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. Curr Gene Ther. 2008;8(6):483-8.
- 36. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(2-3):75-86.
- 37. Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Shank PR, Ramratnam B. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. Nucleic Acids Res. 2003;31(17):5033-8.
- 38. Echavarría M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):704-15.
- 39. Chung YS, Kim MK, Lee WJ, Kang C. Silencing E1A mRNA by RNA interference inhibits adenovirus replication. Arch Virol. 2007;152(7):1305-14.
- 40. Eckstein A, Grössl T, Geisler A, Wang X, Pinkert S, Pozzuto T, et al. Inhibition of adenovirus infections by siRNA-mediated silencing of early and late adenoviral gene functions. Antiviral Res. 2010;88(1):86-94.
- 41. Kneidinger D, Ibrišimović M, Lion T, Klein R. Inhibition of adenovirus multiplication by short interfering RNAs directly or indirectly targeting the viral DNA replication machinery. Antiviral Res. 2012;94(3):195-207.
- 42. ATCHISON RW, CASTO BC, HAMMON WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. Science. 1965;149(3685):754-6.
- 43. Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, et al. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(16):10405-10.
- 44. Koczot FJ, Carter BJ, Garon CF, Rose JA. Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973;70(1):215-9.
- 45. Pereira DJ, McCarty DM, Muzyczka N. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. J Virol. 1997;71(2):1079-88.

- 46. Chejanovsky N, Carter BJ. Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. Virology. 1989;173(1):120-8.
- 47. Drouin LM, Agbandje-McKenna M. Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. Future Virol. 2013;8(12):1183-99.
- 48. Palomeque J, Chemaly ER, Colosi P, Wellman JA, Zhou S, Del Monte F, et al. Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. Gene Ther. 2007;14(13):989-97.
- 49. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. J Virol. 1998;72(2):1438-45.
- 50. Asokan A, Hamra JB, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. J Virol. 2006;80(18):8961-9.
- 51. Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. J Virol. 2000;74(19):9184-96.
- 52. Kotin RM, Menninger JC, Ward DC, Berns KI. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. Genomics. 1991;10(3):831-4.
- 53. Strauss BE. Vetores para terapia gênica: vírus, plasmídeo e outros. In: Morales M, editor. Terapias Avançadas. Rio de Janeiro: Atheneu; 2007. p. 121-47.
- 54. Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(20):6466-70.
- 55. Tratschin JD, West MH, Sandbank T, Carter BJ. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. Mol Cell Biol. 1984;4(10):2072-81.
- 56. Gonçalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. Virol J. 2005;2:43.
- 57. Durocher Y, Pham PL, St-Laurent G, Jacob D, Cass B, Chahal P, et al. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells. J Virol Methods. 2007;144(1-2):32-40.
- 58. Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. Hum Gene Ther. 1998;9(18):2745-60.
- 59. Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. Gene Ther. 1998;5(7):938-45.
- 60. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J Virol. 1998;72(3):2224-32.
- 61. Ferrari FK, Xiao X, McCarty D, Samulski RJ. New developments in the generation of Ad-free, high-titer rAAV gene therapy vectors. Nat Med. 1997;3(11):1295-7.
- 62. Salvetti A, Orève S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, Champion-Arnaud P, et al. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. Hum Gene Ther. 1998;9(5):695-706.
- 63. Liu YL, Wagner K, Robinson N, Sabatino D, Margaritis P, Xiao W, et al. Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles. Biotechniques. 2003;34(1):184-9.
- 64. Blouin V, Brument N, Toublanc E, Raimbaud I, Moullier P, Salvetti A. Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process. J Gene Med. 2004;6 Suppl 1:S223-8.
- 65. Yang Q, Chen F, Trempe JP. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. J Virol. 1994;68(8):4847-56.
- 66. Schmidt M, Afione S, Kotin RM. Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. J Virol. 2000;74(20):9441-50.

- 67. Huang X, Hartley AV, Yin Y, Herskowitz JH, Lah JJ, Ressler KJ. AAV2 production with optimized N/P ratio and PEI-mediated transfection results in low toxicity and high titer for in vitro and in vivo applications. J Virol Methods. 2013;193(2):270-7.
- 68. Conway JE, Rhys CM, Zolotukhin I, Zolotukhin S, Muzyczka N, Hayward GS, et al. High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type I vector expressing AAV-2 Rep and Cap. Gene Ther. 1999;6(6):986-93.
- 69. Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. Hum Gene Ther. 2002;13(16):1935-43.
- 70. Zhang HG, Wang YM, Xie JF, Liang X, Hsu HC, Zhang X, et al. Recombinant adenovirus expressing adeno-associated virus cap and rep proteins supports production of high-titer recombinant adeno-associated virus. Gene Ther. 2001;8(9):704-12.
- 71. Sun BD, Chen YT, Bird A, Amalfitano A, Koeberl DD. Long-term correction of glycogen storage disease type II with a hybrid Ad-AAV vector. Mol Ther. 2003;7(2):193-201.
- 72. Monahan PE, Samulski RJ, Tazelaar J, Xiao X, Nichols TC, Bellinger DA, et al. Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. Gene Ther. 1998;5(1):40-9.
- 73. Farson D, Harding TC, Tao L, Liu J, Powell S, Vimal V, et al. Development and characterization of a cell line for large-scale, serum-free production of recombinant adeno-associated viral vectors. J Gene Med. 2004;6(12):1369-81.
- 74. Sambrook J, Fritcsh E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratoy Press 1989.
- 75. Naviaux RK, Costanzi E, Haas M, Verma IM. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. J Virol. 1996;70(8):5701-5.
- 76. Collingwood MA, Rose SD, Huang L, Hillier C, Amarzguioui M, Wiiger MT, et al. Chemical modification patterns compatible with high potency dicer-substrate small interfering RNAs. Oligonucleotides. 2008;18(2):187-200.
- 77. Ibrišimović M, Kneidinger D, Lion T, Klein R. An adenoviral vector-based expression and delivery system for the inhibition of wild-type adenovirus replication by artificial microRNAs. Antiviral Res. 2013;97(1):10-23.
- 78. Pozzuto T, Röger C, Kurreck J, Fechner H. Enhanced suppression of adenovirus replication by triple combination of anti-adenoviral siRNAs, soluble adenovirus receptor trap sCAR-Fc and cidofovir. Antiviral Res. 2015;120:72-8.

Anexo I – Comprovante de aprovação pelo Comitê de Ética



APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/05/2012, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 104/12 intitulado: "UTILIZAÇÃO DE SHRNA ANTI-HEXON E ANTI-IVA2 DURANTE A PRODUÇÃO DE VÍRUS ADENO-ASSOCIADO COMO ESTRATÉGIA DE ELIMINAR ADENOVÍRUS HELPER: PROVA DE PRINCÍPIO" apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA E ONCOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Bryan Eric Strauss

Pesquisador (a) Executante: Marlous Viniciusu Gomes Lana

CEP-FMUSP, 10 de Maio de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa

Elliemum.

Anexo II – Capítulo de livro

Citação:

LANA, M.V.G., MEDRANO, R.F.V., SAITO, R., CHAMMAS, R. Fundamentos em Oncologia Molecular para graduação. Atheneu. 2015 (em publicação)