DANIELA BERTOLINI ZANATTA

SEQUENCIAMENTO DE UM CÓDIGO DE BARRAS
COMO FERRAMENTA PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ALTERAÇÕES NA DINÂMICA DE POPULAÇÕES
CELULARES TRANSDUZIDAS COM VETORES
LENTIVIRAIS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2012

DANIELA BERTOLINI ZANATTA

SEQUENCIAMENTO DE UM CÓDIGO DE BARRAS
COMO FERRAMENTA PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ALTERAÇÕES NA DINÂMICA DE POPULAÇÕES
CELULARES TRANSDUZIDAS COM VETORES
LENTIVIRAIS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração:
Biotecnologia

Orientador: Dr. Bryan Eric Strauss

Versão original

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zanatta, Daniela Bertolini.

Sequenciamento de um código de barras como ferramenta para quantificação de alterações na dinâmica de populações celulares transduzidas com vetores lentivirais / Daniela Bertolini Zanatta. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Bryan Eric Strauss.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia Molecular

Versão do título para o inglês: Sequencing of barcode as a tool for the quantification of changes in the dynamics of cell populations transduced with lentiviral vectors.

Descritores: 1. Transferência de genes 2. Lentivírus 3. Código de Barras 4. Sequenciamento genético 5. Mutagênese 6. Biotecnologia I. Strauss, Bryan Eric II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB027/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Daniela Bertolini Zanatta.

Título da Tese: Sequenciamento de um código de barras como ferramenta para quantificação de alterações na dinâmica de populações celulares transduzidas com vetores lentivirais.

Orientador(a): Dr. Bryan Eric Strauss.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho ao meu Pai, que sempre
dedicou sua vida à seus filhos e que hoje deixa
saudades. Se não fosse por você Pai e por você
Mãe, não teria chegado até aqui.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais, por seu amor incondicional, carinho e paciência. Por terem sempre acreditado em mim e terem sempre apoiado minhas decisões.

Ao meu querido Daniel por seu amor e sua compreensão. Além de sua ajuda fundamental no desenvolvimento do software de análise utilizado neste trabalho.

Ao meu orientador o Professor Dr. Bryan Eric Strauss, por sua confiança em ter me aceitado como sua aluna. Por suas críticas, correções, sugestões e ensinamentos.

A todos os colegas do Laboratório de Vetores Virais e do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, atuais ou antigos, pela constante disposição em ajudar e por tornarem até mesmo os dias de maus resultados experimentais em dias mais agradáveis.

Aos amigos Ana Carolina, Aline, Chester, João Paulo, Rafael, Ruan e Taynah por terem se tornado grandes companheiros, não apenas na pesquisa.

Ao Dr. Márcio C. Bajgelman por sua contribuição e ensinamentos despendidos na fase inicial deste trabalho.

Ao Dr. Tiago Sobreira pela imensa ajuda com o Linux e o Phred/Phrap/Consed.

Ao bioterista Leandro Rodrigues Iannuzzi e, principalmente, à Maria Aparecida da Silva Ferreira por sua paciência e grande ajuda com os animais.

Ao Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor) e ao Dr. José Eduardo Krieger pela excelente infraestrutura que possibilitou a realização dos experimentos.

À Universidade de São Paulo e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

O que me tranquiliza
é que tudo o que existe,
existe com uma precisão absoluta.

O que for do tamanho de uma cabeça de alfinete
não transborda nem uma fração de milímetro
além do tamanho de uma cabeça de alfinete.

Tudo o que existe é de uma grande exatidão.
Pena é que a maior parte do que existe
com essa exatidão
nos é tecnicamente invisível.

O bom é que a verdade chega a nós
como um sentido secreto das coisas.

Nós terminamos adivinhando, confusos,
a perfeição.

A perfeição - Clarice Lispector

RESUMO

ZANATTA, D. B. **Sequenciamento de um código de barras como ferramenta para quantificação de alterações na dinâmica de populações celulares transduzidas com vetores lentivirais**. 2012. 141 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os vetores lentivirais representam uma das melhores opções para transferência e terapia gênica, especialmente em situações que exigem expressão do transgene em longo prazo (meses, anos e até mesmo durante toda a vida do paciente). A durabilidade do vetor lentiviral se deriva da capacidade do provírus se integrar no genoma do hospedeiro e ser transmitido para células filhas. Entretanto, a inserção do provírus altera o genoma da célula, um fenômeno chamado mutagênese insercional, podendo ter consequências indesejadas, como a indução da expressão de genes celulares que promovem proliferação da célula hospedeira. Eventos deste tipo têm sido descritos em protocolos clínicos para o tratamento de SCID-X1, doença granulomatosa crônica e talassemia beta, quando vetores retrovirais (oncoretrovírus) foram utilizados. Devido a estas ocorrências, o uso de vetores retrovirais está diminuindo enquanto o uso de vetores lentivirais, considerados mais seguros, está ganhando força. A propensão do vetor lentiviral em provocar a proliferação de subpopulações de células transduzidas, evento chamado expansão clonal, representa uma área de estudo importante. Infelizmente, existem poucos métodos simples e rápidos que podem revelar e quantificar essa expansão clonal. Para este fim, descreve-se aqui a construção de uma biblioteca de vetores contendo uma marcação aleatória, denominada “código de barras”. O sequenciamento do código de barras permitirá revelar, caracterizar e até quantificar a expansão clonal de uma população de células transduzidas tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os ensaios preliminares mostraram a viabilidade da proposta, uma vez que foi possível validar a quantificação do código de barras por sequenciamento. Neste sentido foi realizado o experimento *in vivo* utilizando agora vetores lentivirais contendo o código de barras para transduzir células-tronco hematopoiéticas. Os resultados mostraram que o código de barras é uma ferramenta sensível e eficiente em medir a complexidade da população celular. Esta metodologia será de grande valia para testar novos arranjos de promotores e genes terapêuticos, permitindo desenvolver vetores mais seguros, contribuindo para a redução da probabilidade de um evento de proliferação clonal desencadeado pela mutagênese insercional.

Palavras-chave: Transferência de genes. Lentivírus. Código de barras. Sequenciamento genético. Mutagênese. Biotecnologia.

ABSTRACT

ZANATTA, D. B. **Sequencing of a barcode as a tool for the quantification of changes in the dynamics of cell populations transduced with lentiviral vectors.**

2012. 141 p. Thesis (PhD Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Lentiviral vectors represent one of the best options for gene transfer and therapy, especially in situations that require long-term transgene expression (months, years and even duration over the lifetime of the patient). The durability of the lentiviral vector is derived from the ability of the provirus to integrate into the host genome and be passed on to daughter cells. However, insertion of the provirus alters the cell's genome, a phenomenon called insertional mutagenesis, which may have adverse consequences, such as induction of gene expression that promotes proliferation of the host cell. Events of this type have been described in clinical trials for the treatment of SCID-X1, chronic granulomatous disease and beta thalassemia when retroviral vectors (onco-retrovirus) were used. Because of these occurrences, the use of retroviral vectors is decreasing while the use of lentiviral vectors, regarded as safer, is gaining thrust. The predisposition of lentiviral vectors to cause the proliferation of subpopulations of transduced cells, an event called clonal expansion, represents an important area of study. Unfortunately, there are few simple and quick methods that can reveal and quantify clonal expansion. To this end, we describe here the construction of a vector library containing random markers, called "barcodes". The sequencing of the barcode could reveal, characterize and quantify the clonal expansion of a transduced cells population both *in vitro* and *in vivo*. The preliminary tests have shown the feasibility of the proposal, since it was possible to validate the quantification of the barcode by sequencing. In this sense the experiment was performed *in vivo*, now using lentiviral vectors containing the barcode to transduce hematopoietic stem cells. The results showed that the barcode is a sensitive and efficient tool for measuring the complexity of cell populations. This methodology will be valuable to test new arrangements of promoters and therapeutic genes, allowing the development of safer vectors, helping to reduce the probability of clonal proliferation events triggered by insertional mutagenesis.

Keywords: Gene transfer. Lentivirus. Barcode. Genetic Sequencing. Mutagenesis. Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural do HIV-1.....	18
Figura 2 - Representação esquemática do processo de transcrição reversa do genoma de RNA viral, gerando um DNA dupla fita linear.	20
Figura 3 - Integração do DNA retroviral.....	22
Figura 4 – Esquema de um vetor auto-inativante (SIN).	28
Figura 5 - Produção do vetor lentiviral a partir da transfecção de 4 plasmídeos em cultura de células.	29
Figura 6 - Representação da LAM-PCR (A), LM-PCR (B) e EFRAM-PCR (C).	40
Figura 7 - Representação esquemática do conceito do código de barras e seu uso para quantificação da complexidade de uma população.	42
Figura 8 - Representação esquemática dos vetores lentivirais.	48
Figura 9 - Fluxograma para análise dos resultados gerados a partir do sequenciamento do código de barras.	61
Figura 10 - Gráficos de regressão linear com os valores obtidos e esperados da combinação de dois clones da biblioteca CTR.....	65
Figura 11 - Análise do código de barras CTR, através da combinação dos clones pBS-CTR 1 e pBS-CTR 4 em diferentes proporções.....	66
Figura 12 - Cromatograma obtido do experimento da mistura dos clones pBS-CTR 1 e pBS-CTR 4 em diferentes proporções.	67
Figura 13 - Representação gráfica da proporção entre a biblioteca CTR e o clone pBS-CTR 10.	69
Figura 14 - Gráficos de regressão linear com os valores obtidos e esperados da combinação de dois clones da biblioteca AGY.....	71
Figura 15 - Análise do código de barras AGY, através da combinação dos clones pBS-AGY 1 e pBS-AGY 5 em diferentes proporções.	72
Figura 16 – Representação gráfica da proporção entre o clone e a biblioteca pBS-AGY.....	73
Figura 17 - Análise do código de barras quando diluído em gDNA.....	75
Figura 18 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-iGΔU6.....	76
Figura 19 - Representação esquemática do vetor Lego-liG-ΔU6.....	77
Figura 20 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do Lego-liG-ΔU6.	78
Figura 21 - Representação esquemática do vetor Lego-LiGΔU6.....	79
Figura 22 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-LiGΔU6.....	79

Figura 23 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-CB-iGΔU6.	81
Figura 24 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-CB-liGΔU6.	82
Figura 25 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-CB-LiGΔU6.	82
Figura 26 - Microscopia de fluorescência das células HEK293T utilizadas para a produção lentiviral.	83
Figura 27 - Citometria de fluxo mostrando a eficiência de transdução dos diferentes vetores em células NIH-3T3.	84
Figura 28 - Citometria de fluxo mostrando a eficiência de transdução dos diferentes vetores em células NIH3T3.	85
Figura 29 - Imunofluorescência de células NIH-3T3.	87
Figura 30 – Citometria de fluxo para análise da expressão de <i>GFP</i> em células transduzidas com o vetor Lego-liGΔU6.....	88
Figura 31 - Citometria de fluxo para análise da expressão de <i>IL2RG</i> em células transduzidas com o vetor Lego-liG-ΔU6 e marcadas com o anticorpo anti-CD132.	89
Figura 32 - Citometria de fluxo para quantificação da população transduzida com o vetor contendo a do clone #1 e com o vetor contendo a biblioteca.	91
Figura 33 - Representação gráfica da quantificação da biblioteca <i>versus</i> clone #1 em diferentes amostras e em diferentes momentos.	92
Figura 34 - Diferença entre os valores quantificados da biblioteca <i>versus</i> clone #1 ao longo do tempo.	93
Figura 35 - Representação gráfica da quantificação da biblioteca <i>versus</i> clone #2 em diferentes amostras e em diferentes momentos.	94
Figura 36 - Diferença entre os valores quantificados da biblioteca <i>versus</i> clone #2 ao longo do tempo.	95
Figura 37 - Caracterização das células-tronco hematopoiéticas.	96
Figura 38 - Quantificação de células-tronco hematopoiéticas transduzidas com vetor lentiviral.	97
Figura 39 - Citometria de fluxo das HSC purificadas e marcadas com os anticorpos conjugados a fluorocromo, CD-117-PE e anti-Sca1-FITC.	99
Figura 40 - Apresentação gráfica da análise dos resultados dos sequenciamentos realizados de tempo em tempo, nas amostras obtidas dos animais.	101

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação da Família <i>Retroviridae</i>	16
Quadro 2 - Comparação entre diferentes vetores virais utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica, destacando-se suas vantagens e desvantagens. ..	24
Quadro 3 - Nomenclatura das bases de especificidade incompletas, ou degeneradas, em sequências de nucleotídeos. Determinação pelo Comitê de Nomenclatura da União de Bioquímica Internacional (NC-IUB)	47
Quadro 4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados no sequenciamento.....	53
Quadro 5 - Regiões variáveis CTR e NAN dos clones sequenciados.	63
Quadro 6 - Regiões variáveis AGY e NAN dos clones sequenciados.....	70
Quadro 7 - Sequência do código de barras de quatro clones isolados da biblioteca Lego-CB-iGΔU6.	81
Quadro 8 - Grupos de animais transplantados.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Montagem de proporções variadas entre os clones da biblioteca CTR e sua quantificação.	64
Tabela 2 - Quantificação das proporções variadas entre um clone específico misturado com a biblioteca CTR.	68
Tabela 3 - Quantificação das proporções variadas da mistura entre dois clones AGY.....	71
Tabela 4 - Quantificação das proporções variadas entre um clone específico misturado com a biblioteca AGY.	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Retrovírus.....	15
1.1.1	Ciclo de vida retroviral.....	17
1.2	Terapia gênica e os vetores retrovirais	23
1.2.1	Vetores lentivirais	26
1.2.2	Progressos e problemas associados com a utilização do vetor retroviral em protocolos clínicos de terapia gênica	30
1.3	Perfil de integração retroviral.....	37
1.4	Código de barras como ferramenta para medida quantitativa da expansão clonal	41
2	OBJETIVOS E METAS	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	Concepção do código de barras	46
3.2	Construção dos vetores de transferência lentiviral	48
3.3	Construção das bibliotecas.....	49
3.3.1	Síntese da dupla fita do código de barras	49
3.3.2	Clonagem das bibliotecas protótipo (CTR e AGY)	50
3.3.3	Clonagem da biblioteca CB nos vetores lentivirais	50
3.4	Experimentos <i>in vitro</i> com as bibliotecas.....	51
3.4.1	Avaliação do código de barras protótipo (CTR e AGY)	51
3.4.2	Avaliação da influência do DNA genômico para a análise	52
3.4.3	Avaliação da biblioteca CB em cultura de células	52
3.5	Sequenciamento dos experimentos <i>in vitro</i> e análise do cromatograma	53
3.6	Produção de estoques virais.....	55
3.7	Análise por citometria de fluxo	56
3.8	Imunofluorescência (IMF) para detecção de <i>LMO2</i>.....	56
3.9	Detecção de <i>IL2RG</i> por citometria de fluxo	57
3.10	Transplante de célula-tronco hematopoiéticas (HSC) transduzidas com vetores contendo o código de barras	57
3.10.1	Linhagem de camundongos.....	57
3.10.2	Obtenção de HSC.....	58
3.10.3	Transdução de HSC	59
3.10.4	Transplante	59
3.10.5	Sequenciamento e análise do cromatograma: ensaio <i>in vivo</i>	60
4	RESULTADOS.....	63
4.1	Construção da biblioteca pBS-CTR	63
4.2	Avaliação preliminar do potencial quantitativo do código de barras usando a biblioteca pBS-CTR	64

4.2.1	Combinação de dois clones	64
4.2.2	Combinação de um clone mais biblioteca	68
4.3	Construção da biblioteca pBS-AGY.....	69
4.4	Avaliação preliminar do potencial quantitativo do código de barras usando a biblioteca pBS-AGY.....	70
4.4.1	Combinação de dois clones	70
4.4.2	Combinação de um clone mais biblioteca	72
4.5	Avaliação do código de barras na presença de DNA genômico	74
4.6	Construção dos vetores lentivirais.....	76
4.6.1	Lego-iGΔU6	76
4.6.2	Lego-liGΔU6	77
4.6.3	Lego-LiGΔU6	78
4.7	Construção das bibliotecas de vetores lentivirais	80
4.7.1	Produção de estoques virais	83
4.7.2	Imunofluorescência para detecção de <i>LMO2</i>	86
4.7.3	Citometria de fluxo para detecção de <i>IL2RG</i>	88
4.7.4	Avaliação do Código de Barras em cultura de células	90
4.8	Piloto de obtenção e transdução de HSC.....	95
4.9	Transdução e transplante de HSC	97
4.10	Recuperação e análise do código de barras <i>in vivo</i>	99
5	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICES	117
	APÊNDICE A – Alinhamento realizado com a ferramenta CLUSTALW2 .	117
	APÊNDICE B – Alinhamento realizado com a ferramenta CLUSTALW2 .	119
	ANEXOS	121
	ANEXO A - Resultados dos exames de sangue da segunda coleta	121
	ANEXO B - Resultados dos exames de sangue da quarta coleta	127
	ANEXO C - Resultados dos exames de sangue da sexta coleta.....	133
	ANEXO D - Resultados dos exames de sangue da oitava coleta.....	138

1 INTRODUÇÃO

1.1 Retrovírus

Os retrovírus compreendem uma família de vírus envelopados que possuem RNA como código genético, chamada *Retroviridae*. Sua nomenclatura teve origem na capacidade destes vírus de converter seu material genético em DNA através de um processo denominado transcrição reversa (RT).

A classificação dos retrovírus é feita de acordo com a similaridade entre as sequências do gene *pol*, codificador da enzima polimerase, responsável pela síntese e integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, após infecção. Outras características como a presença de genes adicionais, estrutura dos vírions, entre outras, também podem ser utilizadas para a classificação destes vírus (COFFIN et al., 1997).

Atualmente esta família se encontra dividida em duas sub-famílias: *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*. Os *Orthoretrovirinae* são divididos em 6 gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Gammaretrovirus* e *Lentivirus*. Enquanto a sub-família *Spumaretrovirinae* é constituída de apenas um gênero, os *Spumavirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS, 2009). Os *Orthoretrovirinae*, com exceção do gênero *Lentivirus*, possuem potencial oncogênico e por isso são chamados de oncoretrovírus. Exemplos específicos de cada gênero se encontram no Quadro 1.

Os retrovírus podem ser classificados de acordo com a complexidade do seu genoma, sendo divididos em retrovírus simples ou complexos, entretanto esta característica não é utilizada a fim de classificação taxonômica. Os retrovírus simples possuem em seu genoma apenas domínios codificantes para as proteínas essenciais à formação do vírion, enquanto que os retrovírus complexos codificam proteínas regulatórias não constituintes das partículas virais que são derivadas de múltiplos *splices* alternativos do RNAm, levando a uma grande variedade de produtos. Com essas proteínas adicionais, os vírus complexos adquirem a capacidade de controlar funções que são providenciadas pela célula hospedeira no

caso dos retrovírus simples, fazendo com que os retrovírus complexos tenham uma maior eficiência de infecção (COFFIN et al., 1997).

Quadro 1 - Classificação da Família *Retroviridae*

Subfamília	Gênero	Espécie	Genoma
<i>Orthoretrovirinae</i>	<i>Alpharetrovirus</i>	Vírus do carcinoma aviário Mill Hill 2; vírus da leucose aviária; vírus da mieloblastose aviária; vírus da mielocistose aviária 29; vírus do sarcoma aviário	simples
	<i>Betaretrovirus</i>	Retrovírus Jaagsiekte de ovinos; Langur vírus; Vírus dos macacos Mason-Pfizer; vírus do tumor mamário Murino; retrovírus do macaco e esquilo	simples
	<i>Deltaretrovirus</i>	Vírus da leucemia bovina; vírus T-linfotrópico 1, 2 e 3 de primatas	complexo
	<i>Epsilonretrovirus</i>	Vírus do sarcoma dermal dos Walleye; vírus da hiperplasia epidermal dos Walleye 1 e 2	complexo
	<i>Gammaretrovirus</i>	Vírus da leucemia murina; vírus da leukemia felina; vírus da leukemia dos macacos Gibbon; vírus do sarcoma murino; vírus do sarcoma feline; vírus do sarcoma de macaco; oncovírus tipo-C da cobaia; oncovírus porcino tipo-C; vírus da reticuloendotélíose; vírus da necrose do baço de pato de Trager; retrovírus de víbora; vírus Sincicial do Pintainho	simples
	<i>Lentivirus</i>	Vírus da imunodeficiência bovina; vírus da imunodeficiência felina; vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e 2; vírus da imunodeficiência dos símios; vírus da artrite-encefalite caprina; vírus da anemia infecciosa equina; lentivírus de onça-parda; vírus Visna/maedi	complexo
<i>Spumaretrovirinae</i>	<i>Spumavirus</i>	Vírus espumoso dos símios; vírus espumoso bovino; vírus espumoso equino; vírus espumoso felino	complexo

1.1.1 Ciclo de vida retroviral

O ciclo de vida dos retrovírus pode ser dividido em fase inicial e tardia, estando a fase inicial relacionada com a infecção e integração do cDNA viral e a fase tardia com a expressão dos genes virais, produção e maturação dos vírions (NISOLE; SAÏB, 2004).

Na fase inicial, após a ligação das proteínas do envelope viral aos receptores de superfície celular, a partícula viral é internalizada dando início à transcrição reversa e à integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira. Uma vez hospedado no genoma celular, sucede a fase tardia, na qual o retrovírus se torna altamente dependente do sistema de replicação, de expressão e de produção de proteínas do hospedeiro, mas que passam a ser reguladas por sinais virais. Após este processo, as partículas são então montadas e liberadas (VARMUS, 1988).

O genoma dos retrovírus consiste em duas moléculas idênticas de RNA empacotadas pelo envelope viral que é derivado da membrana da célula hospedeira, mas que contém glicoproteínas virais. Em cada extremidade do RNA viral existem sequências curtas redundantes (R), associadas a sequências únicas, denominadas U5 e U3, localizadas nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Nestas regiões encontram-se sequências regulatórias, essenciais para a expressão dos genes virais. Entre estas duas regiões existem as sequências codificantes para os genes *gag*, *pol* e *env*, que codificam proteínas estruturais, transcriptase reversa, RNase H, integrase e protease, necessárias para a replicação viral e que são encontradas em todos os retrovírus não defectivos. Os retrovírus mais complexos, como os lentivírus, possuem genes adicionais (*tat*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*) que contribuem para uma replicação viral mais eficiente e persistente (COLLINS, 1991; TANG et al., 1999). Na Figura 1, são representados os genes codificadores do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) com sua indicação de suas posições no genoma viral, além de mostrar o modelo de uma partícula deste vírus.

Figura 1 - Representação estrutural do HIV-1.

(A) Representação do DNA proviral e do RNA genômico e indicação da posição dos genes codificadores para as proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*), proteínas regulatórias (*tat* e *rev*) e proteínas acessórias (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*). (B) Modelo da partícula viral do HIV-1.

FONTE: RAMEZANI; HAWLEY, 2002.

Dentro da célula hospedeira, o RNA viral é transcrito em DNA pelo processo de transcrição reversa. Embora existam duas moléculas de RNA no genoma viral, apenas uma é utilizada como molde para a síntese de uma molécula de DNA (COFFIN et al., 1997). Durante este processo as sequências únicas U5 e U3 são duplicadas através da transcrição reversa, gerando os *long terminal repeats* (LTRs) no final do DNA proviral, de forma que o provírus contenha a sequência U3-R-U5 em ambas extremidades terminais. Esta duplicação é essencial, uma vez que muitos elementos regulatórios da transcrição estão localizados na região U3 da

extremidade 3', mas que precisam estar na extremidade 5' inicial (TANG et al., 1999). Os LTRs são responsáveis pela regulação da expressão dos genes virais, pela replicação e patogênese, tendo grande importância no genoma viral.

A partícula viral carrega em seu interior moléculas tRNAs codificadas pela célula hospedeira onde foi produzida. Esse tRNA se hibridiza com uma região complementar presente no RNA viral, denominada PBS (*primer-binding site*), atuando como iniciador para a transcriptase reversa (Figura 2). Após a extensão de um segmento de DNA, as regiões R e U5 presentes no RNA, são removidas pela atividade enzimática da RNase H da transcriptase reversa. Ocorre então o “primeiro salto”, onde o DNA sintetizado é translocado juntamente com o tRNA iniciador e se hibridiza com a sequência R remanescente na extremidade 3', ocorrendo a extensão de uma fita de DNA a partir da extremidade 3' do RNA, que agora contém um LTR completo e a sequência PBS que estava presente no iniciador. Quase todo o RNA é agora removido pela RNase H, com exceção do trato de polipurinas (PPT) que permanece para atuar como um novo primer para que a RT faça a extensão de uma segunda fita de DNA.

Após a síntese de um pedaço da segunda fita a partir do PPT, os iniciadores são removidos e uma estrutura circular é formada, a partir do anelamento das regiões PBS complementares presentes nas extremidades da dupla fita do DNA. A transcriptase reversa atua como uma DNA polimerase dependente de DNA copiando o restante da segunda fita que agora contém o LTR em ambas as extremidades. A transcriptase reversa realiza então o “segundo salto” de volta para a primeira fita de DNA sintetizada, completando-a com o LTR nas duas extremidades (COLLINS, 1991; COFFIN et al., 1997). A dupla fita de DNA viral é denominada provírus.

Figura 2 - Representação esquemática do processo de transcrição reversa do genoma de RNA viral, gerando um DNA dupla fita linear.

Este processo leva à duplicação das regiões U5 e U3, originando a região LTR (cada um contendo as regiões U3-R-U5) em ambas as extremidades, características da forma de DNA do genoma viral.

FONTE: COFFIN et al., 1997.

Outro importante passo no ciclo de vida retroviral é a integração do seu genoma no cromossomo da célula hospedeira, mas para que isso ocorra é necessário que o DNA viral seja levado através do citoplasma para o núcleo. No citoplasma, o DNA viral é associado a um complexo de pré-integração (PIC) contendo proteínas virais e celulares, tendo a integrase viral (IN) como a principal componente deste complexo, e é este complexo que se move para o núcleo. Para os retrovírus simples, como o vírus da leucemia murina de Moloney (MoMLV), atravessar a barreira nuclear é um processo intransponível, sendo necessário que a célula esteja em mitose para que seu DNA seja exposto e a integração ocorra. Em contraste, outros retrovírus mais complexos, como o HIV-1, possuem a capacidade de transitar em uma membrana nuclear intacta, podendo assim integrar seu genoma em células não proliferativas. Maiores detalhes sobre a importação do PIC para o núcleo podem ser encontrados na revisão de SUZUKI e CRAIGIE (2007).

Antes da integração, o DNA viral é processado pela IN ainda no citoplasma (Figura 3), por meio da retirada de dois pares de base em cada extremidade da dupla fita, produzindo extremidades 3' livres de hidroxila. Embora o DNA viral possa ser encontrado na forma circular dentro do núcleo, apenas sua forma linear atua como substrato para a reação de integração (WHITCOMB; HUGHES, 1992). Monômeros ou multímeros de IN se ligam em cada extremidade do DNA viral de forma que elas permaneçam juntas através de uma interação proteína-proteína. No núcleo, o processo de junção do DNA viral com o celular, tem início com a clivagem de 4-6 pb do DNA hospedeiro e seguida pela ligação do DNA viral processado. Após a junção, algumas bases do DNA hospedeiro permanecem despareadas, formando *gaps* entre o DNA viral e celular que devem ser reparados, ligados e a cromatina reconstituída, em um processo denominado reparo pós-integrativo, pelos mecanismos de reparo celular (KATZ; SKALKA, 1994). Após a integração, inicia-se a síntese de novas moléculas de RNA viral pela RNA polimerase da célula.

Figura 3 - Integração do DNA retroviral.

(1) Processamento: A integrase realiza a clivagem de duas bases das extremidades 3' das duas fitas de DNA viral, deixando as extremidades com agrupamentos OH livres. (2) Junção: Após o processamento, o DNA viral é ligado ao DNA celular. (3) Reparo pós-integração: aparato de reparo celular que preenche a lacuna entre o DNA viral e celular

FONTE: SMITH; DANIEL, 2006.

A integração do DNA retroviral no genoma da célula hospedeira pode afetar a transcrição dos genes do hospedeiro, adjacentes ao sítio de integração do provírus. A ativação da transcrição dos genes celulares é mediada pelos LTRs retrovirais que atuam como *enhancers* naturais e que podem atuar à distância, via interações com os *loops* de cromatina, independentemente da orientação e posição. Assim, a integração dos vetores retrovirais dentro ou nas proximidades de um gene pode ativar ou interromper a transcrição normal deste gene.

Um dos maiores riscos da integração retroviral é a ativação de proto-oncogenes, induzindo uma transformação oncogênica. Outra possibilidade de ocorrência de uma transformação oncogênica seria a interrupção de genes supressores de tumor, ocasionada pela inserção proviral (COFFIN et al., 1997), fenômeno este chamado de mutagênese insercional. Estudos de mutagênese insercional retroviral têm identificado diversos exemplos de oncogenes e supressores de tumor que foram alterados pela integração viral. Entre eles, foi

verificada a ativação do *c-Myc*, *Pim-1*, *N-Myc*, *Evi-1*, *Notch1* e *Tpl-2*, além da inativação de *p53* e *NF1* (UREN et al., 2005). A constatação de que a integração ocorre nos chamados sítios comuns de integração retroviral, levou ao estudo do perfil de integração dos vetores retrovirais, mas este assunto será discutido adiante.

1.2 Terapia gênica e os vetores retrovirais

A terapia gênica é uma estratégia clínica que tem como finalidade realizar o tratamento ou aliviar doenças genéticas, através da transferência de genes, segmentos de genes ou oligonucleotídeos no genoma das células de um paciente, podendo ser realizada tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Dentre as doenças que podem ser tratadas com este procedimento, encontram-se as doenças infecciosas, câncer, doenças hereditárias e doenças do sistema imunológico, como alergias, inflamações e doenças autoimunes. Contudo, a terapia gênica é utilizada apenas em células somáticas, uma vez que seu uso em células germinativas levanta sérias questões éticas (STRACHAN; READ, 1999).

A terapia gênica é idealizada como alternativa para o tratamento de doenças em que protocolos convencionais não apresentam resultados satisfatórios. Neste contexto, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas e testadas em ensaios clínicos. Entretanto, os pesquisadores têm se deparado com diversos desafios tecnológicos, como a escolha do vetor ideal para cada caso, que realize a transferência gênica de forma segura, eficiente e duradoura, e que possa ser aplicado em vários tipos celulares, tecidos e órgãos, de forma a corrigir a doença.

Desta forma, as técnicas e vetores de transferência gênica estão em constante aperfeiçoamento, visando melhorar a eficiência de transdução, aumentar a especificidade por uma determinada célula alvo, diminuir efeitos colaterais e resposta imune indesejada do organismo, bem como aprimorar o controle da expressão do transgene na célula alvo (ROBBINS et al., 1998; DANI, 1999; STRAUSS et al., 2005; 2006).

Podemos classificar os métodos de transferência gênica em físico, quando a introdução do transgene se dá de maneira mecânica, em químico, quando se utiliza

uma substância de origem química como veículo de entrega, ou biológico, quando organismos são utilizados, como vírus ou algumas bactérias. Todavia, os vetores de origem viral têm sido os mais utilizados atualmente no desenvolvimento de protocolos de terapia gênica (NARDI et al., 2002).

O desenvolvimento dos vetores virais se baseia em torná-los incapazes de autorreplicar, através da deleção de genes que são importantes para a proliferação viral e para a patogenicidade, mas conservando sua capacidade de transferir o material genético para a célula-alvo, para garantir a segurança do vetor. Além disso, também é necessário modificar o genoma viral para que este possa aceitar e expressar os genes de interesse. Um grande número de vetores tem sido desenvolvido para aplicação na terapia gênica, destacando-se entre eles os vetores retrovirais, adenovirais e adeno-associados (Quadro 2). Estes vetores precisam ser escolhidos com cautela, elegendo aquele que melhor se encaixe nas necessidades terapêuticas do tratamento.

Quadro 2 - Comparação entre diferentes vetores virais utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica, destacando-se suas vantagens e desvantagens.

	Adenovírus	Vírus Adeno-associado	Retrovírus
Genoma	dsDNA	ssDNA	ssRNA
Tamanho do genoma	39-38 kb	5 kb	3-9 kb
Tamanho do inserto	2-38 kb	4-5 kb	1-7 kb
Revestimento	Não-envelopado	Não-envelopado	Envelopado
Interação com o genoma hospedeiro	Não-integrativo	Semi-integrativo	Integrativo
Expressão do transgene	Transiente	Potencialmente a longo prazo	A longo prazo
Títulos	10^{12}	10^{12}	10^9
Imunogenicidade	Alta	Baixa	Baixa
Utilização na terapia gênica *	24,2%	4,7%	23%

* FONTE: WILEY et al., 2012

Atualmente os vetores adenovirais são os mais utilizados em protocolos clínicos de terapia gênica, especialmente para o tratamento de câncer, entretanto suas aplicações são limitadas, pois possuem alta imunogenicidade e expressão transiente, pois não integram seu genoma na célula hospedeira. Embora os vetores

adeno-associados possuem a capacidade de integração, são vetores relativamente novos, cuja utilização no sistema hematopoiético ainda não foi muito explorada e são pouco utilizados na clínica, mas são promissores para o tratamento de várias doenças, como hemofilia, Amaurose Congênita de Leber e fibrose cística.

Devido à sua capacidade de integração no genoma da célula hospedeira, permitindo que o transgene possa ser expresso ao longo da vida do paciente, o uso dos retrovírus como vetor de transferência gênica para o tratamento de doenças de origem genética, é o mais indicado. Dentre todos os protocolos clínicos de terapia gênica, 23 utilizaram estes vetores e cerca de 2 dos protocolos utilizavam, mas especificamente, vetores lentivirais (WILEY et al., 2012). Outras características atrativas desses vetores são sua capacidade de transduzir uma grande variedade de tipos celulares, seu genoma ser altamente manipulável, sua baixa toxicidade e sua produção ser mais rápida quando comparada a outros sistemas virais (STRACHAN; READ, 1999).

Os oncoretrovírus derivados do MoMLV foram os primeiros vetores a serem desenvolvidos e os primeiros a entrarem em protocolos clínicos. Esses vetores têm servido de base para a maioria dos sistemas retrovirais de transferência gênica. Em contrapartida, eles também possuem algumas limitações como a instabilidade da partícula viral, o baixo título viral, o fato de que eles são capazes de infectar apenas células que estão em divisão limitando o número de células que podem ser atingidas por esses vetores, além de poderem causar mutagênese insercional (ESCORS; BRECKPOT, 2010).

Assim, nos últimos anos vetores derivados de outro membro da família *Retroviridae*, os lentivírus, que são capazes de transduzir células mitóticas e pós-mitóticas, foram desenvolvidos para aplicação clínica. Outra vantagem dos lentivírus está relacionada com seu perfil de integração que parece ser mais seguro do que o observado com MoMLV. Apesar de também poderem induzir mutagênese insercional, esta ocorre com menor frequência, devido ao perfil de integração desses vetores ser diferente do perfil de integração dos oncoretrovírus, conforme será discutido adiante.

1.2.1 Vetores lentivirais

Os lentivírus pertencem à família *Retroviridae*. Suas características estruturais são bem semelhantes ao oncoretrovírus MoMLV, entretanto os lentivírus possuem a capacidade de transduzir células quiescentes (NALDINI et al., 1996). Os vetores lentivirais (Lv) mais comuns derivam do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (NALDINI et al., 1996) ou podem derivar de outras espécies como símios (WHITE et al., 1999), felinos (POESCHLA et al., 1998), bovinos (BERKOVITZ et al., 2001), vírus da anemia infecciosa equina (OLSEN et al., 1998), entre outros.

Em função da utilização de vetores derivados da imunodeficiência humana (HIV), desenvolveram-se diversas estratégias tendo em vista o delineamento de dispositivos que garantam a segurança de produção e manipulação dos Lv (DULL et al., 1998; BLESCH et al., 2004; DELENDIA et al., 2004). Basicamente, os genes patogênicos *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* que não são necessários ao sistema de transferência gênica são eliminando e as partículas virais, em geral, são produzidas pela co-transfecção dos plasmídeos de empacotamento, de transferência e codificador do envelope, em linhagem imortalizada de célula embrionária de rim humano (HEK) 293T (NALDINI et al., 1996a).

O vetor de empacotamento contém os genes *gag-pol*, que codificam proteínas estruturais, transcriptase reversa, integrase, capsídeo, nucleocapsídeo, entre outros necessários à produção de uma partícula viral. Esse vetor não apresenta a sequência Ψ (psi), impedindo a encapsidação de um transcrito codificando informações de empacotamento na progênie viral. Como consequência, a partícula viral produzida é capaz de transduzir a célula alvo, mas incapaz de se replicar, pois o genoma viral é unicamente codificado pelo vetor de transferência, que embora possua o Ψ , carece de informações de empacotamento. Outra característica do vetor de empacotamento é a substituição do sinal de poliadenilação presente no 3' LTR por um promotor heterólogo. Desta forma, não existem sequências homólogas entre os vetores de empacotamento e transferência, diminuindo assim a chance de recombinação e geração de um genoma viral com capacidade de replicação.

Nos vetores Lv de última geração os genes regulatórios *tat* e *rev* foram removidos do vetor plasmidial de empacotamento. A sequência regulatória,

denominada *rev*, que permite a exportação de RNA não processado por *splicing* para o citoplasma, é necessária para aumentar a expressão dos genes *gag* e *pol*. Nestes vetores Lv, a sequência *rev* foi separada do vetor de transferência e é fornecida por um vetor de empacotamento distinto, desprovido de sinal Ψ (GASMI et al., 1999). O produto do gene *tat* interage com sequências regulatórias da região U3 no LTR 5' estimulando a transcrição do genoma Lv. Como a região U3 da extremidade 5' do plasmídeo de transferência foi substituída por um arranjo *enhancer*/promotor heterólogo independente de *tat*, este gene também pôde ser eliminado (DULL et al., 1998).

O vetor no qual o gene de interesse é inserido denomina-se vetor de transferência, apresenta a sequência de empacotamento Ψ e é flanqueado por LTRs. O cassete de expressão do transgene usualmente contém um *enhancer*/promotor obtido de um vírus heterólogo ou de um promotor celular e é posicionado entre o RRE (elemento responsivo à *rev*) e o 3' LTR (SRINIVASAKUMAR, 2001).

Outra modificação que aumenta a segurança do vetor Lv consiste numa deleção de sequências regulatórias e *enhancers* da região U3 do LTR 3' (MIYOSHI et al., 1998), originando um vetor auto-inativante (SIN). A tecnologia SIN é baseada na capacidade do RNA viral de copiar a região U3 localizada em sua extremidade 3' para os dois LTRs no provírus, através da transcrição reversa (Figura 2), transferindo a região modificada para o 5' LTR. Após a integração, o vetor SIN minimiza a possibilidade do surgimento de uma partícula retroviral replicante-competente e também deve reduzir o risco de ocasionar efeitos colaterais devido à presença do LTR, um forte *enhancer*, presente nas duas extremidades do provírus que no genoma do hospedeiro pode levar a uma ativação inapropriada da transcrição de genes endógenos (Figura 4).

No vetor de transferência, o gene de interesse é inserido entre os LTRs, sendo sua expressão dirigida por um promotor interno. O uso de um promotor heterólogo interno para controlar expressão do transgene se faz necessário devido à inativação do promotor viral nos vetores SIN. Diversos arranjos promotores têm sido desenvolvidos no sentido de controlar ou direcionar a expressão do gene de interesse, por meio de promotores induzíveis (VIGNA et al., 2002), ou mesmo

promotores ativos somente em condições fisiológicas específicas (STRAUSS et al., 2006).

Segundo Coffin et al. (1997), as desvantagens dos vetores SIN incluem diminuição do título viral obtido, quando comparado com os vírus contendo LTR intacto, e a disposição para rearranjos do vetor através de recombinações com o próprio vetor, ou com as sequências virais presentes nas células empacotadoras, levando à produção de vírus com LTR intactos.

Figura 4 – Esquema de um vetor auto-inativante (SIN).

No vetor de transferência (A) o *enhancer/promotor* do 3' LTR é deletado para a construção do vetor SIN. Durante a transcrição (B) o *enhancer/promotor* U3 do 5' LTR e a porção U5 do 3'LTR são perdidos. (C) Através da transcrição reversa, a deleção U3 do 3' LTR é copiado para o 5' LTR, resultando em um provírus com ambos os LTRs defectivos.

FONTE: ZANATTA, 2012.

O plasmídeo usado na geração das partículas virais que codifica o envelope viral contém uma proteína heteróloga, fazendo com que a progênie viral possua um envelope diferente do vírus selvagem, ou seja, são pseudotipados. Para isto, frequentemente utiliza-se a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) ou o envelope anfitrião do MLV (Ampho). O envelope VSV-G confere às partículas alta estabilidade, permitindo sua ultracentrifugação e armazenagem por longo período de tempo. A interação entre o envelope VSV-G e a célula alvo ocorre através de moléculas de superfície celular ubíquas como sulfato de heparina proteoglicano e glicosaminoglicanas, que atuam como receptores de ligação viral (GUIBINGA et al., 2002). Na Figura 5 são apresentados os componentes básicos em um sistema de empacotamento lentiviral.

Figura 5 - Produção do vetor lentiviral a partir da transfecção de 4 plasmídeos em cultura de células.

A figura mostra os plasmídeos de empacotamento, o envelope heterólogo (exemplificado como o vetor contendo a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular, VSV-G) e o plasmídeo contendo o gene terapêutico, o vetor de transferência SIN. Os vetores de empacotamento codificam as proteínas estruturais virais. O vetor de empacotamento heterólogo é responsável pela geração das partículas virais. O vetor de transferência gera o RNA que é empacotado na partícula.

FONTE: ZANATTA, 2012.

O protocolo de produção transitória, a partir da transfecção dos vetores de transferência, de empacotamento e de envelope em cultura de células é o mais utilizado (Figura 5). As partículas lentivirais produzidas, conforme mencionado anteriormente, são incapazes de se replicar, possuindo unicamente a função de transduzir as células alvo. As preparações lentivirais, tipicamente alcançam títulos na ordem de 10^6 partículas por ml. Os vetores pseudotipados com o envelope contendo VSV-G podem ser concentrados cerca de 1000 vezes por meio de ultracentrifugação (BURNS et al., 1993), atingindo títulos da ordem de 10^9 partículas por ml.

1.2.2 Progressos e problemas associados com a utilização do vetor retroviral em protocolos clínicos de terapia gênica

Em 1990 teve início o primeiro protocolo de terapia gênica realizado com sucesso em humanos (BLAESE et al., 1995). Nesse protocolo foi utilizado um vetor, derivado do vetor gamaretroviral, para corrigir um gene defeituoso em linfócitos T de crianças portadoras de imunodeficiência grave combinada (SCID-ADA). A doença SCID-ADA é caracterizada por uma mutação no gene adenosina desaminase (ADA), ocasionando perda de atividade funcional linfocitária. Duas crianças portadoras de SCID-ADA receberam linfócitos T (autólogos), transduzidos *ex vivo* com um vetor retroviral contendo o gene da adenosina desaminase (ADA). Ambas as crianças continuaram a receber a medicação e o tratamento convencional, sendo verificada a normalização da contagem de células T, bem como resposta celular e humoral do sistema imune desses pacientes. Dez anos após a última infusão, Muul et al. (2003), demonstraram que um dos pacientes continuou a apresentar 20% dos linfócitos circulantes contendo o gene da ADA funcional.

Outros protocolos para SCID-ADA, agora focados na transferência do gene terapêutico para células progenitoras sanguíneas (CD34+), foram desenvolvidos. Bordignon et al. (1995) utilizaram um vetor gamaretroviral para transduzir células-tronco de medula óssea e após 2 anos do tratamento, foi observada a sobrevivência em longo prazo das células contendo o gene terapêutico. Em outro estudo, células-tronco hematopoiéticas (HSC) obtidas de cordão umbilical foram transduzidas com

sucesso, também utilizando um vetor gamaretroviral (KOHN et al., 1995) e utilizadas no tratamento de neonatos. Em outro protocolo (HOOGERBRUGGE et al., 1996), um baixo número de células CD34+ foi transduzido e os pacientes perderam a expressão do transgene 6 meses após a terapia. Esses pacientes não descontinuaram a reposição da enzima ADA bovina, o que pode ter contribuído para os baixos níveis de transdução.

Em 2009, 10 crianças com SCID-ADA que não possuíam doadores com HLA compatível, foram tratadas por transplante de células CD34+ transduzidas também por um vetor gamaretroviral (AIUTI et al., 2009). Essas crianças não receberam reposição enzimática após o transplante. Destes pacientes, 9 tiveram o sistema imune restituído, com aumento no número de células T e com normalização na função destas células. Entretanto, foram observados alguns efeitos desfavoráveis, incluindo neutropenia prolongada, hipertensão, infecções relacionadas ao cateter venoso central, reativação de infecção pelo vírus Epstein-Barr e hepatite autoimune.

Gaspar et al. (2006) descreveram a reconstituição da imunidade celular, da diferenciação dos tímócitos e correção metabólica por mais de 2 anos em um paciente, que não respondia à terapia de reposição da enzima ADA. Atualmente, este mesmo grupo expandiu seu protocolo para mais 6 pacientes e após 43 meses de tratamento nenhum efeito desfavorável foi observado, sendo que 4 destes pacientes apresentaram recuperação substancial da imunidade e os outros dois tiveram que retomar o tratamento com reposição da enzima, devido ao não funcionamento da terapia gênica (GASPAR et al., 2011).

Protocolos de terapia gênica para o tratamento de outro tipo de imunodeficiências primárias PID, conhecida como doença granulomatosa crônica ligada ao X (CGD-X), também foram realizados. Esta doença é causada por um defeito no complexo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase (NADPH), resultando em atividade deficiente dos neutrófilos fagocíticos, levando à infecções recorrentes de fungos e bactérias (GREZ et al., 2010). Dentre estes trabalhos, Ott et al. (2006) realizou a transdução de células CD34+ de dois pacientes adultos, utilizando um vetor retroviral carregando o gene terapêutico gp91^{phox}. Foi observada a ativação de genes promotores de crescimento (PRDM16 e MDS1/EVI1), o que favoreceu a terapia. Apesar do sucesso inicial da terapia, os dois pacientes sofreram silenciamento do transgêne, além de terem desenvolvido mielodisplasia devido à

superexpressão de EVI1. Embora a terapia gênica tenha restaurado entre 15% e 30% da atividade normal em 20% dos neutrófilos circulantes em ambos os pacientes tratados, um dos pacientes morreu devido a uma inflamação bacteriana crônica, enquanto que o outro precisou receber um transplante alogênico de HSC (STEIN et al., 2010).

Outro tipo de PID, a imunodeficiência severa combinada ligada ao X (SCID-X1) corresponde a aproximadamente 50% dos casos de SCID (THRASHER, 2008). Trata-se de uma doença monogênica recessiva herdada relacionada com o sistema imune e que afeta exclusivamente meninos, que costumam ser diagnosticados entre 3 e 6 meses de idade. Esta doença é causada por uma imunodeficiência severa celular e humoral combinadas, que resulta na ausência de células T e *natural killer* (NK) e na presença de linfócitos B não funcionais (PAGON et al., 1993).

Crianças com tal imunodeficiência são predispostas a infecções persistentes muito graves causadas por organismos oportunistas como bactérias, vírus e fungos, correm sério risco de morte e se não receberem tratamento adequado não sobrevivem além da infância. O quadro de SCID-X1 inclui ainda deficiência de crescimento, candidíase, ausência de amígdalas e gânglios linfáticos, erupções cutâneas, diarreia, tosse, congestão, febre, pneumonia, sepse e outras infecções bacterianas severas.

Esta doença é causada por mutações no gene codificador para a cadeia gama do receptor de interleucina - 2 (*IL2RG*), que é também conhecida como cadeia γ_c , uma subunidade comum dos receptores de IL-2, -4, -7, -9, -15 e -21, localizados na superfície das células precursoras de linfócitos, presentes na medula óssea (JANEWAY, 2001; KOHN, 2010).

Assim como na SCID-ADA, a reconstituição do sistema imune dos pacientes com X-SCID é possível através do transplante alogênico de medula óssea usando um HLA compatível, normalmente obtido de um familiar próximo ou que seja HLA haploidêntico, com células T maduras depletadas para evitar uma doença conhecida como enxerto-*versus*-receptor, que nada mais é do que o ataque do hospedeiro pelas células T transplantadas (PAGON et al., 1993; JANEWAY, 2001). Devido à dificuldade em encontrar doadores compatíveis e ao caráter monogênico da patologia, a terapia gênica para o tratamento de X-SCID é uma estratégia atrativa.

Em protocolos de terapia gênica para X-SCID, as células-tronco da medula óssea do próprio paciente são retiradas e utilizadas para a inserção da cópia normal do gene *IL2RG*. Após a correção das células *ex vivo*, elas retornam ao paciente por transfusão. Os benefícios desta terapia incluem a falta da necessidade de irradiação para suprimir as células-tronco do paciente e a ausência de risco da doença enxerto-*versus*-receptor. Entretanto, também são observadas algumas desvantagens como a dificuldade de transdução das células-tronco hematopoiéticas pelo vetor viral (JANEWAY, 2001).

No trabalho de Cavazzana-Calvo et al. (2000), descreveu-se o primeiro protocolo de terapia gênica para o tratamento de SCID-X1. Neste protocolo, células CD34+ foram retiradas da medula óssea, transduzidas *ex vivo* com um vetor retroviral MFG derivado do MoMLV contendo o gene *IL2RG* e reintroduzidas em dois pacientes. A medicação convencional foi descontinuada e os pacientes apresentaram uma resposta imune satisfatória após o tratamento com a terapia gênica.

Após o estudo preliminar de Cavazzana-Calvo, outras 5 crianças foram tratadas pelo mesmo grupo (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2002). Dessas crianças, 4 apresentaram melhoras significativas evidenciadas pela resposta satisfatória do sistema imune, sendo que uma criança não respondeu ao tratamento e por isso, neste paciente, se fez necessário um transplante halogênico de células-tronco.

Com a continuação dos trabalhos realizados pelo grupo francês, 10 crianças foram tratadas, sendo que uma criança não respondeu ao tratamento e 9 apresentaram melhoras significativas evidenciadas pela resposta satisfatória do sistema imune. Destas 9 crianças, 7 mantiveram o sistema imune funcional após 7,5 anos do tratamento e as outras 2 tiveram o sistema imune apenas parcialmente corrigido (CAVAZZANA-CALVO et al., 2007).

Desafortunadamente, 4 das crianças tratadas pelo grupo francês desenvolveram leucemia linfóide aguda de células T (T-LLA). Estas crianças receberam terapia convencional para T-LLA, e 3 delas responderam bem ao tratamento, com eliminação da T-LLA e ainda mantiveram o sistema imune beneficiado com a terapia. Entretanto a quarta criança veio a falecer (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2008).

Estudos similares foram realizados por Gaspar et al. (2004), utilizando uma terapia baseada no vetor pseudotipado com o envelope do vírus da leucemia dos símios (GALV - *gibbon ape leukemia virus*), ao invés do vetor convencional MLV. Entretanto, apesar dos benefícios obtidos pela maioria dos pacientes tratados neste protocolo, um deles apresentou proliferação clonal das células T e necessitou quimioterapia para controlar a leucemia (HOWE et al., 2008).

O efeito adverso grave relativo à leucemia observada nos pacientes submetidos aos protocolos de terapia gênica para SCID-X1, motivou diversas abordagens para investigar a causa da proliferação clonal linfocitária leucêmica, procurando elencar os fatores que poderiam favorecer a ocorrência da LLA (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003).

O surgimento de leucemia nesses pacientes levantou a hipótese de que o próprio gene terapêutico, o *IL2RG*, poderia estar favorecendo a proliferação clonal das células transduzidas, podendo ser também o responsável pela patologia, pois através do receptor de células T (TCR) ocorre a ativação do sinal de transdução mediador de tirosina-quinase, JAK3, que está envolvido em processos de crescimento celular, desenvolvimento e diferenciação (PIKE-OVERZET et al., 2007). Assim, entender a contribuição do transgene em possíveis efeitos adversos e sua interação com o vetor, é de grande importância para o avanço da tecnologia de transferência gênica através de vetores virais.

Testes para verificar a qualidade do vírus utilizado foram realizados, a fim de confirmar a ausência de partículas recombinadas replicante-competentes. Os clones de célula T de LLA foram analisados para verificar o sítio de integração do vetor retroviral. Na análise foi observada a inserção do vetor nas proximidades do promotor do proto-oncogene *LMO2*, o que pode ocasionar uma expressão aberrante de *LMO2*. Esta proteína interage com complexos de multi-proteínas, que afetam a diferenciação celular durante a hematopoiese (PIKE-OVERZET et al., 2007). Dessa forma, concluiu-se que a inserção mutacional do vetor retroviral é um risco existente, e que poderia ser favorecida pela baixa idade das crianças, dado a excepcional capacidade proliferativa hematopoética neonatal (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003).

No entanto, a superexpressão de *LMO2* não é suficiente para induzir T-LLA. Entre a ativação de *LMO2* e o aparecimento da leucemia, existe um grande período

de latência durante o qual outras mutações genéticas são adquiridas para o surgimento da tumorigênese. Entre elas foi estudada a influência da deleção de *Arf* e mutações em *Notch1* em um modelo animal com fenótipo SCID-X1 (TREANOR et al., 2011). Foi verificado que a soma destes fatores leva à aceleração dos eventos linfoproliferativos.

A T-LLA ocorre em timócitos em desenvolvimento e é caracterizada clinicamente pelo aumento nas contagens de células brancas (hiperleucocitose), aumento do número de células blásticas e aumento dos linfonodos do mediastino, com a tendência de se espalhar para o fluido cérebro-espinhal. Mais da metade dos pacientes com T-LLA apresentam mutações na via de *Notch1*, cuja cascata de sinalização regula diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação e sobrevivência. Deste modo, *Notch1* tem se mostrado essencial no desenvolvimento da linhagem de células T, sobrevivência do timócito e proliferação das células T progenitoras (KOCH; FREDDY, 2011).

Outras anomalias em pacientes com T-LLA são as mutações sem sentido nos receptores de células T (TCR): TCRA, TCRD ou TCRB. Estes receptores são envolvidos com genes que codificam fatores de transcrição, e seu mau funcionamento causa doenças malignas de células T. Além da indução de *Notch1*, a indução de *TAL1*, *LYL1*, *LMO1*, *LMO2*, *TLX1* e *TLX3*, e inativação de *CDKN2*, são as causas mais predominantes de T-LLA (RAIMONDI, 2007).

Com o conhecimento de que *LMO2* é um oncogene comumente envolvido com o desenvolvimento de T-LLA em humanos e de que a superexpressão deste gene pode ser causada tanto por translocações cromossômicas quanto por mutagênese insercional, como evidenciado pelo surgimento de leucemia nos pacientes de terapia gênica para SCID-X1, estudos relacionados com o melhor entendimento de como o desenho do vetor pode influenciar o surgimento das leucemias é um passo essencial para o avanço da terapia gênica.

Além de verificar a influência do vetor no processo de linfoproliferação, o gene terapêutico também foi objeto de estudo, conforme descrito por Woods et al., 2006a. O gene *IL2RG* foi investigado através de ensaios em modelo animal da doença de SCID. O ensaio consistiu em analisar o efeito da utilização de vetores lentivirais carregando o gene *IL2RG*, *LMO2*, ou GFP (gene repórter da proteína fluorescente

verde). Neste caso, células progenitoras foram transduzidas *ex vivo*, e posteriormente reimplantadas em animais receptores. Observou-se que 33% dos animais desenvolveram eventos linfoproliferativos leucêmicos, associados à utilização do vetor codificando *IL2RG*, 100% codificando *LMO2* e nenhum caso com o repórter GFP.

Entretanto, a contribuição do *IL2RG* para a leucemia nos casos de SCID-X1 é um assunto controverso. Em resposta a essa publicação, Pike-Overzet et al. (2006) argumenta que o gene *IL2RG* nunca foi descrito como um oncogene nas T-LLA humanas, além do fato de que nos pacientes de SCID-X1 tratados, a expressão do gene se encontrava dentro dos parâmetros normais e não foi observada ativação de JAK3. Os autores utilizaram uma cultura híbrida de timo fetal de humanos e camundongos transduzidas com *LMO2* e *IL2RG* e verificaram que a transdução com *LMO2* afeta severamente o desenvolvimento de células T enquanto que a transdução com *IL2RG* não afeta o desenvolvimento dessas células.

Ainda em debate à afirmação da possível responsabilidade do gene terapêutico nos eventos de leucemia, Thrasher et al. (2006) comentam que esta interpretação é exagerada, uma vez que até o momento não havia sido descrito na literatura tal acontecimento, enquanto que já era conhecido que a inserção mutacional leva à ativação de proto-oncogenes como o *LMO2*. Além disso, os autores contestam a metodologia de Woods et al. Para verificar a toxicidade do *IL2RG*, Thrasher et al. (2006) transduziram camundongos com vetores gamaretrovirais e lentivirais. Os camundongos foram acompanhados por 12 meses e não desenvolveram tumores.

Outra questão abordada foi se o perfil da doença tratada teria alguma influência na toxicidade do vetor, uma vez que nos protocolos de SCID-ADA não foram observadas anormalidades hematológicas, embora a frequência de inserção próximas do *LMO2* fosse menor. Neste sentido, Sorrentino (2010) verificou que camundongos transplantados com células SCID-X1 transduzidas com um vetor lentiviral contendo um promotor fraco (EF-1 α), tinham maior propensão a formar tumores do que os animais transplantados com células não transduzidas. A análise molecular dos tumores desses animais não mostrou evidências de ativação de oncogenes ocasionada pela inserção do vetor, mas foi observada uma mutação adquirida no gene *Notch1*. Os resultados contrastam com os resultados clínicos para

SCID-X1, nos quais foi observada a mutagênese insercional, com uma possível preferência por local de inserção, mostrando que o fenótipo do SCID-X1 foi importante para o desenvolvimento da leucemia.

No trabalho de Shou et al. (2006), camundongos selvagens foram transplantados com células de medula óssea retiradas de animais que possuíam os genes γc e supressor de tumor *Arf* deletados. Antes do transplante as células foram transduzidas com vetores retrovirais e os animais receptores receberam doses letais de irradiação. Os animais foram acompanhados durante 1 ano e um alto índice de desenvolvimento de linfomas foi observado. O mesmo não ocorreu, quando células contendo o *Arf* deletado, mas com γc intacto, foram transduzidas e transplantadas. Este trabalho mostra que o fenótipo SCID-X1 é necessário para um alto risco de tumorigênese.

Assim, alertou-se a importância de se considerar diversos fatores que poderiam estar contribuindo para aumentar as chances de um efeito adverso. Em particular, a fisiologia da doença, a atividade do gene terapêutico e a ativação de um oncogene como consequência de mutagênese insercional, são fatores críticos que merecem mais estudo. Os protocolos clínicos apresentados aqui mostram que o vetor retroviral pode ser utilizado na clínica com sucesso e sem efeitos colaterais (SCID-ADA), ou com graves efeitos adversos devido à expansão clonal (SCID-X1) ou com efeito intermediário, com expansão clonal que não provocou malefício para o paciente (X-CGD).

1.3 Perfil de integração retroviral

Como descrito anteriormente, a inserção do provírus no genoma do hospedeiro pode ocasionar a expressão de um oncogene. Por este motivo, o estudo da integração viral torna-se crítico. Sabe-se que o perfil de integração dos retrovírus ocorre de maneira relativamente aleatória no genoma da célula, de forma que cada célula transduzida contém uma inserção viral em uma localização diferente. Além disso, a integração viral é favorecida em regiões onde a cromatina está aberta e genes estão sendo ativamente transcritos.

A presença dos fortes *enhancers* no LTR viral pode levar à trans-ativação de genes celulares localizados nas proximidades do sítio de integração. Como consequência da ativação de genes celulares relacionados com o controle do ciclo celular (proto-oncogenes) e posterior acúmulo de mutações, ocasionado pelo estímulo descontrolado de crescimento, a célula pode sofrer uma transformação maligna.

Esta característica dos retrovírus tem se tornado uma enorme preocupação para a terapia gênica, devido ao surgimento de efeitos adversos relacionados com ativação de proto-oncogenes em alguns protocolos clínicos que utilizaram esses vetores como veículo de entrega do transgene. Entretanto, deve-se destacar que a capacidade que os retrovírus possuem de se integrar no genoma é também sua característica mais atrativa para a terapia gênica, uma vez que permite a correção do defeito genético de forma sustentada.

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de estudar o perfil de integração retroviral (SHRÖDER et al., 2002; WU et al., 2003; MITCHEL et al., 2004; DERSE et al., 2007; AMBROSI et al., 2011). Esses trabalhos evidenciam que os vetores gamaretrovirais (MLV) possuem preferência por integração próxima às regiões de início de transcrição, que estão relacionadas com as regiões regulatórias de fatores de transcrição, as ilhas CpGs. Por outro lado, mostram que os vetores lentivirais têm uma maior preferência por regiões transcricionais ativas, podendo o provírus integrado ser encontrado ao longo de toda unidade transcricional, com menos preferência pelas extremidades 5' terminais. Em contrapartida, os spumavírus parecem ter uma preferência de integração fraca por estes locais de inserção, mostrando um perfil bem mais aleatório do que os lentivírus e gamaretrovírus. Além disso, a eficiência de integração dos gamaretrovírus parece estar relacionada com as regiões da cromatina hipersensíveis à DNase I, enquanto que a integração lentiviral é desfavorecida em regiões repetidas do centrômero (DELELIS, 2009).

Assim, Derse et al. (2007) agrupou os retrovírus de acordo com suas preferências por local de integração, sendo agrupados em conjunto os vírus da imunodeficiência simíia (SIV), os vírus da imunodeficiência humana (HIV), os vírus da leucemia murina (MLV), os vírus espumosos (spumavírus - FVs), os vírus

linfotrópicos de células T humanas do tipo I (HTLV-1) e os vírus da leucose/sarcoma aviário (ASLV).

A análise do perfil de integração observado em diversos estudos pré-clínicos e em protocolos clínicos foram avaliados (DEICHMANN et al., 2011). Os resultados mostraram que mais de 40% de todas as inserções se encontravam agrupadas em uma mesma região genômica. Neste trabalho, foram descritos 8 genes como alvos frequentes de integração (*BCL2*, *RBM34*, *PCBP1*, *PRDM16*, *MDS1/EVI1*, *LMO2*, *CCND2* e *SETBP1*), sendo que 5 deles já foram associados com casos de expansão clonal em protocolos clínicos. Em outro estudo Wang et al. (2012) mapearam os sítios de integração em populações de células progenitoras de 8 pacientes tratados para SCID-X1, por terapia gênica utilizando um vetor gamaretroviral. Foi observada uma grande frequência de integração em locais próximos a genes envolvidos com a ativação de leucócitos, diferenciação de linfócitos, apoptose, controle do ciclo celular e transdução de sinal.

Os efeitos adversos relacionados com a mutagênese insercional observados nos protocolos clínicos que utilizaram o vetor retroviral, mostraram a importância da análise dos sítios de inserção do vetor retroviral. Para este fim, métodos de ligação mediada por PCR foram desenvolvidos, permitindo a detecção simultânea de diferentes sítios de integração em uma amostra, de maneira sensível e específica. Dentre estes métodos encontram-se a amplificação linear mediada por PCR (LAM-PCR), ligação mediada por PCR (LM-PCR) e marcação exponencial de fragmentos por PCR (EFAM-PCR), sendo que a LAM-PCR e LM-PCR são as mais utilizadas (LAUFS et al., 2010).

De forma resumida, esses métodos são baseados no sequenciamento da região genômica que flanqueia o provírus integrado, através da digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, gerando extremidades abruptas que são utilizadas para a ligação de adaptadores. Empregando *primers* específicos à região LTR viral e aos adaptadores, uma primeira amplificação é realizada, seguida de uma reação de *nested* PCR, clonagem, sequenciamento e mapeamento da sequência correspondente no genoma (Figura 6). Entretanto, esses métodos se diferenciam quanto à quantidade inicial de DNA que é utilizada, passos de digestão do DNA, adaptadores, polimerases, e clonagem do produto de PCR (LAUFS et al., 2010).

Figura 6 - Representação da LAM-PCR (A), LM-PCR (B) e EFRAM-PCR (C).

Fonte: LAUFS et al., 2010.

Embora estejam entre os melhores protocolos disponíveis para o estudo da integração proviral, estes métodos envolvem muitas etapas experimentais sendo bastante trabalhosos. Além disso, são métodos apenas qualitativos e pouco sensíveis para mostrar a dinâmica da população celular, servindo apenas para a identificação do local de inserção e da presença do vetor. De acordo com Biasco et al. (2012), mesmo em combinação com sequenciamento larga escala a técnica de LAM-PCR, não pode ser considerada representativa da contribuição clonal de cada integração viral em uma amostra. Acredita-se que o número e a intensidade de bandas em um gel de LAM-PCR estejam relacionados com a contribuição clonal dos sítios de integração, entretanto esta afirmação não é correta uma vez que este número pode variar de acordo com a quantidade de sítios de restrição existentes no

genoma para uma enzima de restrição em particular. Desta forma, um sítio de integração pode ser mais facilmente amplificado devido à sua proximidade com o sítio de restrição. Recentemente foi verificada uma discrepância quanto à frequência dos sítios de inserção observados através de pirosequenciamento com relação aos resultados obtidos por PCR quantitativo projetado para os mesmos sítios de integração (BIASCO et al., 2012).

Assim, o aprimoramento e o desenvolvimento de tecnologias que possam ser utilizadas na análise da inserção retroviral e sua relação com a expansão clonal é ainda um desafio.

1.4 Código de barras como ferramenta para medida quantitativa da expansão clonal

O quadro de leucemia observado nos pacientes submetidos ao protocolo de SCID-X1 (CAVAZZANNA-CALVO et al., 2000) foi atribuído à proliferação clonal causada por mutagênese insercional retroviral, em sinergismo com outros possíveis fatores, incluindo a fisiologia da doença, a atividade do gene terapêutico e a indução do oncogene *LMO2* (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003; PIKE-OVERZET et al., 2006; THRASHER et al., 2006; SHOU et al., 2006; WOODS et al., 2006a; PIKE-OVERZET et al., 2007; TREANOR et al., 2011). Neste trabalho, descrevemos uma abordagem inovadora que permitirá avaliar quantitativamente, a clonalidade de células transduzidas com vetores lentivirais.

A metodologia experimental deste trabalho fundamenta-se na inserção de marcadores randômicos nos vetores lentivirais, denominados “código de barras”. O conjunto desses vetores marcados constitui uma biblioteca viral, onde as partículas virais apresentam marcações individuais distintas (Figura 7), fazendo com que as células transduzidas com a biblioteca lentiviral, também possuam marcações distintas umas das outras.

Figura 7 - Representação esquemática do conceito do código de barras e seu uso para quantificação da complexidade de uma população.

Neste exemplo, o código de barras contém uma posição variável (Y=C ou T) flanqueada pelas bases AG. A inserção do código de barras no vetor viral cria uma biblioteca a ser utilizada na transdução da célula alvo. No início do cultivo, as células teriam marcação aleatória pelo código de barras, ou seja, a população de células teria uma alta complexidade. O sequenciamento do DNA genômico, isolado de uma amostra destas células, deve refletir esta complexidade. Após o cultivo destas células ou transplante no animal receptor, a expansão clonal poderia ocorrer com o passar o tempo, devido ao impacto do vírus, ativação de genes celulares, atividade do transgene ou fenótipo da célula alvo. A perda de complexidade seria revelada no sequenciamento.

FONTE: ZANATTA 2012.

As células marcadas com o código de barras poderão ser monitoradas através da análise do DNA genômico (gDNA) por meio de sequenciamento e para verificação da variabilidade populacional em função do tempo. Dessa forma, o acompanhamento da mudança na complexidade dessa população de células por meio do código de barras pode permitir a identificação de uma possível expansão clonal.

Uma população policlonal é representada pela população de células transduzidas, nas quais a complexidade inicial representa o perfil aleatório de marcação com o código de barras, então neste caso, o sequenciamento do código de barras deve revelar uma mistura aleatória, com grande variabilidade. Com o passar do tempo a proliferação das células poderia sofrer os efeitos da presença do vírus, da ativação de genes celulares, da atividade do transgene, ou uma

combinação destes fatores, resultando na redução da complexidade populacional, o que reflete em uma leitura mais específica no sequenciamento do código de barras. Ou seja, a expansão clonal significa uma redução no perfil aleatório da população com o surgimento de um ou alguns clones específicos.

O código de barras contém posições que foram chamadas de variáveis por serem preenchidas cada uma por uma base aleatória, dentre duas opções distintas. Foi considerado que o cromatograma gerado pelo sequenciamento pode ser interpretado não só pela ordem das bases, mas também quantitativamente, utilizando-se o valor numérico atribuído à área dos picos. Neste cenário, cada posição variável sequenciada no código de barras pode gerar dois picos sobrepostos no cromatograma, permitindo a avaliação quantitativa das áreas sob as curvas.

Na população policlonal, os dois picos seriam iguais em cada posição do código de barras, sendo que a probabilidade de ter uma base ou outra seria 50%, as áreas das curvas seriam iguais e a soma dos picos seria 100%. No caso de haver a proliferação de uma população clonal, esperamos observar o aumento de um pico (área tendendo a 100%) e a redução do outro (área tendendo a zero). Por exemplo, supondo que uma região variável pudesse conter a base C ou a base T, a população inicial com alta complexidade e perfil aleatório, seria representada por 50% das células contendo a base C nessa posição e 50% contendo a base T. A análise do cromatograma gerado pelo sequenciamento mostraria dois picos iguais e sobrepostos. No caso de expansão clonal, uma destas bases estaria super-representada e no cromatograma seria observado o aumento de um pico com relação ao outro.

A informação gerada com o cromatograma será utilizada para estimar a complexidade da população e mensurar o impacto do vetor viral na expansão clonal das células transduzidas. Esta metodologia permitirá determinar quantitativamente o potencial genotóxico de um vetor contendo um cassete de expressão, possibilitando o desenvolvimento de construções mais seguras, a fim de evitar eventos proliferativos desencadeados pela mutagênese insercional.

O modelo de análise que utiliza dados do cromatograma, provenientes de sequenciamento, é descrito na literatura como uma ferramenta para investigar a

presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (HATTORI et al., 1993; VERSLUIS et al., 1993; KWOK et al., 1994). Esta metodologia tem sido estudada e aprimorada buscando-se minimizar artefatos relativos à técnica de sequenciamento utilizando-se de algoritmos normalizadores (PARKER et al., 1995). O programa *PolyPhred* (NICKERSON et al., 1997), é um exemplo de ferramenta aprimorada para a detecção de polimorfismos por sequenciamento, que utiliza o rotulamento das bases gerado pelo programa *Phred* e adiciona um algoritmo para normalizar altos picos, analisar ruídos e quantificar as bases heterozigotas. O programa identifica a base polimórfica através de uma redução predita de ~50% do pico de uma base homozigota. O *PolyPhred* permite discriminar variações nas sequências de DNA com uma precisão acima de 90%.

O código de barras também é descrito na literatura para identificar clones retrovirais de bibliotecas de RNAi (BERNS et al., 2004). No trabalho de Berns et al. (2004), células transduzidas com vetores da biblioteca que apresentaram o fenótipo esperado foram utilizadas para extração de DNA genômico e amplificação da região do código de barras. A seguir os produtos de PCR são hibridizados em matrizes contendo oligonucleotídeos (*microarrays*), para serem identificados e quantificados.

São incorporadas aqui duas ferramentas tecnológicas previamente descritas na literatura e validadas, para desenvolver uma metodologia inovadora por sua simplicidade e rapidez que será aplicada no estudo de clonalidade de células transduzidas com vetores retrovirais. O código de barras é uma ferramenta versátil que permite a construção de uma biblioteca de vetores contendo marcações distintas e passíveis de identificação (BERNS et al., 2004). A análise da amplitude dos picos do cromatograma de sequenciamento também é uma ferramenta descrita e validada que permite caracterizar polimorfismos (NICKERSON et al., 1997). Desta forma, aliando-se ambas as tecnologias, poderemos analisar quantitativamente uma população celular transduzida com a biblioteca, sem a necessidade do isolamento de clones, de forma ágil e simplificada.

2 OBJETIVOS E METAS

O alvo deste projeto consiste em desenvolver um sistema para detectar e quantificar mudanças na complexidade populacional de células transduzidas com vetores lentivirais. O projeto foi subdividido nos seguintes objetivos específicos:

1. Elaboração e teste da sequência de bases constituintes do código de barras;
2. Construção de vetores lentivirais contendo o código de barras e genes de interesse;
3. Avaliação do código de barras através da quantificação de populações celulares transduzidas e mantidas em cultura;
4. Avaliação quantitativa de células-tronco hematopoiéticas (CTH) após transdução com vetor lentiviral portador do código de barras e o gene de interesse (*IL2RG* ou *LMO2*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Concepção do código de barras

Para avaliar a nova tecnologia proposta, dois oligonucleotídeos protótipos nomeados **CTR** e **AGY**, foram sintetizados (Integrated DNA Technologies) para a montagem de bibliotecas testes. O óligo **CTR** contém a sequência **5'-G GAA GAT CTT CCT GAT TGA TTG ACT CTR CTR CTR CTR CTR NAN TGA CTG ACT GAC CGG AAT TCC GG-3'** (onde R pode ser as bases A ou G), e o óligo **AGY** a sequência **5'-G GAA GAT CTT CCT GAT TGA TTG AGY AGY AGY AGY AGY NAN TGA CTG ACT GAC CGG AAT TCC GG-3'** (onde Y pode ser as bases C ou T). Os oligos são flanqueados por sequências de *EcoRI* na extremidade 5' e *BglII* na extremidade 3' para facilitar a inserção no vetor plasmidial. Em cada um destes modelos existem 32 sequências possíveis na região variável (CTR ou AGY) e mais 16 sequências da região NAN, possibilitando um total de 256 sequências únicas.

O código de barras utilizado na construção final da biblioteca foi nomeado **CB** (Integrated DNA Technologies) e possui a sequência **5'-TGA CTC GAG TGA TTG ATT GAA GYA TMT AYA GWG TRT AKA CWG TMT ASA CRT ANN NNN NCT GAC TGA CTG TCT AGA CTA C-3'**. As bases nucleotídicas que podem ocupar cada uma das posições contendo as bases degeneradas são descritas no Quadro 3. Para inserção no vetor plasmidial, o oligonucleotídeo sintetizado é flanqueado por sequências de *XhoI* na extremidade 5' e *XbaI* na extremidade 3'. No total, tem-se 10 posições variáveis que podem apresentar 2 possibilidades de bases, mais 6 posições N que podem apresentar 4 possibilidades de bases, de forma que nesta sequência existam cerca de 10^3 possibilidades de arranjos combinatórios.

Quadro 3 - Nomenclatura das bases de especificidade incompletas, ou degeneradas, em sequências de nucleotídeos. Determinação pelo Comitê de Nomenclatura da União de Bioquímica Internacional (NC-IUB)

Símbolo	Descrição	Bases representadas			
A	<u>A</u> denosina	A			
C	<u>C</u> itidina		C		
G	<u>G</u> uanina			G	
T	<u>T</u> imidina				T
W	<u>W</u> weak	A			T
S	<u>S</u> trong		C	G	
M	<u>M</u> ino	A	C		
K	<u>K</u> eto			G	T
R	P <u>u</u> rina	A		G	
Y	Py <u>r</u> imidine		C		T
N	<u>A</u> nybase	A	C	G	T

Durante a elaboração do código de barras, cuidados foram tomados para que não se formassem sítios de iniciação ATG, para que o oligonucleotídeo apresentasse um conteúdo de G/C equilibrado e para que as sequências fixas incluíssem o códon TGA (*stop*) nas três fases de leitura e nas duas extremidades. Além disso, foram inseridas bases fixas entre as bases variáveis, para evitar a ocorrência de duas bases sequenciais iguais e permitir a dedução da interferência no pico adjacente (PARKER et al., 1995) e as bases fixas também foram combinadas para evitar a formação de ilhas CpG. Na extremidade final do óligo foram inseridas posições N, que podem ajudar a definir a complexidade, mas que em princípio não entram nos cálculos quantitativos.

3.2 Construção dos vetores de transferência lentiviral

As construções lentivirais foram derivadas do vetor Lego-iG (Weber *et al.*, 2008), que foi gentilmente cedido pelo Dr. Kristoffer Weber (University Medical Center, Hamburg, Alemanha). Esse vetor foi modificado através da retirada do promotor U6, que dirige a síntese de RNA de interferência, por digestão com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hpa*I. Após tratamento com T4 polimerase para obter extremidades cegas, o vetor digerido foi isolado em gel de agarose 1% utilizando o *Ezra Gel Extraction Kit* (OMEGA bio-tek). A junção das extremidades abertas gerou um novo sítio de *Xba*I. Este vetor foi nomeado Lego-iGΔU6 (Figura 8) e posteriormente foi utilizado para a montagem dos vetores Lego-liGΔU6 (que codifica o cDNA para *IL2RG*) e Lego-LiGΔU6 (que codifica o cDNA para *LMO2*).

Figura 8 - Representação esquemática dos vetores lentivirais.

Os cDNAs de interesse, *IL2RG* e *LMO2*, foram inseridos no vetor Lego-iGΔU6 nos sítios de *Eco*RI e *Not*I. O código de barras (CB) foi inserido nos sítios de *Xho*I e *Nhe*I.

FONTE: ZANATTA, 2012.

O vetor Lego-iGΔU6 foi previamente digerido com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Not*I, isolado em gel de agarose 1% com o *Ezra Gel Extraction Kit* (OMEGA bio-tek), de forma a estar pronto para receber os cDNAs de interesse.

A região codificante do cDNA para *LMO2* de *Mus musculus* foi amplificada a partir de um vetor pCMV-SPORT6, contendo a sequência desejada (OpenBiosystems), utilizando o *primer* contendo a sequência 5'-AAAGAATCCCCCTCCCCAATGTCCTCGGCC-3', que contém sítio de *EcoRI* em sua sequência, e o *primer* 5'-TTTGCGGCCGCGTCTTCACTGAACACCTCC-3', que contém sítio de *NotI*. Esses sítios foram inseridos na sequência do cDNA após a amplificação e o produto desta amplificação foi purificado e clonado em vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Uma vez inserido no vetor intermediário, o cDNA para *LMO2*, foi retirado através de digestão com as mesmas enzimas descritas acima para sua inserção no vetor final, que foi nomeado Lego-LiGΔU6

A região codificante do cDNA para *IL2RG* de *Mus musculus* também foi obtida a partir de um vetor pCMV-SPORT6, sendo utilizados na reação de amplificação os *primers* 5'-TAAGAATTCAGAGCAACCACCATGTTT-3' e 5'-AAAGCGGCCGCGGCAGTGAGCATTGGATCC-3', que possuem em suas sequências sítios de *EcoRI* e *NotI*, respectivamente. Esses sítios foram inseridos na sequência do cDNA após amplificação e foram utilizados para a clonagem no plasmídeo lentiviral, sem clonagens intermediárias. O vetor foi nomeado Lego-LiGΔU6.

3.3 Construção das bibliotecas

3.3.1 Síntese da dupla fita do código de barras

Para a construção das bibliotecas, inicialmente foi realizada a síntese da dupla fita do oligonucleotídeo contendo o código de barras. Foram adicionados à reação 0,15 nmol do óligo e 0,6 nmol do *primer* (5'-CCTGAATTCT-3'), tendo a reação sido aquecida a 95 °C por 5 min. Após este tempo, esperou-se que a reação esfriasse até 60 °C para que fossem adicionadas 1 U de T4 polimerase (New England Biolabs), 1X NEBuffer 2, 1X BSA e 100 μM dNTPs. A reação se deu a 37 °C por 1 hora, seguindo-se de precipitação com etanol. O óligo dupla fita recém-sintetizado foi submetido à digestão com as enzimas de restrição apropriadas, por 2

h a 37 °C, após a qual nova precipitação por etanol foi realizada.

3.3.2 Clonagem das bibliotecas protótipo (CTR e AGY)

Após síntese da dupla fita, a mistura do óligo protótipo foi clonada no plasmídeo pBluescript KS(+)^{II} (pBS; Stratagene), previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e purificado em gel de agarose 1% com o *Ezra Gel Extraction Kit* (OMEGA bio-tek).

O plasmídeo e o óligo foram submetidos à reação de ligação com T4 DNA ligase (Biolabs). A reação de ligação para as bibliotecas protótipos foi realizada em 20 µl, utilizando uma proporção molar vetor-inserto de 1:3 e deixada *overnight* em banho a 16 °C. A extremidade do vetor contendo o sítio de *BamHI* e a extremidade do oligo *BglII* são compatíveis, ocorrendo ligação coesiva e perda dos sítios de restrição. Assim, o produto de ligação pode ser digerido com *BamHI* antes da transformação bacteriana, visando reduzir a probabilidade de obter clones falso positivos, ou seja, sem o inserto.

Após ligação foi realizada a digestão com *BamHI* e a solução foi precipitada, ressuspendida em 10 µl e apenas 5 µl utilizados na transformação em 50 µl de bactéria eletrocompetente. Após a clonagem, procedeu-se a transformação em bactérias XL-Gold eletrocompetentes, a suspensão bacteriana foi plaqueada e alguns clones isolados para a realização dos experimentos posteriores.

3.3.3 Clonagem da biblioteca CB nos vetores lentivirais

Para a biblioteca CB, após síntese da dupla fita, a mistura do óligo foi clonada no vetor Lego-iGΔU6, previamente digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *NheI* e purificado em gel de agarose 1% com o *Ezra Gel Extraction Kit* (OMEGA bio-tek).

Após digestão do vetor, foi realizada a reação de ligação com T4 DNA ligase (Biolabs). A ligação entre o sítio de *NheI* contido no vetor com o sítio *XbaI* contido no

óligo, é possível, entretanto, leva à perda dos sítios de restrição, o que possibilita a eliminação de clones falso positivo, através da digestão do vetor com *NheI*, após a ligação. O vetor e o inserto foram submetidos à reação de ligação com T4 DNA ligase (Biolabs), sendo que para a biblioteca CB, foram realizadas 25 reações de ligação de 20 µl cada. Cada reação mantinha uma concentração molar na proporção vetor-inserto de 1:5 e foram deixadas overnight em banho a 16 °C. Em seguida, fez-se a digestão com *NheI* e, após terem sido combinadas em um único tubo, as ligações foram precipitadas e ressuspendidas em 10 µl.

Para a transformação foram utilizados 5µl da ligação em 100µl de bactéria eletrocompetente. A suspensão bacteriana foi dividida em duas, sendo parte utilizada para fazer inóculo para uma preparação da biblioteca plasmidial, utilizando o EndoFree Plasmid Maxi Kit (QUIAGEN), e a outra parte semeada em placa, para contagem e isolamento de clones. Às construções contendo esta biblioteca, deu-se o nome de Lego-CB-iGΔU6, quando inserido no vetor sem cDNA, Lego-CB-liG, quando no vetor contendo o cDNA para IL2RG e Lego-CB-LiG, quando no vetor contendo o cDNA para LMO2.

3.4 Experimentos *in vitro* com as bibliotecas

3.4.1 Avaliação do código de barras protótipo (CTR e AGY)

Para análise das bibliotecas protótipos CTR e AGY, os DNAs plasmidiais de clones individuais ou da biblioteca como um todo, obtidos após transformação bacteriana foram diluídos na concentração de 10 ng/µl e, ou uma mistura de dois clones, ou uma mistura de um clone com a biblioteca, foi realizada. As misturas basearam-se nas proporções 1:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9 e 0:1, obedecendo sempre à concentração final de 10 ng/µl. O código de barras protótipo foi amplificado utilizando os *primers* M13, a partir de 10 ng da mistura de clones, ou de clone com biblioteca. O produto de PCR foi purificação e 10 ng foram utilizados na reação de sequenciamento. Procedeu-se a análise do sequenciamento para validar a metodologia de detecção proposta, observando-se o erro percentual com relação à

concentração plasmidial determinada por espectrometria, contra a concentração determinada pela análise das amplitudes dos picos do cromatograma do sequenciamento. Os clones isolados também foram sequenciados para verificar a variabilidade do código de barras.

3.4.2 Avaliação da influência do DNA genômico para a análise

Em outro ensaio os plasmídeos contendo códigos de barras conhecidos das bibliotecas CTR e AGY foram diluídos em gDNA obtido a partir de uma linhagem celular humana de fibrosarcoma (HT1080). Para isto, 1 ng do plasmídeo selecionado foi diluído em 1 µg de gDNA, obtendo-se uma concentração final de 0,1 ng/µl do plasmídeo em 100 ng/µl de gDNA, correspondendo a uma diluição 100 vezes maior do que a utilizada nos experimentos realizados anteriormente. As amostras foram assim diluídas a fim de verificar se seria possível detectar a presença de um código de barras mesmo em baixa concentração. Usando dois plasmídeos diferentes em solução com gDNA, foram feitas diluições dos plasmídeos na proporção de 9:1, 3:1, 1:1, 1:3 e 1:9, e as amostras submetidas a sequenciamento, como controle foi realizado o sequenciamento de plasmídeo sem adição de gDNA.

3.4.3 Avaliação da biblioteca CB em cultura de células

Células NIH-3T3 foram transduzidas com vetor lentiviral contendo uma combinação de códigos de barras correspondendo à biblioteca CB total e com um vetor contendo uma sequência conhecida do código isolada anteriormente. Cada transdução foi realizada independentemente e, após quantificação da população transduzida em citômetro de fluxo, as populações celulares foram semeadas em conjunto formando uma população mista de acordo com a proporção 0:1, 1:9, 1:3, 1:1, 3:1, 9:1 e 1:0. Por exemplo, zero, 100.000, 250.000, 500.000, 750.000 ou 1.000.000 células do clone serão semeadas juntamente com 1.000.000, 900.000, 750.000, 500.000, 250.000 ou zero células, respectivamente, da população mista

previamente transduzida com a biblioteca. Foram feitas coletas de gDNA semanalmente durante 5 semanas para análise de sequenciamento.

3.5 Sequenciamento dos experimentos *in vitro* e análise do cromatograma

As amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR anteriormente à reação de sequenciamento. Para isto, a amplificação por PCR foi executada em uma reação com volume final de 25 µl contendo 1X tampão de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 1 mM de dNTPs, 4% DMSO, 1 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5 pmol dos *primers Forward* e *Reverse* apropriados para cada situação e 100 ng de DNA foram utilizados. A reação foi realizada em termociclador *Thermo Cyclet PTC-225* (MJ Research) sob as seguintes condições: 94°C por 4 min; 25 ciclos: 94 °C por 1 min, anelamento por 1 min (a temperatura de anelamento foi escolhida de acordo com os *primers* utilizados); 72 °C por 2 min e 72 °C por 5 min. Os *primes* são mostrados no Quadro 4.

Quadro 4 - Sequência dos *primers* utilizados no sequenciamento.

<i>Primer</i>	<i>Aplicação</i>	Sequência
M13-20	Sequenciamento CB no vetor plasmidial	TGTAAAACGACGGCCAGTGA
M13 reverse	Sequenciamento CB em vetor plasmidial	GGAAACAGCTATGACCATGA
Lego CB Forward	Sequenciamento CB no vetor lentiviral	GCAGGGGAAAGAATAGTAGA
Lego CB Reverse	Sequenciamento CB no vetor lentiviral	CGGTGACCATCTGTTCTTG
Lego Forward	Sequenciamento dos cDNAs clonados	CTGCTTCTCGCTTCTGTT
Lego Reverse	Sequenciamento dos cDNAs clonados	ATAGACAAACGCACACC
IL2RG(465) Forward	Sequenciamento do cDNA <i>IL2RG</i>	GGCTCCAGAAAATCTAACAC
IL2RG (740) Reverse	Sequenciamento do cDNA <i>IL2RG</i>	AGGCTGGCTCCATTACT

Após amplificação por PCR utilizando os *primers* apropriados para cada situação (Quadro 4), as amostras foram purificadas com o *Ezra Cycle-Pure Kit* (OMEGA bio-tek), quantificadas em *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* (Uniscience), submetidas à reação de sequenciamento com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e sequenciadas em 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em uma mistura com volume final de 10 µl contendo 1,5X tampão de sequenciamento (Applied Biosystems), 1 µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) 5 pmol dos *primers* M13-20 ou M13 *reverse* para a biblioteca protótipo com 10ng de DNA. Para a biblioteca CB foram usados 5 pmol dos *primers* Lego CB *Forward* ou Lego CB *Reverse* com 100 ng produto de PCR purificado. A reação foi realizada em termociclador *Thermo Cycler PTC-225* (MJ Research) sob as seguintes condições: 96°C por 2 min; 35 ciclos: 96 °C por 45 seg, 50 °C por 30 seg e 60 °C por 4 min.

Os dados obtidos do sequenciamento, relativos ao cromatograma, foram processados com auxílio do Dr. Paulo Oliveira, do setor de Bioinformática do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular, InCor, utilizando-se o software *Polyphred*, que fornece um arquivo contendo valores numéricos referentes às áreas das curvas, amplitudes e fatores de normalização das bases detectadas.

A análise das sequências foi realizada a partir desta base de dados, usando os valores numéricos referentes às áreas sob as curvas de cada pico do cromatograma, analisando cada região variável separadamente. Assim, para obter o valor de cada base possível em uma dada região, dividimos o valor numérico de uma base que foi fornecido pelo *Polyphred* pela soma dos valores das duas bases possíveis naquela região. O resultado é um valor em porcentagem relativo a cada base variável do código de barras.

Como as análises, para padronização da metodologia, foram sempre realizadas tendo o conhecimento de pelo menos uma das sequências envolvidas na mistura, após o cálculo da porcentagem de cada base em cada posição variável do código de barras, era realizada a média simples de acordo com as bases presentes na sequência conhecida para obtenção de um valor final referente àquela sequência. O valor da sequência desconhecida era obtido a partir do valor complementar da

sequência conhecida, uma vez que a soma das duas deve ser igual a 100%.

3.6 Produção de estoques virais

Os vetores de transferência foram utilizados para a produção viral, a partir das construções plasmidiais (maxi-preps). Cada vetor foi co-transfectado com os vetores de empacotamento em células HEK293T. Para a transfecção foram utilizados 10 µg do vetor de transferência, 6,5 µg do vetor pMDL-gag/pol RRE, 2,5 µg do vetor pRSVs-REV e 3,5 µg do vetor pCMV-VSVg, para cada placa de 60 mm.

A transfecção do DNA viral foi feita por precipitação com fosfato de cálcio em células HEK293T mantidas em meio DMEM com 10% de soro de bezerro bovino (protocolo adaptado de Naviaux et al, 1996). Foram semeadas, com 24 h de antecedência, 10^6 células da linhagem HEK293 para transfecção em placas 60 mm cm previamente tratadas com gel EIA 0,1%. Os DNAs foram misturados em 250 µl de cloreto de cálcio 0,25 M, e precipitados com a adição de 250 µl do tampão fosfato de sódio/HEPES HBS-2X pH 7,05 (cloreto de sódio 274 mM, HEPES 40 mM, fosfato monoácido de sódio 2,8 mM), sob agitação. A suspensão contendo o precipitado de DNA foi gotejada sobre o meio de cultura das células plaqueadas, seguindo-se incubação por 4 h. Após este período, as células foram submetidas a um tratamento com PBS-1X contendo 15% de glicerol (choque de glicerol) durante 3 min, lavadas com PBS-1X e, a seguir, adicionou-se novamente às células meio DMEM com 10% de soro bovino. Vinte e quatro horas após o início da transfecção as culturas tinham o meio coletado e ultracentrifugado a 110.000 g durante 90 min. Após ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* viral ressuspensionado em *Hank's salt solution* (HBSS), mantido a 4 °C por 16 h, aliquoteado e armazenado a -70 °C. O meio das culturas era repostado e depois de outras vinte e quatro horas era novamente coletado, ultracentrifugado, ressuspensionado e armazenado a -70 °C.

As produções foram avaliadas através da quantificação da expressão do gene marcador GFP contido nos vetores. Para isto 5×10^4 células NIH-3T3 foram plaqueadas em placas 3,5 cm. Após 24 h as células foram transduzidas com a

quantidade desejada do vírus, na presença de polibreno (8 µg/ml). Após 48 h essas células era preparadas para análise por citometria de fluxo.

3.7 Análise por citometria de fluxo

As células analisadas foram tripsinizadas, centrifugadas a 300 g por 5 min, fixadas em PFA 4% e armazenadas a 4 °C. Para a análise por de citometria de fluxo (FACS SCALIBUR, Becton Dickinson-EUA), as células foram lavadas em PBS-1X, centrifugadas a 300 g por 5 min e ressuspensas em PBS-1X. A análise foi realizada com o auxílio do software CellQuest (Becton Dickinson, EUA), avaliando a porcentagem de células transduzidas e o nível de expressão, levando em consideração a intensidade média das células transduzidas.

3.8 Imunofluorescência (IMF) para detecção de *LMO2*

Células NIH-3T3 foram semeadas em lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços com $2,5 \times 10^4$ células por poço. A placa foi incubada a 37 °C por 24 h e, após este período, as células foram transduzidas com o vetor Lego-LiGΔU6 usando um MOI de 10 na presença de polibreno (8 µg/ml). As células foram preparadas para o ensaio de IMF 48 h após a transdução.

No preparo para IMF, as células foram lavadas com PBS-1X, fixadas com PFA 4% e lavadas novamente com PBS-1X. Em seguida, as células foram permeabilizadas com PBS-1X + nonidet p40 0,1%, por 30 min a 37 °C, lavadas com PBS-1X e bloqueadas com PBS-1X + albumina 1%, para evitar a interação não específica do anticorpo, este passo procedeu-se a 37 °C por 30 min. Após, as células foram lavadas com PBS-1X, incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-*LMO2* produzido em coelho (abcam - ab72841) diluído em PBS-1X + albumina 1%, em uma proporção 1:100, por 1,5 h a 25 °C. Após o período de incubação, o anticorpo foi lavado com PBS-1X. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 555 anti-IgG de coelho produzido em cabra (Invitrogen) diluído em PBS-1X por 45 min a 25 °C. As células foram mais uma vez

lavadas com PBS-1X seguindo-se incubação com *Hoechst* 33258 (20 µg/ml) por 30 min a 25 °C. Após a lavagem final com PBS-1X, as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerol 50%.

3.9 Detecção de *IL2RG* por citometria de fluxo

Para determinar a expressão de γc em células transduzidas com o vetor contendo o gene *IL2RG*, 1×10^5 células CHO (Linhagem celular derivada do ovário do hamster Chinês) foram semeadas em placa de 6 poços, incubadas a 37 °C por 24 h e transduzidas durante 8 h em meio mínimo com o vetor Lego-iGΔU6 ou com o vetor Lego-liGΔU6 usando um MOI de 10 na presença de polibreno (8 µg/ml). Após incubação por 48 h, as células foram coletadas e duas lavagens com HBSS foi realizada. As células foram ressuspensas em paraformaldeído 4% em PBS-1X (v/v) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Após fixação, as células foram novamente lavadas por duas vezes com HBSS. Em seguida as células foram permeabilizadas em solução de HBSS contendo 0,1% (w/v) saponina e 0,05% azida de sódio (w/v) (SAP *buffer*) e incubadas por 30 min a temperatura ambiente e no escuro com 5 µl do anticorpo monoclonal anti-CD132 PE-conjugado (clone # 31134; R&D Systems). A seguir, as células foram lavadas duas vezes com 2 ml de SAP *buffer* e ressuspensas em PBS-1X. As células foram analisadas quanto à marcação por PE (FL2-H) através de citometria de fluxo.

3.10 Transplante de célula-tronco hematopoiéticas (HSC) transduzidas com vetores contendo o código de barras

3.10.1 Linhagem de camundongos

Camundongos C57Bl/6 foram obtidos com 7 semanas de idade e os experimentos realizados quando eles atingiram 8 semanas de idade. Os camundongos foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo (FMUSP), em condições livre de patógenos específicos ou heteroxênicos (*SPF - Specific Pathogen Free*). Os animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras, com água e maravalha autoclavadas.

3.10.2 Obtenção de HSC

As células-tronco hematopoiéticas foram obtidas a partir da medula óssea de camundongos machos sacrificados por inalação de CO₂. Para isso, os fêmures e as tíbias desses animais foram coletados e seu interior lavado com uma solução tampão contendo tampão fosfato-salino (PBS-1X) pH 7,2, 0,5% de soro fetal bovino (FBS) e 2 mM de EDTA, com o auxílio de uma agulha 26G. Após coleta, as células obtidas da medula óssea foram diluídas em uma proporção 7:1 em solução tampão e purificadas com gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) a 3% em tubo cônico de 50 ml. A solução foi centrifugada a 445 g por 35 min a 20 °C em rotor de ângulo móvel, sem freio. Após centrifugação, a camada superior foi aspirada, a interfase foi coletada e transferida para um novo tubo cônico de 50 ml. Foi feita uma lavagem pela adição de tampão, num mesmo volume da diluição inicial, e centrifugação a 300 g por 10 min a 20 °C. O sobrenadante foi removido por completo e uma nova lavagem para remoção de plaquetas foi realizada através da ressuspensão do *pellet* em tampão e centrifugação a 200 g por 15 min a 20 °C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em tampão e contadas em câmara de Neubauer. Após a determinação do número celular, as células foram novamente centrifugadas a 300 g por 10 min a 20 °C e ressuspensas em um volume de 80 µl para cada 10⁷ células.

As células foram então selecionadas por *Microbeads* magnéticas conjugadas ao anticorpo monoclonal CD117 anti-camundongo (isotipo: rato IgG2B), utilizando o *kit* de separação celular CD117 Microbeads mouse (MACS Miltenyi Biotec), seguindo as especificações do fabricante. A pureza das células obtidas foi avaliada por citometria de fluxo, através da marcação com anticorpos conjugados a fluorocromo específicos para CD-117-PE e anti-Sca1-FITC (MACS Miltenyi Biotec).

3.10.3 Transdução de HSC

As células CD117+ foram transduzidas em lotes de 10^5 células por poço de uma placa de 96 poços com fundo oval. A transdução foi realizada por um período de 20 h, utilizando um MOI de 50, na presença de polibreno (4 μ g/ml), em meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) livre de soro, suplementado com 1% de penicilina/streptomicina e citocinas (100 ng/ml de mSCF, 100 ng/ml mFlt3L, 100 ng/ml de hIL-11, 20 ng/ml de mIL-3, da empresa Peprotech). Após transdução as células foram ressuspensas em solução fisiológica e preparadas para o transplante de animais fêmeas previamente irradiadas.

3.10.4 Transplante

Camundongos fêmeas de 8 semanas foram sub-letalmente irradiadas utilizando fonte de Cobalto-60 tipo Panorâmica, com dose de 8,5 Gy com taxa de 10,1 Gy/h, a 60 cm da fonte. As irradiações foram realizadas pela pesquisadora Elizabeth S. R. Somessari, no Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN). Após irradiação, foi realizado o transplante de 5×10^4 células por animal, através de injeção intravenosa pela veia caudal. As injeções foram realizadas com a ajuda do Rodrigo Barbosa Aguiar. Os animais receberam água contendo 10 mg/ml de tetraciclina e 2% de sacarose, durante 2 meses. Após este período, tiveram início as coletas de sangue via plexo retro-orbital com a ajuda da bioterista Maria Aparecida da Silva Ferreira. As coletas foram realizadas em períodos de 15 dias para extração de DNA genômico com o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). A partir da segunda coleta, as amostras de sangue foram coletadas para extração de DNA e para a realização de exames de leucograma, com diferencial de leucócitos, que eram repetidos em intervalos de 15 dias. As análises foram processadas pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.10.5 Sequenciamento e análise do cromatograma: ensaio *in vivo*

Após a extração de DNA a partir do sangue, as amostras foram quantificadas em *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* (Uniscience) e 100 ng de cada amostra foi utilizada em reação de PCR com os *primers* Lego CB *Forward* e Lego CB *Reverse* (Quadro 4). A amplificação por PCR foi executada em uma mistura de reação com volume final de 50 µl contendo 1X tampão de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 1 mM de dNTPs, 4% DMSO, 2 U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen) e 2,5 pmol dos óligos Lego CB *Forward* e Lego CB *Reverso* (Quadro 4). A reação foi realizada em termociclador *Thermo Cycler PTC-225* (MJ Research) sob as seguintes condições: 94 °C por 4 min; 30 ciclos: 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min (a temperatura de anelamento era escolhida de acordo com os *primers* utilizados) e 72 °C por 2 min; 72 °C por 5 min.

Após amplificação, 5 µl do produto de PCR, foi purificado com ExoSap-IT (USB) submetido à reação de sequenciamento com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e sequenciados em 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento foi realizada em uma mistura com volume final de 10 µl contendo 1,5X tampão de sequenciamento (Applied Biosystems), 1 µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) 5 pmol dos *primers* Lego CB *Forward* ou Lego CB *Reverse* com 2,5 µl produto de PCR purificado com *ExoSap-IT* (USB). A reação foi realizada em termociclador *Thermo Cycler PTC-225* (MJ Research) sob as seguintes condições: 96°C por 2 min; 35 ciclos: 96 °C por 45 seg, 50 °C por 30 seg e 60 °C por 4 min.

Os valores obtidos a partir da análise com o *Polyphred* foram utilizados para o cálculo do valor em porcentagem atribuído para cada base variável do código de barras, da mesma forma como realizado nos experimentos *in vitro*. Os animais de cada grupo foram numerados, de forma que fosse possível comparar os resultados obtidos ao longo do tempo para um mesmo animal. A comparação ao longo do tempo foi realizada através do cálculo do erro absoluto:

$$\Delta T = |T_i - T_{i-1}| \quad (1)$$

onde T_i é a porcentagem de uma base obtida no i -ésimo tempo e T_{i-1} é a porcentagem desta mesma base obtida no tempo anterior.

Foi utilizada no cálculo apenas uma base de cada posição, pois uma vez que as bases são complementares em uma região variável, ambas as bases apresentam o mesmo valor de erro calculado. Por exemplo, em uma região variável constituída pelas bases A ou C, a comparação foi realizada apenas entre a proporção da base A obtida no T_1 com a proporção desta base obtida no T_2 . O cálculo do erro absoluto foi aplicado em todas as bases das 10 regiões variáveis do código de barras, sendo que o valor final considerado foi a média de todos os resultados. O sequenciamento foi repetido de tempos em tempos após o início do experimento. No caso em que a população continue aleatória, sem expansão clonal, o valor obtido pela análise estatística não deve mudar significativamente. Porém, o surgimento de um clone (indicação de proliferação excessiva) deve resultar num desbalanceamento nas proporções observadas inicialmente no código de barras, levando a uma variação dos valores analisados. O procedimento de análise foi resumido em um fluxograma que pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma para análise dos resultados gerados a partir do sequenciamento do código de barras.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Devido à grande quantidade de dados a serem analisados, e com o intuito de minimizar um possível erro na análise, foi desenvolvido um software para automatizar o procedimento, com o auxílio do Daniel Gomes Ferrari. O programa foi nomeado “*Barcode Analyzer*”.

4 RESULTADOS

4.1 Construção da biblioteca pBS-CTR

Buscando examinar a viabilidade da tecnologia proposta, alguns ensaios preliminares foram realizados. Para isso, foi construído um código de barras protótipo contendo em sua sequência o conjunto das bases CTR (onde R pode ser A ou G) repetido 5 vezes, tendo sido cada repetição denominada de região variável e numeradas no sentido 5' → 3'. Este código também possui a sequência NAN (N=A, C, T ou G) que serve para aumentar a complexidade da biblioteca, mas que não contribuiu para as análises dos ensaios quantitativos. O conjunto de sequências foi clonado no vetor plasmidial pBS, gerando a biblioteca denominada pBS-CTR, da qual 15 clones bacterianos foram isolados ao acaso e sequenciados (Quadro 5).

Quadro 5 - Regiões variáveis CTR e NAN dos clones sequenciados.

Clone	Regiões Variáveis					NAN
	1	2	3	4	5	
1	CTG	CTA	CTG	CTA	CTG	GAG
2	CTG	CTG	CTA	CTA	CTG	TAA
4	CTG	CTG	CTA	CTG	CTA	TAC
5	CTG	CTG	CTA	CTG	CTA	GAA
7	CTG	CTA	CTG	CTA	CTG	AAC
8	CTG	CTA	CTA	GTA	CTA	AAA
10	CTA	CTA	CTA	CTA	CTG	CAC
11	CTG	CTA	CTA	CTG	CTG	GAG
12	CTA	CTG	CTG	CTG	CTG	GAT
13	CTG	CTA	CTG	CTG	CTG	GAA
15	CTA	CTG	CTG	CTG	CTA	TAT

Dentre os clones analisados, 27% não apresentavam a sequência do código de barras (clones 3, 6, 9 e 14). A presença de sequências sem o código deve-se, em grande parte, ao não tratamento do produto da ligação com a enzima *BamHI* antes da transformação bacteriana, um cuidado que deve eliminar vetores sem inserto. Analisando a sequência nucleotídica do clone 8, é possível verificar um erro na 4ª

região variável, onde o C (do CTR) foi substituído por G, sendo a troca comprovada pela repetição do sequenciamento. O Sequenciamento revelou clones contendo a mesma sequência nas regiões variáveis (clones: 4 e 5; 1 e 7), mas que puderam ser diferenciados pela região terminal NAN, mostrando que esta região tem uma importância fundamental em aumentar a variabilidade da biblioteca.

4.2 Avaliação preliminar do potencial quantitativo do código de barras usando a biblioteca pBS-CTR

4.2.1 Combinação de dois clones

Após verificar o sequenciamento dos clones pBS-CTR descrito anteriormente, os clones pBS-CTR 1 e pBS-CTR 4 foram aleatoriamente selecionados para avaliação do perfil quantitativo do sequenciamento. Para isto, foram montadas misturas de DNA plasmidial em diferentes proporções e estas misturas foram submetidas ao sequenciamento. A Tabela 1 apresenta as concentrações esperadas dos plasmídeos (expressas em %) e as concentrações obtidas através da avaliação das áreas dos picos dos cromatogramas obtidos no sequenciamento (considerando a soma de cada área como 100).

Tabela 1 - Montagem de proporções variadas entre os clones da biblioteca CTR e sua quantificação.

Amostra	Valores esperados ^a		Valores obtidos ^b	
	pBS-CTR 1	pBS-CTR 4	pBS-CTR 1	pBS-CTR 4
1	100	0	99	1
2	90	10	93	7
3	75	25	79	21
4	50	50	47	53
5	25	75	17	83
6	10	90	3	97
7	0	100	1	99

^a - quantidades conhecidas de plasmídeo foram misturadas nas proporções indicadas e serve como previsão da área do pico a ser gerado no cromatograma do sequenciamento. O valor representa a porcentagem da área do pico.

^b - valor obtido da área do cromatograma. O valor representa a porcentagem da área do pico.

Comparando as medidas esperadas e obtidas de ambos os plasmídeos, observamos que o intervalo relativo às diluições analisadas segue uma linearidade, com correlação de 99% (Figura 10). Além disso, podemos observar que as medidas fornecidas pelas amplitudes do cromatograma de sequenciamento estão bem próximas das medidas esperadas (Figura 11).

Figura 10 - Gráficos de regressão linear com os valores obtidos e esperados da combinação de dois clones da biblioteca CTR.

(A)

(B)

Os valores esperados foram calculados através de dosagem em espectrofotômetro e os valores obtidos são resultados de análise do cromatograma de sequenciamento das mesmas amostras dosadas. Os valores utilizados são descritos na Tabela 1. Em (A) são mostrados os valores para o clone pBS-CTR 1 e em (B) para o clone pBS-CTR 4.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Figura 11 - Análise do código de barras CTR, através da combinação dos clones pBS-CTR 1 e pBS-CTR 4 em diferentes proporções.

O gráfico mostra a comparação entre os valores esperados e obtidos para a área do pico do cromatograma. Os clones pBS-CTR 1 e pBS-CTR 4 foram sequenciados após diluição nas proporções 10:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 0:10 (CTR 1:CTR 4) nas amostras 1 até 7. As amostras analisadas são descritas na Tabela 1.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Os resultados apresentados mostram que foi possível realizar uma medida quantitativa do código de barras utilizando o sequenciamento como ferramenta. Desta forma, a metodologia inovadora aqui apresentada pôde ser considerada válida.

Como explicado anteriormente, todas as medidas quantitativas são baseadas na área sob o pico do cromatograma, sendo analisados os picos referentes às bases variáveis em cada região. Na Figura 12, são mostrados os cromatogramas obtidos do sequenciamento deste experimento, a fim de exemplificar os cromatogramas analisados, bem como exemplificar a sobreposição dos picos nas regiões variáveis, além de fornecer uma ideia da qualidade do sequenciamento.

Figura 12 - Cromatograma obtido do experimento da mistura dos clones pBS-CTR 1 e pBS-CTR 4 em diferentes proporções.

I - pBS-CTR 1 (10:0); II - mistura dos clones em uma proporção de 9:1 (pBS-CTR 1 : pBS-CTR 4); III - proporção 3:1; IV - proporção 1:1; V - proporção 3:1; VI proporção 1:9; VII - pBS-CTR 4 (0:10), valores podem ser visualizados na Tabela 1. As sequências variáveis do código de barras são destacadas pela marcação com estrela. A primeira região variável contém a mesma base em ambas as amostras (Quadro 5).

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.2.2 Combinação de um clone mais biblioteca

Um próximo passo na avaliação do desempenho do código de barras foi examinar se era possível determinar o aumento do número de cópias de um código de barras específico, quando este se encontra misturado com a biblioteca plasmidial. Este experimento foi realizado na intenção de simular uma expansão clonal de um único clone em uma população de células transduzidas com a biblioteca lentiviral. Neste sentido, foram realizadas diferentes combinações entre a biblioteca e o clone, onde quantidades crescentes do clone CTR (clone 10) foram adicionadas à mistura de DNA plasmidial que caracterizava a biblioteca.

Na Tabela 2 são apresentados os valores esperados e obtidos nas diferentes amostras preparadas. O valor esperado para biblioteca (amostra 7) foi baseado na média dos valores obtidos em diversos sequenciamentos, uma vez que o mesmo perfil sempre era verificado. Desta forma, os valores esperados para as amostras foram calculados levando-se em consideração o valor basal da biblioteca e as proporções de biblioteca e do clone presentes nas misturas.

Tabela 2 - Quantificação das proporções variadas entre um clone específico misturado com a biblioteca CTR.

Amostra	Valores esperados ^a		Valores obtidos ^b	
	pBS-CTR 10	Biblioteca CTR	pBS-CTR 10	Biblioteca CTR
1	100	0	100	0
2	95	5	98	2
3	86	14	92	8
4	71	29	77	23
5	57	44	60	40
6	47	53	50	50
7	41	59	41	59

^a - quantidades conhecidas de plasmídeo foram misturadas nas proporções indicadas e serve como previsão da área do pico a ser gerado no cromatograma do sequenciamento. O valor representa a porcentagem da área do pico.

^b - valor obtido da área do cromatograma. O valor representa a porcentagem da área do pico.

Os resultados obtidos se encontram graficamente apresentados na Figura 13 onde é possível verificar o aumento da concentração do clone 10 conforme foi

aumentada a quantidade do seu plasmídeo correspondente na mistura. Este experimento mostra que é possível detectar e medir a presença de um clone mesmo quando este representa uma pequena porção dentro da biblioteca, mais uma vez sugerindo que é possível utilizar o código de barras para medir a expansão clonal.

Figura 13 - Representação gráfica da proporção entre a biblioteca CTR e o clone pBS-CTR 10.

O gráfico mostra a comparação entre os valores esperados e obtidos para a área do pico do cromatograma. Os clones pBS-CTR 10 e Biblioteca foram sequenciados após diluição nas proporções 10:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 0:10 (CTR 10:Biblioteca) As amostras analisadas (1-7) são descritas na Tabela 2.

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.3 Construção da biblioteca pBS-AGY

Seguindo o mesmo plano experimental utilizado com o protótipo CTR, também foi verificada a construção e quantificação de uma biblioteca com regiões variáveis constituídas pela sequência AGY (Y=C ou T). Este experimento foi realizado com a finalidade de analisar se o desenho do código de barras teria influência na sua detecção e quantificação.

Assim, foram isolados 10 clones ao acaso da biblioteca construída com o código AGY (Quadro 6). Após sequenciamento destes clones foi verificado que os clones 2 e 7 apresentaram a mesma sequência nas regiões variáveis. Entretanto,

assim como observado com o código CTR, foi possível diferenciar ambos os clones através de suas regiões terminais NAN.

Quadro 6 - Regiões variáveis AGY e NAN dos clones sequenciados.

Clone	Regiões Variáveis					NAN
	1	2	3	4	5	
1	AGC	AGC	AGC	AGC	AGT	TAA
2	AGC	AGC	AGT	AGC	AGT	AAA
3	AGC	AGC	AGC	AGT	AGT	TAG
4	AGC	AGC	AGC	AGC	AGG	GAG
5	AGC	AGT	AGT	AGT	AGT	GAA
6	AGC	AGT	AGC	AGC	AGC	AAA
7	AGC	AGC	AGT	AGC	AGT	TAA
8	AGC	AGT	AGC	AGT	AGC	CAC
9	AGC	AGT	AGC	AGC	AGT	GAC
10	Sem inserto					

Embora neste experimento o produto de ligação tenha sido digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, processo que eliminaria os clones falso positivos, ainda foi obtido um clone sem o código de barras (clone 10). Foi verificado que código de barras do clone 4 apresentou um erro na 5ª região variável, onde uma base G foi inserida ao invés das bases C ou T.

4.4 Avaliação preliminar do potencial quantitativo do código de barras usando a biblioteca pBS-AGY

4.4.1 Combinação de dois clones

A partir da nova biblioteca pBS-AGY, dois clones (pBS-AGY 1 e pBS-AGY 5) foram escolhidos ao acaso e diferentes concentrações deles foram misturadas e sequenciadas como no experimento descrito anteriormente para o protótipo CTR. Na Tabela 3 são encontradas as amostras contendo as diferentes quantidades, em porcentagem, esperadas e obtidas dos plasmídeos.

Tabela 3 - Quantificação das proporções variadas da mistura entre dois clones AGY.

Amostra	Valores esperados ^a		Valores obtidos ^b	
	pBS- AGY 1	pBS- AGY 5	pBS- AGY 1	pBS- AGY 5
1	100	0	100	0
2	90	10	91	9
3	75	25	73	27
4	50	50	50	50
5	25	75	20	80
6	10	90	1	99
7	0	100	0	100

^a - quantidades conhecidas de plasmídeo foram misturadas nas proporções indicadas e serve como previsão da área do pico a ser gerado no cromatograma do sequenciamento. O valor representa a porcentagem da área do pico.

^b - valor obtido da área do cromatograma. O valor representa a porcentagem da área do pico.

Neste ensaio foi também verificada a linearidade do intervalo relativo às diluições analisadas (Figura 14), com correlação de aproximadamente 99%, quando comparadas as medidas esperadas e obtidas de ambos os plasmídeos

Figura 14 - Gráficos de regressão linear com os valores obtidos e esperados da combinação de dois clones da biblioteca AGY

Os valores esperados foram calculados através de dosagem em espectrofotômetro e os valores obtidos são resultado de análise do cromatograma de sequenciamento das mesmas amostras dosadas. Os valores utilizados são descritos na Tabela 3. Os gráficos mostram uma correlação acima de 99% entre os valores obtidos e esperados pelo sequenciamento. Em (A) são mostrados os valores para o clone pBS-AGY 1 e em (B) para o clone pBS-AGY 5.

FONTE: ZANATTA, 2012.

A Figura 15 representa graficamente a comparação entre os valores esperados e obtidos e mostra que as medidas fornecidas pela amplitude do cromatograma de sequenciamento corroboram com as medidas esperadas. Os resultados deste novo ensaio reforçam a viabilidade da utilização do código de barras de maneira quantitativa.

Figura 15 - Análise do código de barras AGY, através da combinação dos clones pBS-AGY 1 e pBS-AGY 5 em diferentes proporções.

O gráfico mostra a comparação entre os valores esperados e obtidos para a área do pico do cromatograma. Os clones pBS-AGY 1 e pBS-AGY 5 foram sequenciados após diluição nas proporções 10:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 0:10 (AGY 1:AGY 5) nas amostras 1 até 7. As amostras analisadas são descritas na Tabela 3.

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.4.2 Combinação de um clone mais biblioteca

Diferentes amostras foram preparadas de forma que quantidades crescentes de um clone AGY, escolhido ao acaso (clone 1), foram adicionadas à mistura do DNA plasmidial representativa da biblioteca (pBS-AGY). As amostras foram sequenciadas e através da análise deste ensaio, foi feita a quantificação das concentrações do clone e da biblioteca, presentes na mistura. Na Tabela 4

apresentamos os valores esperados e obtidos experimentalmente para cada amostra que estão graficamente representados na Figura 16.

Tabela 4 - Quantificação das proporções variadas entre um clone específico misturado com a biblioteca AGY.

Amostra	Valores esperados ^a		Valores Obtidos ^b	
	pBS-AGY 1	Biblioteca AGY	pBS-AGY 1	Biblioteca AGY
1	52	48	55	45
2	57	43	61	39
3	64	36	69	31
4	76	24	82	18
5	88	12	92	8
6	95	5	97	3
7	100	0	99	1

^a - quantidades conhecidas de plasmídeo foram misturadas nas proporções indicadas e serve como previsão da área do pico a ser gerado no cromatograma do sequenciamento. O valor representa a porcentagem da área do pico.

^b - valor obtido da área do cromatograma. O valor representa a porcentagem da área do pico.

Figura 16 – Representação gráfica da proporção entre o clone e a biblioteca pBS-AGY.

As amostras analisadas (1-7) são descritas na Tabela 4. O gráfico da esquerda mostra os valores esperados, enquanto o gráfico da direita mostra os valores obtidos.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Os experimentos realizados até aqui, foram bastante eficientes em mostrar o carácter quantitativo do código de barras, uma vez que mesmo pequenas quantidades de um único clone, quando misturadas à biblioteca, puderam ser mensuradas, além de ter sido possível identificar o aumento da concentração deste clone em diferentes amostras.

4.5 Avaliação do código de barras na presença de DNA genômico

Até o momento o código de barras foi avaliado apenas na forma de DNA plasmidial. Assim, para verificar se o DNA genômico (gDNA) de células transduzidas, originaria sequenciamentos limpos dos nucleotídeos presentes nos códigos de barras sem interferir na análise final, o DNA plasmidial contendo os códigos de barras protótipos CTR e AGY foi misturado com DNA genômico de células de mamífero, seguindo-se o sequenciamento destas amostras. Foram escolhidos dois clones de cada biblioteca, que foram misturados em diferentes proporções como nos experimentos anteriores, usando como diluente o gDNA de células HT1080. Como controle foi também realizado o sequenciamento dos plasmídeos de cada clone sem estarem misturados ao gDNA.

Para a biblioteca AGY foram utilizados os clones pBS-AGY-1 e pBS-AGY-5. Os resultados para estes clones são mostrados na Figura 17A, Figura 17C e Figura 17E, onde é possível observar uma boa concordância, com correlação acima de 90%, entre o valor esperado e o valor obtido para a área do pico do cromatograma.

Para a análise da biblioteca CTR foram utilizados os clones pBS-CTR-7 e pBS-CTR-13. Os resultados obtidos para os clones CTR (Figura 17B, Figura 17D e Figura 17F) foram equivalentes aos observados para os experimentos realizados com a combinação de clones da biblioteca AGY.

Os resultados revelaram que o gDNA de células eucarióticas não tem qualquer influência nas análises do sequenciamento e na quantificação do código de barras, dando uma boa perspectiva para os próximos experimentos em cultura de células.

Figura 17 - Análise do código de barras quando diluído em gDNA.

Valores esperados e valores obtidos para a área do pico no cromatograma para AGY (A) e CTR (B). Os clones pBS-AGY 1 e pBS-CTR 7 foram sequenciados pelo protocolo padrão (amostras 1 A e B) ou diluído em gDNA (0,1 ng de plasmídeo para cada 100 ng de gDNA) antes do sequenciamento (amostra 2 A e B) ou os plasmídeos correspondentes a cada biblioteca foram diluídos em gDNA variando a proporção entre os plasmídeos (9:1, 3:1, 1:1, 1:3 e 1:9 nas amostras 3 até 7, respectivamente, em A e B) ou os clones foram sequenciados diluídos em gDNA (amostra 8 A e B). Gráficos de função linear com os valores obtidos e esperados dos clones pBS-AGY 1 (C), pBS-AGY 5 (D), pBS-CTR 7 (E) e pBS-CTR 13 (F). Os valores esperados foram calculados através de dosagem em espectrofotômetro e os valores obtidos são resultado de análise do cromatograma de sequenciamento das mesmas amostras dosadas. Os gráficos mostram uma correlação acima de 96% entre os valores obtidos e esperados pelo sequenciamento.

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.6 Construção dos vetores lentivirais

4.6.1 Lego-iGΔU6

O vetor Lego-iGΔU6 foi modificado a partir do vetor Lego-iG, pela retirada do promotor U6 contido neste vetor. Após esta modificação, o vetor Lego-iGΔU6 estava pronto para receber o código de barras e os cDNAs para *IL2RG* ou *LMO2*. A retirada deste promotor foi realizada a fim de evitar que uma expressão indesejada a partir do código de barras ocorresse, pois a inserção do código de barras é feita nos sítios de restrição adjacentes ao promotor.

Para verificar a integridade do vetor Lego-iGΔU6 foi feito o mapa de restrição com as enzimas *Xba*I e *Eco*RI em conjunto e com *Hpa*I. O vetor Lego-iG foi digerido em paralelo como um controle. Quando o vetor Lego-iG é digerido com *Xba*I e *Eco*RI deve liberar um fragmento de 925 pb, enquanto que a digestão com *Hpa*I o lineariza. Já o vetor Lego-iGΔU6 digerido com *Xba*I e *Eco*RI libera um fragmento de aproximadamente 606 pb, não sendo digerido com *Hpa*I (Figura 18).

Figura 18 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-iGΔU6

(A) vetor Lego-iG, (B) Lego-iGΔU6. Foram feitas digestões com as enzimas *Xba*I e *Eco*RI (1) e com a enzima *Hpa*I (2). Ladder: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen).

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.6.2 Lego-liGΔU6

Tendo-se obtido a clonagem do vetor Lego-iGΔU6, o próximo passo seria incluir os genes de interesse. Uma vez que o gene terapêutico, *IL2RG*, pode ter contribuído para os casos de leucemia nos protocolos de terapia gênica para SCID-X1 (Woods *et al.*, 2006a), é interessante testar o código de barras em conjunto com o *IL2RG*, para verificar uma eventual proliferação clonal favorecida pelo gene terapêutico.

O vetor Lego-liGΔU6, onde liG se refere ao conjunto *IL2RG*-i-res-eGFP (Figura 19) foi construído, inserindo-se apenas a região codificante do cDNA, amplificada a partir do vetor pCMV-SPORT6 contendo *IL2RG*, de acordo com Materiais e Métodos, descritos na Seção 3.2. A construção foi confirmada através de mapa de restrição com digestão por *Bam*HI que libera um fragmento de aproximadamente 1,2kb, por *Eco*RI mais *Not*I que libera 1,2kb e por *Xho*I que lineariza (Figura 20).

Figura 19 - Representação esquemática do vetor Lego-liG-ΔU6.

O cDNA para *IL2RG* foi inserido entre os sítios de *Eco*RI e *Not*I do vetor Lego-iGΔU6 que esta representado na Figura 8, Seção 3.2.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Figura 20 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do Lego-liG-ΔU6.

Foi feita digestão com *Bam*HI (1), com *Eco*RI e *Not*I (2) e com *Xho*I (3). Ladder: padrão de peso molecular 1kb (New England Biolabs).

FONTE: ZANATTA, 2012.

Para verificação da sequência do cDNA clonada no vetor Lego-liG-ΔU6, foi realizado o seu sequenciamento com os primers Lego Forward, Lego Reverse, *IL2RG*(465) Forward e *IL2RG* (740) Reverse (Quadro 4, Seção 3.5). Após sequenciamento, o cDNA clonado foi validado através de alinhamento com a sequência de mRNA do *IL2RG* de *Mus Musculus* disponível no banco de dados (GenBank: BC014720.1) utilizando a ferramenta ClustalW2 (EMBL-EBI). O resultado do alinhamento se encontra no Apêndice A.

4.6.3 Lego-LiGΔU6

O vetor Lego-LiGΔU6, onde LiG se refere ao conjunto *LMO2*-ires-eGFP (Figura 21), foi construído inserindo-se apenas a região codificante do cDNA, amplificada a partir do vetor pCMV-SPORT6 contendo *LMO2*, de acordo com Materiais e Métodos, descritos na Seção 3.2.

Figura 21 - Representação esquemática do vetor Lego-LiGΔU6.

O cDNA para *LMO2* foi inserido entre os sítios de *EcoRI* e *NotI* do vetor Lego-iGΔU6 que esta representado na Figura 8, Seção 3.2.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Para confirmar a clonagem, foi feito o mapa de restrição do vetor plasmidial (Figura 22). O vetor Lego-LiGΔU6 não deve cortar com *HpaI*, lineariza quando digerido com *XhoI*, *XbaI* e *NheI*, na digestão com *BamHI* libera um fragmento de 335 pb e com *EcoRI* deve liberar um fragmento de 550 pb.

Figura 22 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-LiGΔU6.

1- Padrão de peso molecular 250pb (Biolabs), 2- *EcoRI*, 3- *BamHI*, 4- *NheI*, 5- *HpaI*, 6- *XbaI* e 7- *XhoI*.

FONTE: ZANATTA, 2012.

O cDNA contido no vetor Lego-LiGΔU6 foi sequenciado com os *primers* Lego *Forward* e Lego *Reverse* (Quadro 4, Seção 3.5). Após sequenciamento, o cDNA clonado foi validado através de alinhamento com a sequência de mRNA do *LMO2* de *Mus Musculus* disponível no banco de dados (GenBank: BC057880.1) utilizando a

ferramenta ClustalW2 (EMBL-EBI). O resultado do alinhamento se encontra no Apêndice B.

4.7 Construção das bibliotecas de vetores lentivirais

Após construção dos vetores Lego-iGΔU6, Lego-liGΔU6 e Lego-LiGΔU6, foi realizada a clonagem do código de barras, produzindo as bibliotecas desses vetores, contendo as marcações aleatórias.

Um ponto importante para a produção das bibliotecas é a complexidade resultante da transformação, sendo desejado que estivesse em torno de 5×10^3 clones distintos, visando garantir a presença de todos os códigos de barras possíveis (não considerando as bases N). Em geral, a transformação foi realizada com aproximadamente 5 µg de DNA, levando-se em consideração sua quantificação no início da ligação, e utilizando eletroporação bacteriana, cuja competência estava acima de 10^8 colônias/µg de plasmídeo. A complexidade da biblioteca foi determinada por meio de contagem das colônias resultantes do plaqueamento de 100 µl da transformação.

Embora tenha sido utilizada uma grande quantia de DNA inicial e uma bactéria de competência elevada, vários fatores podem influenciar na eficiência da transformação, como a eficácia da digestão anterior a ligação e/ou a quantificação do DNA que foi sendo realizada anteriormente ao passo de digestão final com *NheI*, para reduzir os clones falso positivos, o que pode ter eliminado grande parte dos plasmídeos na reação. O restante da transformação (900 µl) foi utilizado como inóculo para preparação plasmidial.

Como comentado anteriormente, para termos maior confiança na representatividade de todas as sequências, preferíamos obter pelo menos 5×10^3 clones distintos na biblioteca. Entretanto, seriam necessários pelo menos 1×10^3 clones para que todos os códigos de barras possíveis fossem representados. Apesar de inúmeras tentativas, o número de clones recuperados sempre ficava por volta de 10^3 , um pouco abaixo do valor desejado, porém aceitável para ensaios de prova de princípio do funcionamento do código de barras. Desta forma, a preparação

plasmidial (maxi-prep) da biblioteca Lego-CB-iGΔU6 foi feita a partir do inoculo da transformação em meio líquido contendo um total de $1,5 \times 10^3$ colônias/ml e o mapa de restrição para conferir sua integridade foi realizado (Figura 23).

Figura 23 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-CB-iGΔU6.

1- *XbaI* (lineariza), 2- *NheI* (não corta), 3- *XhoI* (lineariza), 4- padrão de peso molecular λ *HindIII* (Biolabs), 5- *BamHI* (lineariza), 6- *HpaI* (não corta).

FONTE: ZANATTA, 2012.

Desta biblioteca, foram isolados e sequenciados 4 clones escolhidos aleatoriamente, utilizando nas reações de amplificação os *primers* Lego CB *Forward* e Lego CB *Reverse* (Quadro 4).

Quadro 7 - Sequência do código de barras de quatro clones isolados da biblioteca Lego-CB-iGΔU6.

Clone	Código de barras
1	GTA TCT ATA GAG TGT ATA CAG TAT AGA CAT AGG GAG G
2	GCA TCT ACA GAG TAT AGA CAG TCT ACA CAT ACC GAT A
3	GTA TCT ATA GAG TAT AGA CAG TAT ACA CAT AGA TAC G
4	GTA TCT ATA GCG TAT AGA CTG TCT AGA CGT AGG ACA T

Após a preparação da biblioteca Lego-CB-iGΔU6, foram também realizadas as preparações plasmidiais das bibliotecas Lego-CB-liGΔU6 e Lego-CB-LiGΔU6. A biblioteca contendo o cDNA para *IL2RG* foi construída através da inserção do código de barras no vetor Lego-liGΔU6. O número de colônias por ml para esta biblioteca

foi estimado em $1,2 \times 10^3$ e procedeu-se a preparação plasmidial, cujo mapa de restrição pode ser encontrado na Figura 24.

Figura 24 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-CB-liGΔU6.

1- Padrão de peso molecular λ HindIII (Biolabs), 2- *XhoI* (lineariza), 3- *NheI* (não corta), 4- *XbaI* (libera ~ 1500 pb), 5- *HpaI* (não corta), 6- *BamHI* (libera ~ 1200 pb) e 7- padrão de peso molecular λ HindIII (Biolabs).

FONTE: ZANATTA, 2012.

Da mesma forma, a biblioteca contendo o cDNA para *LMO2* foi construída através da inserção do código de barras no vetor Lego-LiGΔU6 e sua complexidade foi calculada em um total de 2×10^3 colônias/ml. Para certificação do mapa do vetor, foram feitas digestões com enzimas de restrição (Figura 25).

Figura 25 - Foto de gel de agarose 1% mostrando o perfil de restrição do vetor Lego-CB-LiGΔU6.

1- 1kb Ladder (New England Biolabs). 2- DNA não cortado. 3- *EcoRI* e *NotI* (534pb). 4- *EcoRI* e *XbaI* (600pb). 5- *BamHI* (335pb). 6- *KpnI* (1727). 7- *NheI* (não corta). 8- *HpaI* (não corta). 9- λ HindIII Ladder (Biolabs).

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.7.1 Produção de estoques virais

Os vetores lentivirais Lego-iG- Δ U6, Lego-CB-iG Δ U6, Lego-LiG Δ U6 e Lego-liG- Δ U6, foram co-transfectados com os vetores de empacotamento em células 293T, a fim de verificar o funcionamento dos vetores, através da análise de expressão do marcador GFP neles presente. Assim, após transfecção, as células utilizadas para a produção viral foram visualizadas por microscopia de fluorescência (Figura 26).

Figura 26 - Microscopia de fluorescência das células HEK293T utilizadas para a produção lentiviral.

Foi realizada a transfecção dos vetores virais de transferência gênica, empacotamento e envelope. Após transfecção as células permaneceram em cultura por 24 h antes da verificação da expressão do marcador de fluorescência eGFP.

FONTE: ZANATTA, 2012.

O sobrenadante das células transfectadas foi coletado e 100 μ l foram utilizados na transdução de células NIH-3T3. Após 48 h as células transduzidas foram analisadas por citometria de fluxo (Figura 27), a fim de verificar a eficiência de

transdução e a expressão do transgene GFP. Com os resultados obtidos, foi possível titular a produção viral em torno de 10^6 gfu/ml (*green fluorescent units/ml*).

Figura 27 - Citometria de fluxo mostrando a eficiência de transdução dos diferentes vetores em células NIH-3T3.

Para a transdução foram utilizados 100 μ l do sobrenadante viral, não concentrado. As células foram mantidas em cultura por 48 h após a transdução, antes de serem coletadas para a citometria de fluxo.

FONTE: ZANATTA, 2012.

A biblioteca Lego-CB-liGAU6, Lego-CB-LiGAU6, Lego-CB-iGAU6, e dois clones previamente isolados da biblioteca Lego-CB-iGAU6, nomeados clone #1 (3'-GTA TCT ATA GAG TGT ATA CAG TAT AGA CAT AGG CGG G – 5') e clone #2 (3'-GCA TCT ACA GAG TAT AGA CAG TCT ACA CAT ACC GAT A – 5'), foram utilizados para a produção de estoques virais em larga escala através de sua co-transfecção com os vetores de empacotamento em células 293T, fazendo-se a transfecção em 10 placas de 60 mm para cada vetor e ultracentrifugação após a

coleta para concentrar a produção viral. Após a primeira coleta, o meio era repostado e uma nova coleta e ultracentrifugação foram realizadas.

Após produção viral 0,5 µl da preparação foi utilizada na transdução de células NIH-3T3, a fim de realizar a titulação. Após 48 h, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo (Figura 28), para testar a eficiência de transdução e a expressão do transgene GFP. O título das produções virais foi calculado e estava em torno de 1×10^8 gfu/ml para todas as produções.

Figura 28 - Citometria de fluxo mostrando a eficiência de transdução dos diferentes vetores em células NIH3T3.

Para a transdução foram utilizados 0,5 µl do sobrenadante viral concentrado por ultracentrifugação. As células foram mantidas em cultura por 48 hs após a transdução, antes de serem coletadas para a citometria de fluxo.

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.7.2 Imunoflorescência para detecção de *LMO2*

A fim de verificar se o vetor Lego-LiGΔU6 codifica uma proteína funcional, células NIH-3T3 foram transduzidas com o vetor contendo o cDNA codificante para *LMO2* e marcadas com anticorpo policlonal anti-*LMO2*. Conforme mostra a Figura 29, as células não transduzidas com o vetor apresentam marcação pelo anticorpo com localização citoplasmática, enquanto que nas células transduzidas, a marcação tem localização nuclear.

Como a *LMO2* é uma proteína exclusivamente nuclear, essa diferença na marcação pode estar relacionada ao fato de que a maioria dos domínios N-terminais da *LMO2* são comuns aos domínios *LIMs* (*zinc fingers* ligantes de proteína) de outras proteínas que desempenham funções no citoesqueleto, como as proteínas quinase e ligante de actina (Kadmas e Beckerle, 2004). Assim, uma vez que o imunogenio do anticorpo é um peptídeo sintético correspondente a uma região dentro dos resíduos N-terminais da *LMO2*, é possível que o anticorpo esteja marcando as proteínas de citoesqueleto nas células não transduzidas.

Além da expressão de *LMO2* nas células transduzidas, é possível verificar a expressão do gene marcador *eGFP* presente no genoma do vetor (Figura 29). A dupla marcação mostrando a expressão conjunta de *LMO2* e *eGFP* confirma a expressão do gene de interesse contido no vetor.

Figura 29 - Imunoflorescência de células NIH-3T3.

As células foram transduzidas ou não (controle) com o vetor Lego-LiGΔU6 e marcadas com anticorpo policlonal anti-*LMO2*. As células após transdução mostram coloração verde devido à expressão de eGFP, gene marcador do vetor. A marcação vermelha, representativa de *LMO2* é verificada tanto na célula transduzida como na célula não transduzida, porém com diferentes localizações celulares.

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.7.3 Citometria de fluxo para detecção de *IL2RG*

Para verificar a expressão do gene *IL2RG* contido no vetor Lego-liGΔU6, células CHO foram transduzidas com o lentivírus contendo o cDNA codificante para *IL2RG* e marcadas com anticorpo anti-CD132 (R&D Systems). A escolha da linhagem utilizada neste ensaio foi baseada em um ensaio de RT-PCR utilizando *primers* amplificadores do *IL2RG*, uma vez que dentre as linhagens avaliadas, apenas a CHO não apresentou o produto de amplificação esperado (dados não mostrados). Após a transdução com os vetores, as células foram divididas em dois tubos, sendo um utilizado para análise da expressão de *GFP* (Figura 30) e o outro utilizado no tratamento para marcação com o anticorpo (Figura 31).

Figura 30 – Citometria de fluxo para análise da expressão de *GFP* em células transduzidas com o vetor Lego-liGΔU6

Células CHO foram transduzidas com o vetor Lego-iGΔU6 ou com o vetor Lego-liGΔU6 e analisadas quanto à expressão de *GFP*.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Figura 31 - Citometria de fluxo para análise da expressão de *IL2RG* em células transduzidas com o vetor Lego-liG-ΔU6 e marcadas com o anticorpo anti-CD132.

Células CHO foram transduzidas com o vetor Lego-iGAU6 ou com o vetor Lego-liGAU6 e marcadas com o anticorpo PE-conjugado anti-CD132, após permeabilização das células com o tampão SAP.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Quando apenas a expressão de GFP foi avaliada (Figura 30) foi verificada que uma porcentagem das células transduzidas com os vetores Lego-iGAU6 e Lego-liGAU6 aparecem marcadas em FL2-H. Este resultado não é esperado, uma vez que a marcação por GFP deve ser visualizada em apenas em FL1-H.

A Figura 31 mostra que o tratamento com o tampão SAP parece interferir na detecção do GFP, uma vez que a expressão dessa proteína não pode ser mais detectada nas células transduzidas com o vetor Lego-iGAU6 e tratadas com este tampão. Porém, nas células tratadas com o anticorpo, a marcação em FL2-H, ocorre apenas nas células transduzidas com o vetor contendo o gene *IL2RG*.

Assim, mesmo com a população deslocada para a dupla marcação, nas análises das células não tratadas com o anticorpo (Figura 30), o resultado obtido para o vetor Lego-liG- Δ U6, onde 34% das células apresentaram marcação por CD132, parece ser verdadeiro (Figura 31). De qualquer forma, se faz necessária a repetição do experimento.

4.7.4 Avaliação do Código de Barras em cultura de células

Para demonstrar que o código de barras permite quantificação de um clone celular dentro de uma população de células transduzidas, células NIH-3T3 foram transduzidas com a biblioteca viral Lego-CB-iG Δ U6 ou com vírus derivado do clone #1 desta biblioteca. Cada transdução foi realizada independentemente e, após quantificação da população transduzida em citômetro de fluxo (Figura 32), as populações celulares foram semeadas em conjunto formando uma população mista de acordo com a proporção 0:1, 1:9, 1:3, 1:1, 3:1, 9:1 e 1:0. Ou seja, zero, 100.000, 250.000, 500.000, 750.000 ou 1.000.000 células transduzidas com o vírus derivado do clone #1 foram semeadas juntamente com 1.000.000, 900.000, 750.000, 500.000, 250.000 ou zero células previamente transduzidas com a biblioteca viral, respectivamente. Entretanto, como não foi obtida uma taxa de transdução de 100%, o número de células semeadas precisou ser ajustado de forma que a quantidade de células eGFP positivas se aproximasse da proporção citada anteriormente. Por exemplo, para semear os valores desejados com uma eficiência de transdução de 82,99%, foi necessário semear 20,5% a mais de células.

Figura 32 - Citometria de fluxo para quantificação da população transduzida com o vetor contendo a do clone #1 e com o vetor contendo a biblioteca.

Para a transdução foram utilizados MOI de 50. As células foram mantidas em cultura por 48 h após a transdução, antes de serem coletadas para a citometria de fluxo.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Para analisar o comportamento das amostras ao longo do tempo, foram feitas coletas de gDNA semanalmente durante 5 semanas e posterior análise por sequenciamento. Na Figura 33 encontram-se graficamente representados os valores obtidos a partir do cromatograma das amostras sequenciadas.

Para conhecimento dos valores sequenciados em cada região variável apenas da biblioteca, a mesma foi sequenciada três vezes e um valor médio dos cromatogramas foi obtido, sendo este considerado o valor referente para a amostra 1:0 (Biblioteca:clone), isto é, este valor representa 100% de biblioteca. Nas demais amostras, para o cálculo dos valores sequenciados que correspondem apenas à biblioteca em cada região variável, este valor referente foi diminuído de acordo com a proporção de células do clone adicionadas na mistura.

A partir da análise do cromatograma do sequenciamento, os valores obtidos para o clone foi calculado através da média aritmética simples dos valores encontrados para as bases conhecidas do clone nas 10 regiões variáveis, subtraindo deste valor a média dos valores calculados a partir dos valores de referência da biblioteca.

Como a soma de biblioteca e clone na amostra corresponde a 100%, o valor obtido para a biblioteca foi calculado pela diferença do valor obtido para o clone com relação ao valor de 100%.

Figura 33 - Representação gráfica da quantificação da biblioteca *versus* clone #1 em diferentes amostras e em diferentes momentos.

Biblioteca + Clone #1 em cultura de células

As amostras de 1 a 7 representam respectivamente as proporções de 10:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 0:10 entre Biblioteca e clone #1.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Como observado na Figura 33 as amostras se comportam como esperando até a segunda semana e passa a apresentar variações a partir deste ponto, embora ainda seja possível observar a tendência esperada, ou seja, à medida que ocorre uma diminuição na concentração de biblioteca, há o aumento na concentração do clone utilizado.

Foi aplicado aos resultados deste experimento o cálculo de erro descrito no subtópico 3.10.5 dos Materiais e Métodos, a fim de verificar a diferença entre um tempo com o tempo anterior. Assim como mostrado na análise da Figura 33, esta

nova análise mostra que a variação entre as amostras da primeira e da segunda semana é pequena, enquanto que as amostras da segunda e da terceira semana apresentam uma grande variação que tende a se estabilizar a partir da quarta semana (Figura 34).

Figura 34 - Diferença entre os valores quantificados da biblioteca *versus* clone #1 ao longo do tempo.

Na legenda são mostradas as proporções entre as sequências, sendo a biblioteca representada pela letra B e o clone pelo símbolo #1.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Em outro experimento, células transduzidas com a biblioteca viral Lego-CB-iGΔU6 foram misturadas com células transduzidas com vírus contendo a sequência do clone #2, derivada desta biblioteca. As taxas de transdução foram analisadas, tendo sido observado valores semelhantes aos obtidos no experimento anterior. Com base nas porcentagens de transdução, foi feito o cálculo do número de células de cada transdução a ser misturado. Da mesma forma como no experimento em cultura de células com o clone #1, foi observada uma leve alteração no padrão esperado a partir da terceira semana (Figura 35).

Figura 35 - Representação gráfica da quantificação da biblioteca *versus* clone #2 em diferentes amostras e em diferentes momentos.

Biblioteca + Clone #2 em cultura de células

As amostras de 1 a 7 representam respectivamente as proporções de 10:0, 9:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 0:10 entre Biblioteca e clone #2.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Aplicando o cálculo de erro como no experimento anterior, verificamos novamente uma variação pequena entre as amostras da primeira e da segunda semana, enquanto que esta diferença aumenta entre a segunda e a terceira semana apresentam e que também tende a se estabilizar a partir da quarta semana (Figura 36).

Figura 36 - Diferença entre os valores quantificados da biblioteca *versus* clone #2 ao longo do tempo.

Na legenda são mostradas as proporções entre as sequências, sendo a biblioteca representada pela letra B e o clone pelo símbolo #2.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Nesses experimentos, a variação ocorrida foi inferida a uma falha na manipulação nas amostras, onde provavelmente houve contaminação de uma amostra com as outras a partir da 3ª semana. Os experimentos foram repetidos e as coletas realizadas até a 8ª semana, mas apenas resultados parciais estão disponíveis. A nova repetição apresentou resultados mais limpos mostrando que a população de células não apresentou grandes variações com o tempo.

4.8 Piloto de obtenção e transdução de HSC

Após as análises *in vitro* sobre a viabilidade do uso da tecnologia do código de barras como uma ferramenta para a análise clonal, o próximo passo foi testar seu comportamento *in vivo*. Para isso, células-tronco hematopoiéticas foram utilizadas, por terem sido as células utilizadas nos protocolos clínicos de terapia gênica para SCID-X1, onde foram observados problemas relacionados com o desenvolvimento de leucemia em algumas das crianças tratadas. Neste sentido, um experimento piloto foi realizado a fim de verificar a eficiência na purificação destas células.

Quatro camundongos C57Bl/6, machos com 7 semanas, foram eutanasiados através de inalação de CO₂, para coleta de medula óssea de suas tíbias e fêmures, como descrito em Materiais e Métodos (Seção 3.10.2). As células foram marcadas com os anticorpos conjugados a fluorocromo, CD-117-PE e anti-Sca1-FITC, e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a extração e purificação das HSCs foram bem sucedidas, com aproximadamente 80% das células positivas para o marcador CD117, também conhecido como c-kit (Figura 37).

Figura 37 - Caracterização das células-tronco hematopoiéticas.

FONTE: ZANATTA, 2012.

Após isolamento das células c-kit positivas, estas foram plaqueadas a uma densidade de 1×10^6 células/ml em IMDM suplementado com coquetel de citocinas composto por 100 ng/ml fator de crescimento de célula-tronco (SCF), 100 ng/ml trombopoietina, 100 ng/ml Flt3-ligante e 20 ng/ml interleucina-3 (PeproTech). Após 24 h de pré-estímulo, metade das células foi mantida como controle da transdução e a outra metade submetida à transdução com o vetor Lego-CB-iGΔU6 (MOI 10) por

12 h. Após 36 h em cultura, as células foram analisadas por citometria de fluxo para verificação da expressão de GFP (Figura 38).

Figura 38 - Quantificação de células-tronco hematopoiéticas transduzidas com vetor lentiviral.

FONTE: ZANATTA, 2012.

O marcador CD117 (c-kit) é expresso em células progenitoras hematopoiéticas, como as HSC multipotentes, e por este motivo foi escolhido como marcador para seleção positiva das células de interesse. Além da purificação das células, outra questão a ser verificada é a capacidade de transdução das células c-kit+. Embora apenas 20% das células tenham sido transduzidas no experimento piloto, os resultados mostram sucesso na primeira etapa de padronização deste protocolo, uma vez que utilizamos um MOI de 10, valor este muito baixo segundo as descrições na literatura, segundo os quais seriam necessários MOIs acima de 100 para obter maior taxa de transdução (SWAINSON et al., 2007).

4.9 Transdução e transplante de HSC

Visando analisar o comportamento do código de barras (CB) *in vivo*, animais C57Bl/6 fêmeas, foram irradiados e transplantados com diferentes combinações de células transduzidas com os vetores lentivirais contendo o CB. Os animais transplantados foram divididos em 7 grupos listados no Quadro 8.

Quadro 8 - Grupos de animais transplantados

GRUPO	Nº DE ANIMAIS	COMBINAÇÃO
1	5	Não transplantado (controle irradiação)
2	5	Transplantado com células não-transduzidas
3	5	90% células transduzidas apenas com biblioteca e 10% transduzidas com <i>IL2RG</i>
4	5	90% células transduzidas apenas com biblioteca e 10% transduzidas com <i>LMO2</i>
5	5	100% de células transduzidas com biblioteca
6	5	75% de células transduzidas com biblioteca e 25% de células transduzida com clone #1
7	5	25% de células transduzidas com biblioteca e 75% de células transduzida com clone #1

FONTE: ZANATTA, 2012.

Para comprovar que a irradiação foi eficiente, um grupo de animais (grupo 1) foi mantido sem que tivessem recebido transplante. A partir da segunda semana pós-irradiação, esses animais começaram a morrer, tendo o último animal deste grupo morrido após 20 dias, mostrando que a irradiação foi eficiente em eliminar a medula óssea dos animais. Durante este período, um animal do grupo 4, 2 animais do grupo 6 e 1 animal do grupo 7 também morreram.

Após irradiação, os animais fêmeas foram transplantados com HSC de camundongos machos, coletadas e transduzidas no dia anterior ao transplante, utilizando um MOI de 50 e o mesmo suplemento de citocinas utilizado no ensaio piloto. Parte das células-tronco coletadas dos camundongos machos foram marcadas com os anticorpos conjugados a fluorocromo, CD-117-PE e anti-Sca1-FITC, e analisadas por citometria de fluxo (Figura 39).

Figura 39 - Citometria de fluxo das HSC purificadas e marcadas com os anticorpos conjugados a fluorocromo, CD-117-PE e anti-Sca1-FITC.

FONTE: ZANATTA, 2012.

4.10 Recuperação e análise do código de barras *in vivo*

As coletas de sangue periférico através do plexo retro-orbital, tiveram início após 45 dias do transplante e procederam a cada 15 dias para obtenção de DNA genômico. Na segunda coleta de sangue além da extração de DNA, foi coletado sangue para realização de exame de leucograma com diferencial de leucócito (Anexo A). Os leucogramas continuaram a serem realizados a cada 15 dias após o primeiro exame, sendo que até o momento mais quatro exames foram realizados (Anexos B, C e D). Durante as coletas de sangue, na segunda semana um animal do grupo 4 morreu e na quinta semana, um animal do grupo 3 teve que ser sacrificado, pois não era mais possível realizar a coleta de sangue deste animal, e nesta mesma semana um animal do grupo 6 morreu. Durante a sexta coleta, um animal do grupo 3 morreu e um do grupo 7 durante a oitava coleta.

Analisando os resultados (Figura 40) obtidos a partir do cálculo do erro absoluto, verifica-se uma variação ao longo do tempo mais acentuada apenas no grupo contendo células transduzidas com o vetor Lego-CB-LiG- Δ U6, que contém o oncogene LMO2, sugerindo uma possível ocorrência de proliferação clonal. Os demais grupos se apresentam sem grandes alterações ao longo do tempo.

É interessante destacar que, nos resultados dos exames laboratoriais de leucograma e contagem diferencial de leucócitos (apêndices) não foi possível verificar qualquer diferença significativa entre os grupos, mesmo com a variação observada para o grupo 4 nos resultados do sequenciamento. Os dados aqui apresentados são bastante satisfatórios, uma vez que mostram a validade da tecnologia proposta do código de barras para revelar alterações na dinâmica de células transduzidas e transplantadas no organismo, como uma metodologia simples e sensível para a detecção de possível dominância clonal.

Contudo, resta comprovar que a variação ocorrida no grupo onde células transduzidas com o vetor contendo o cDNA para LMO2 foram transplantadas, é devida a uma expansão clonal. Também, análise das bases N, presentes no código de barras, está em andamento.

Figura 40 - Apresentação gráfica da análise dos resultados dos sequenciamentos realizados de tempo em tempo, nas amostras obtidas dos animais.

Foi calculado o erro absoluto aos resultados do sequenciamento. Em (A) são mostrados os dados obtidos para o grupo 3 constituído de animais transplantados com 10% de células transduzidas com o vetor Lego-CB-iGΔU6 e 90% Lego-CB-iGΔU6; (B) mostra os resultados obtidos para o grupo 4, onde foi realizado o transplante com 10% de células transduzidas com o vetor Lego-CB-LiGΔU6 e 90% Lego-CB-iGΔU6; (C) mostra os resultados obtidos para o grupo 5, onde foi realizado o transplante com 100% de células transduzidas com o vetor Lego-CB-iGΔU6 (apenas biblioteca); (D) mostra os resultados obtidos para o grupo 6 transplantado com 75% de células transduzidas com o vetor Lego-CB-iGΔU6 e 25% com o clone #1 da biblioteca Lego-CB-iGΔU6; (E) mostra os resultados obtidos para o grupo 7 transplantado com 25% de células transduzidas com o vetor Lego-CB-iGΔU6 e 75% com o clone #1 da biblioteca Lego-CB-iGΔU6. Cada linha nos gráficos representam um animal do grupo. Os valores mostrados representam a diferença percentual entre um tempo e o seu tempo anterior.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Estratégias buscando-se evitar efeitos indesejados relativos à terapia gênica têm sido idealizadas e desenvolvidas. Estudos de aprimoramento do vetor retroviral, minimizando as sequências LTR (*long terminal repeats*), a utilização de isoladores de cromatina para conter a ação do *enhancer* codificado no vetor (BONDARENKO et al., 2003) e a utilização de uma combinação *enhancer/promotor* específica para linhagem linfóide (YI et al., 2005), são exemplos de mecanismos que poderiam ser utilizados para aumentar sua segurança.

Os dados da literatura indicam que os vetores lentivirais devem ser mais seguros do que os vetores oncoretrovirais. Alguns trabalhos buscam estudar o perfil de integração do vetor retroviral. Em Mitchell et al. (2004), os autores verificaram que o MoMLV apresenta uma preferência por sítios de integração em regiões de início de transcrição. Por outro lado, neste mesmo trabalho, foi verificado que vetores lentivirais têm preferência de integração por regiões cromossômicas gênicas.

Outra comparação entre oncoretrovírus e lentivírus foi descrita por Montini et al. (2006). Neste estudo, um protocolo de transdução de células hematopoiéticas foi conduzido com ambos os vetores, observando-se uma baixa genotoxicidade relativa à integração do vetor lentiviral, com relação ao oncoretroviral, que induziu formação de tumores. Dessa forma, a utilização de vetores lentivirais poderia contribuir para a redução da probabilidade de que alguma consequência indesejada ocorra devido à inserção do provírus, uma vez que o risco de ativação da expressão de genes vizinhos ao sítio de integração é relativamente baixo, já que a integração dos vetores lentivirais não ocorre próxima de promotores de genes endógenos no hospedeiro. Atualmente existem 44 protocolos clínicos em andamento que utilizam vetores lentivirais, a maioria sendo para terapia gênica da AIDS e das imunodeficiências primárias (WILEY et al., 2012).

Até o presente momento não existe uma metodologia para avaliar quantitativamente o risco de ocorrer uma mutagênese insercional em função da utilização de um vetor retroviral. A falta desta metodologia está dificultando a comparação entre vetores, bem como a medida da influência de sequências regulatórias e o transgene contido nos vetores para o surgimento da LLA.

A base molecular envolvida com a seleção do sítio de integração permanece desconhecida, mas as descrições na literatura sobre os retrotransposons podem auxiliar no entendimento deste processo. Os retrotransposons possuem características estruturais e mecanísticas semelhantes aos retrovírus. Assim como a sequência do provírus, os retrotransposons são flanqueados por LTRs, codificam *gag* e *pol*, seu genoma é transcrito e empacotado em estruturas semelhantes a vírus, diferenciando apenas no fato de não possuírem uma fase extracelular devido à ausência de *env*. Nos retrotransposons a especificidade da integração se dá por meio de uma ponte formada entre o complexo de integração e os sítios no genoma, intermediada por proteínas celulares, sem que fosse observada qualquer homologia entre o provírus e as regiões de integração (DELELIS et al., 2009).

Dentre os retrovírus apenas no HIV-1 e nos FVs foi observada uma fraca homologia entre o sítio de integração e a sequência proviral. Assim como nos elementos transponíveis, a hipótese mais aceitável é que proteínas celulares interagem com os componentes do complexo de integração, na seleção do sítio de integração do provírus (DELELIS et al., 2009). Foi demonstrado que o cofator transcricional celular do fator de crescimento derivado do epitélio da córnea (LEDGF/p75) é essencial para a integração sítio específica do HIV-1, pois faz a ligação entre a cromatina e a integrase. Porém, LEDGF/p75 não interage com a integrase dos MLV (BUSSCHOTS 2005; LLANO et al., 2006). Marcadores epigenéticos como metilação de histonas H3 e K4 metilados, acetilação de H4 ou H3, também parecem estar envolvidos na seleção de locais de integração pelos vetores derivados do HIV, embora de maneira mais discreta do que o LEDGF/p75 (WANG et al., 2007).

Foi proposto por Delelis et al. (2009) que além da interação do complexo de integração com a cromatina, através de uma ponte formada por proteínas celulares, a integrase reconhece regiões contendo sequências de DNA repetido, não apenas no LTR viral, como também é capaz de reconhecer essas sequências no genoma celular, através do reconhecimento dos arranjos estruturais da cromatina, formados por essas regiões. Como os vetores derivados do HIV tem preferência por integração em regiões ricas em genes, região estas que contém muitos elementos Alu, parece que esses elementos favorecem a integração destes vetores (SCHRÖDER et al., 2002).

O desenvolvimento de um vetor retroviral, cuja integração no genoma alvo possa ser direcionada, é essencial para que os problemas de ativação de proto-oncogenes em protocolos clínicos de terapia gênica possam ser evitados. Neste sentido, o estudo das *zinc finger* nucleases (ZFNs) é bastante promissor. As ZFNs são enzimas artificiais que reconhecem um domínio de ligação ao DNA realizando uma quebra de fita dupla (DBS) que pode ser direcionada. Após a indução de DBS, o DNA é reparado pelo sistema de reparo celular, de forma homóloga ou não homóloga (COLLIN e LAKO, 2011).

Usando o sistema de ZFNs desenhado contra o *locus* de *IL2RG* humano em combinação com vetores lentivirais contendo uma integrase inativa, Lombardo et al. (2007) descreveu uma conversão eficiente do gene endógeno para o gene doador em diferentes linhagens celulares, incluindo progenitores hematopoiéticos e células-tronco embrionárias. Este trabalho mostra que a integração viral sítio específica é possível, e que um sistema de entrega transiente e não integrativo pode realizar uma modificação genética permanente de maneira homóloga e dirigida.

Os estudos realizados nos últimos anos sobre o perfil de integração retroviral têm sido importantes para o desenvolvimento de abordagens relacionadas com a genotoxicidade insercional e a segurança da terapia gênica. Atualmente as técnicas de LAM-PCR e LM-PCR são os métodos mais utilizados na análise dos sítios de integração de células transduzidas, entretanto são técnicas bastante complicadas e pouco eficientes para a detecção da dinâmica da população celular. Métodos de sequenciamento de segunda geração vêm sendo amplamente utilizados para análise dos sítios de integração; principalmente em combinação com a tecnologia de LAM-PCR, pois aumenta o número de sítios de integração que podem ser analisados. Entretanto ainda é uma tecnologia nova que precisa ser aprimorada, apresentando muitos erros de análise (BIASCO et al., 2012).

Apresentamos neste trabalho uma nova tecnologia para a análise da dinâmica de populações celulares que sofreram transdução por vetores retrovirais e que poderá servir para a análise da genotoxicidade desses vetores. Essa nova tecnologia foi nomeada de código de barras.

Pensando-se numa abordagem clínica, o código de barras poderia ser aplicado em protocolos de terapia gênica contra o vírus da imunodeficiência humana

(HIV). No trabalho de Levine et al., 2006, os autores descrevem observações de um protocolo fase I, com cinco pacientes que receberam a infusão de células T CD4+ autólogas, transduzidas com um vetor lentiviral replicante, o qual possui um cassete de RNA antisenso contra o envelope do vírus selvagem. Os autores relatam que decorridos até 3 anos, não houve indícios de mutagênese insercional lentiviral. O código de barras poderia fornecer informações sobre a variabilidade da população viral, indicando a prevalência de um determinado clone, ou mesmo possibilitar sua identificação. Esta identificação poderia ser de grande valia, pois permitiria correlacionar a variante viral com aspectos e prognósticos do tratamento.

Ainda na clínica, o código de barras poderia ser aplicado para acompanhar a evolução de pacientes submetidos aos protocolos de terapia gênica com vetores retrovirais, com o alvo de monitorar eventos de proliferação clonal e possibilitando uma rápida detecção e quantificação. Por exemplo, doenças como a leucemia linfoblástica aguda (LLA), observada no protocolo de tratamento de SCID-X1 (HACEYIN-BEY-ABINA et al., 2003), que caracterizam-se por apresentar uma progressão extremamente agressiva, poderiam ser beneficiadas com a utilização do monitoramento pelo código de barras.

A LLA destaca-se entre as doenças malignas mais frequentes na infância, representando quase um terço dos casos de câncer pediátricos. Dos casos de LLA, 85% acometem a linhagem de células B e 15% a linhagem de células T (ZHANG et al., 2012). A incidência de leucemia linfoblástica aguda de células T aumenta com a idade, sendo os meninos os mais frequentemente afetados. A causa de T-LLA ainda é desconhecida, apesar de alguns casos serem associados com síndromes genéticas hereditárias ou imunodeficiências congênitas.

O diagnóstico da doença é feito inicialmente pela análise das células sanguíneas, na procura de linfoblastos. Após o diagnóstico inicial, é feita a punção da medula óssea, ou mielograma, para análise de células leucêmicas. Tanto as células sanguíneas quanto as células da medula óssea podem ser utilizadas em análises citogenéticas e imunofenotipagem. O diagnóstico e os tratamentos estão em constante aperfeiçoamento, o que leva a uma taxa de cura dos pacientes com T-LLA maior que 80%. Apesar de ser possível verificar um aumento de uma determinada população celular através do diagnóstico clínico, é difícil verificar sua

clonalidade. Desta forma, o código de barras poderia facilitar a análise molecular para o diagnóstico desta clonalidade.

Os efeitos adversos da terapia gênica, também são atribuídos a parâmetros como carga viral (HACEYIN-BEY-ABINA et al., 2003) e gene terapêutico (WOODS et al., 2006a), poderiam ser avaliados pela tecnologia do código de barras. No trabalho descrito por Woods et al., 2006a, o gene terapêutico *IL2RG* é descrito como potencialmente oncogênico, favorecendo a proliferação clonal em células de medula óssea transduzidas com um vetor lentiviral contendo o gene terapêutico. Este resultado foi discutido em outros artigos, como visto nos comentários de Pike-Overzet et al., 2006, Woods et al., 2006b, Thrasher et al., 2006. Utilizando-se o código de barras, poderíamos verificar quantitativamente a influência do gene *IL2RG* na proliferação clonal, utilizando nosso sistema lentiviral portador o código de barras. Desta forma o código de barras seria uma ferramenta muito útil no auxílio ao desenvolvimento de vetores mais seguros, viabilizando ensaios *in vitro*, antes de aplicações clínicas.

O estudo do perfil de integração também tem sido aplicado no rastreamento de clones de células-tronco hematopoiéticas. Nesse caso, o sítio de integração em células-tronco hematopoiéticas transduzidas é utilizado como rótulo para a identificação da hierarquia das diferentes linhagens que são originadas de um progenitor em comum. Neste sentido Gerrits et al. (2010), marcaram vetores gamaretrovirais com sequências aleatórias, a fim de verificar o espectro de clones de célula-tronco ativos em um transplante. Em uma tecnologia semelhante à proposta por nós, os autores uniram o código de barras desenvolvido por eles com um método de detecção baseado em sequenciamento. Diferentemente de nossa proposta, embora estes autores também utilizem o sequenciamento como ferramenta de análise do código de barras, eles não o usam de forma quantitativa, fazendo apenas análises qualitativas, para verificar a clonalidade da atividade *in vivo* em longo prazo da população HSC transduzida.

Mais recentemente Lu et al. (2011) combinaram a tecnologia de código de barras em vetor lentiviral com o sequenciamento em larga escala para rastrear a diferenciação *in vivo* de HSC. Neste trabalho foi possível a identificação e quantificação de cada código de barras recuperados da população celular. Segundo os autores, a tecnologia é altamente sensível e poderia ser aplicada na identificação

precoce de eventos oncogênicos em protocolos de terapia gênica, permitindo de identificar o local e as células malignas.

O aperfeiçoamento das metodologias de sequenciamento através do desenvolvimento de sequenciadores de segunda geração (*NGS - Next-generation sequencing*) conferiu ao sequenciamento a capacidade de realizar análises quantitativas da expressão gênica através do sequenciamento de RNA, e vem sendo amplamente utilizado para mapeamento de doenças, sequenciamento *de novo* e estudos de genética de população. Entretanto, por se tratar de uma tecnologia muito recente, ainda apresenta alta taxa de erros devido a diferentes fatores que incluem problemas de rotulamento das bases e alinhamento. Assim, a aplicação de NGS para análises de SNPs ainda precisa ser aprimorada, através do desenvolvimento de *softwares* de análise mais sofisticados (NIELSEN et al., 2011).

Desta forma, diferentemente do trabalho de LU et al. (2011) que utiliza a tecnologia de quantificação clonal por códigos de barras aliada com NGS, nosso trabalho utiliza-se do sequenciamento Sanger, que é uma metodologia mais consolidada na literatura para análise de SNPs. Com isso, acreditamos minimizar as taxas de erros da análise do sequenciamento, uma vez que baseamos a análise do código barras nos resultados do *Polyphred* um programa de análise amplamente utilizado para análise de SNPs. Contudo, entendemos que o NGS é uma tecnologia de ponta, que naturalmente será umas das tecnologias de sequenciamento mais amplamente utilizadas, entretanto, a tecnologia aqui proposta é atrativa por sua simplicidade e eficiência, além de ser facilmente acessível, podendo ser facilmente implementada.

Uma importante aplicação do código de barras está relacionada com a análise dos sítios de integração retroviral. Neste contexto, será necessária a modificação do vetor atual, de forma que o código de barras seja inserido próximo ao LTR.

A partir dos ensaios preliminares realizados com os clones da biblioteca contendo um protótipo do código de barras, verificamos a possibilidade de utilizar a metodologia de análise de concentrações em função das amplitudes do cromatograma. Levando-se em conta que as observações experimentais indicaram um erro de cerca de 10% e uma correlação linear acima de 99%, consideramos este resultado significativo para assegurar a viabilidade da metodologia de análise

utilizando o código de barras aliado com sequenciamento para quantificação de populações mistas de clones.

Os resultados apresentados mostraram que é possível quantificar a complexidade da população através do código de barras. Experimentos preliminares revelaram que a composição das sequências contidas no protótipo do código de barras não influencia a análise do sequenciamento, assim com base nestes experimentos foi feito o desenho do código de barras a ser utilizado para a construção dos vetores lentivirais. Utilizando os vetores lentivirais contendo o código de barras em ensaios realizados em cultura de células e também nos ensaios *in vivo*, foi possível validar o caráter quantitativo e de identificação da mudança na dinâmica populacional. É interessante notar que, a alteração na dinâmica populacional observada nos ensaios *in vivo*, ocorreu na ausência de alteração no leucograma, indicativa de leucemia. Resta confirmação, mas é possível que a análise do código de barras tenha revelado uma expansão clonal mesmo antes do aparecimento de sinais fisiológicos de mudanças nas populações hematopoiéticas, como observado no grupo de animais que receberam células transduzidas com o vetor contendo LMO2. Em contrapartida, nestas análises o gene IL2RG parece não induzir a mudança na população.

Assim, foi apresentada neste trabalho uma proposta inovadora para desenvolver uma metodologia que servirá para monitorar o grau de complexidade de uma população transduzida com um vetor lentiviral. Esta medida de complexidade possibilitará obter uma indicação não apenas qualitativa, como também quantitativa, da prevalência de uma população clonal, conforme comprovado pelos ensaios aqui descritos.

REFERÊNCIAS

- AIUTI, A. et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 447–458, 2009.
- AMBROSI, A. et al. Estimated comparative integration hotspots identify different behaviors of retroviral gene transfer vectors. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.
- BAJGELMAN, M. C.; COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUS, B. E. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 97-106, 2003.
- BIASCO, L., BARICORDI, C., AIUTI, A. Retroviral integrations in gene therapy trials **Molecular Therapy**, p. 1-8, 2012.
- BERKOWITZ, R. et al. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. **Journal of virology**, v. 75 n. 7, p. 3371–3382, 2001.
- BERNS, K. et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. **Nature**, v. 428, n. 6981, p. 431-437, 2004.
- BLAESE, R. M. et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 475-480, 1995.
- BLESCH, A. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. **Methods**, v. 33, n.2, p. 164-172, 2004.
- BONDARENKO, V. A.; JIANG, Y. I.; STUDITSKY, V. M. Rationally designed insulator-like elements can block enhancer action in vitro. **Embo Journal**, v. 22, n. 18, p. 4728-4737, 2003.
- BORDIGNON, C. et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. **Science**, v. 270, p.470–475, 1995.
- BRENNER S.; MALEC, H. L. Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1640, p. 1 – 24, 2003.
- BURNS, J. C. et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 17, p. 8033-8037, 1993.
- CAVAZZANA-CALVO, M. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 669-672, 2000.

CAVAZZANA-CALVO, M.; FISCHER, A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 6, p. 1456-1465, 2007.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. (ed.). **Retroviruses**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 843 p., 1997. ISBN-10: 0-87969-571-4.

COIL, D. A.; MILLER, A. D. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. **Journal of Virology**, v. 78, p. 10920–10926, 2004.

COLLIN, J.; LAKO, M. Concise review: Putting a finger on stem cell biology: zinc finger nuclease-driven targeted genetic editing in human pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 29, p. 1021–1033, 2011.

COLLINS, M. K. **Practical Molecular Virology**. Publisher: Humana Press, 352 p., 1991. ISBN. 0896031918.

DANI, S. U. The challenge of vector development in gene therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n.2, p. 133-145, 1999.

DELELIS, O. et al. Chromosomal tethering and proviral integration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, n. 3-4, p. 207-216, 2010.

DELEND, C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, p. 125-138, 2004. Supplement 1.

DERSE, D. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. **Journal of Virology**, v. 81, p. 6731-6741, 2007.

DULL, T. et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of Virology**, v. 72, n11, p. 8463-8471, 1998.

ESCORS, D.; KARINE BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 58, n. 2, p. 107–119, 2010.

GASMI, M. et al. Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3., p. 1828-1834, 1999.

GASPAR, H. B. et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. **Lancet**, v. 364, n. 9452, p. 2181-2187, 2004.

GASPAR, H. B. et al. Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. **Molecular Therapy**, v. 14, p. 505–513, 2006.

GASPAR, H.B. et al. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Adenosine Deaminase-Deficient Severe Combined Immunodeficiency Leads to Long-Term Immunological Recovery and Metabolic Correction. **Science Translational Medicine**, v. 3, p. 1-9, 2011.

GERRITS, A. et al. Cellular barcoding tool for clonal analysis in the hematopoietic system. **Blood**, v. 115, n. 131, p. 2610-2618, 2010.

GREZ, M. et al. Gene Therapy of Chronic Granulomatous Disease: The Engraftment Dilemma. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 1, p. 28-35, 2011.

GUIBINGA, G. H. et al. Cell surface heparan sulfate is a receptor for attachment of envelope protein-free retrovirus-like particles and VSV-G pseudotyped MLV-derived retrovirus vectors to target cells. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 5, p. 538-546, 2002.

HACEIN-BEY-ABINA, S. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, p. 3132-3142, 2008.

HACEIN-BEY-ABINA, S. et al. *LMO2*-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. **Science**, v. 302, n. 5644, p. 415-419, 2003.

HACEIN-BEY-ABINA, S. et al. Sustained Correction of X-Linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1185-1193, 2002.

HAROLD, V. Retroviruses. **Science**, v. 240, p. 1427-1435, 1988.

HATTORI, M. et al. Orphan peak analysis: a novel method for detection of point mutations using an automated fluorescence DNA sequencer. **Genomics**, v. 15, n. 2, p. 415-417, 1993.

HOOGERBRUGGE, P. M. et al. Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. **Gene Therapy**, v. 3, p. 179-183, 1996).

HOWE, S. J. et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, p. 3143-3150, 2008.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUS (ICTV), Virology Division – IUMS, 2009. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em: 15 Janeiro 2012.

JANEWAY, C.A. Jr. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th ed. New York: **Garland Science**, 2001.

KATZ, R. A.; SKALKA, A. M. The retroviral enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 133-173, 1994.

Kadmas, J. L; Beckerle, M. C. The lim domain: from the cytoskeleton to the nucleus. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 920-931, 2004.

KOCH, U; RADTKE, F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 9, p. 434-442, 2011.

KOHN, D. B. et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. **Nature Medicine**, v. 1, p. 1017–1023, 1995.

KOHN, D. B. Update on gene therapy for immunodeficiencies. **Clinical Immunology**, v. 135, p. 247–254, 2010.

KWOK, P. Y. et al. Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products. **Genomics**, v. 23, n. 1, p. 138-144, 1994.

KUSTIKOVA, O. S.,BAUM, C.,FEHSE, B. Retroviral integration site analysis in hematopoietic stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 430, p 255-267, 2008.

LAUFS, S. et al. Safety Analysis in Retroviral Gene Therapy: Identifying Virus Integration Sites in Gene-Modified Cells. IN: PATRINOS, G.P; ANSORGE, W. J. (Eds). **Molecular Diagnostics**. 2nd edition. Academic Press, 2010. Cap 32, p. 471-484.

LEVINE, B. L. et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 46, p. 17372-17377, 2006.

LLANO, M. et al. An Essential Role for LEDGF/p75 in HIV Integration. **Science**, v. 314, p. 461-464, 2006.

LU, R. et al. Tracking single hematopoietic stem cells in vivo using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 928-934, 2011.

MITCHELL, R. S. et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. **PLoS Biology**, v. 2, n. 8, p. E234, 2004.

MIYOSHI, H. et al. Development of a self-inactivating lentivirus vector. **Journal of Virology**, v. 72, n. 10, p. 8150-8157, 1998.

MONTINI, E. et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 687-696, 2006.

MUUL, L. M. et al. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2563-2569, 2003.

NALDINI, L. et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 11382–11388, 1996a.

NALDINI, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263-267, 1996b.

NARDI, N. B.; TEIXEIRA, L. A. K.; SILVA, E. F. A. Gene therapy. **Ciência e saúde coletiva**, v. 7, n.1, p. 109-116, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csc/v7n1/a10v07n1.pdf>>. Acesso em: 10 Jan. 2012.

NAVIAUX, R. K. et al. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5701-5, 1996.

NICKERSON, D. A.; TOBE, V. O.; TAYLOR, S.L. PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 14, p. 2745-2751, 1997.

NIELSEN, R. et al. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 443-451, 2011.

NISOLE, S.; SAIB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v. 1, n. 9, 2004. doi:10.1186/1742-4690-1-9.

OLSEN, J. C. Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. **Gene Therapy**, v. 5, n. 11, p. 1481-1487, 1998.

OTT, M. G. et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. **Nature Medicine**, v. 12, p. 401–409, 2006.

PAGON, R.A. et al. (ed.) Gene Reviews. Seattle (WA):**University of Washington**, Seattle; 1993.

PARKER, L. T. et al. Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry. **Biotechniques**, v. 19, n. 1, p. 116-121, 1995.

PIKE-OVERZET, K. et al. Gene therapy: is *IL2RG* oncogenic in T-cell development? **Nature**, v. 443, n. 7109, p. E6-7, 2006.

PIKE-OVERZET, K. et al. New Insights and Unresolved Issues Regarding Insertional Mutagenesis in X-linked SCID Gene Therapy. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 11, p. 1910–1916, 2007.

POESCHLA, E. M.; WONG-STAAAL, F.; LOONEY, D. J. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. **Nature Medicine**, v. 4, n. 3, p. 354-357, 1998.

PORTEUS, M.H.; CARROLL, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 967–973, 2005.

RAIMONDI, S.C. T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, 2007. Disponível em <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/TALLID1374.html>. Acesso em: 10 Dez 2011.

RAMEZANI, A.; HAWLEY, R. G. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. **Current Protocols in Molecular Biology**, Cap 16, Unit 16.21, Supp 60, 2002.

ROBBINS, P. D.; TAHARA, H.; GHIVIZZANI, S. Viral vectors for gene therapy. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 35-40, 1998.

SCHRÖDER, A. R. et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hot-spots. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 521–529, 2002.

SHOU, Y. et al. Unique risk factors for insertional mutagenesis in a mouse model of XSCID gene therapy. **PNAS**, v. 103, n. 31, p. 11730-11735, 2006.

SMITH, J.; DANIEL, R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. **ACS Chemical Biology**, v. 1, p. 217–226, 2006.

SORRENTINO, B. Assessing the Risk of T-cell Malignancies in Mouse Models of SCID-X1. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 5, p. 868-870, 2010.

STEIN, S. et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. **Nature Medicine**, v. 16, p. 198–204, 2010.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Human Molecular Genetics**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 576 p., 1999. ISBN-10: 1-85996-202-5.

STRAUSS, B. E. et al. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: a potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 4, p. 1411-1418, 2006.

STRAUSS, B. E.; BAJGELMAN, M. C.; COSTANZI-STRAUSS, E. A novel gene transfer strategy that combines promoter and transgene activities for improved tumor cell inhibition. **Cancer Gene Therapy**, v. 12, n. 12, p. 935-946, 2005.

STRAUSS, B. E.; COSTANZI-STRAUSS, E. Combating oncogene activation associated with retrovirus-mediated gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 601-613, 2007.

SUZUKI, Y.; CRAIGIE, R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 187–196, 2007.

SRINIVASAKUMAR N. HIV-1 Vector Systems. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, n. 26, n. 1-6, p. 51-81, 2001.

SWAINSON, L. et al. Lentiviral Transduction of Immune Cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 415, p. 301-320, 2007.

TANG, H., KUHEN, K. L.; WONG-STAAAL, F. Lentivirus replication and regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 133-170, 1999.

THRASHER, A. J. Gene Therapy for Primary Immunodeficiencies. **Immunology And Allergy Clinics of North America**, v. 28, p. 457–471, 2008.

THRASHER, A. J. et al. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. E5-6; 2006.

TREANOR, L. M. et al. Functional interactions between Lmo2, the Arf tumor suppressor, and Notch1 in murine T-cell malignancies. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5453-5461, 2011.

UREN, A. G. et al. Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future. **Oncogene**, v. 24, p. 7656-7672, 2005.

VERSLUIS, L. F. et al. High-resolution HLA-DPB typing based upon computerized analysis of data obtained by fluorescent sequencing of the amplified polymorphic exon 2. **Human Immunology**, v. 38, n. 4, p. 277-283, 1993.

VIGNA, E. et al. Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 3, p. 252-261, 2002.

WANG, G.P. et al. HIV integration site selection: Analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. **Genome Research**, v. 17, p. 1186–1194, 2007.

WANG, G.P. et al. Dynamics of gene-modified progenitor cells analyzed by tracking retroviral integration sites in a human SCID-X1 gene therapy trial. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4356- 4366, 2012.

WEBER, K. et al. A multi-color panel of novel lentiviral gene ontology (LeGO) vectors for functional gene analysis. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 4, p. 698-706, 2008.

WHITCOMB, J. M.; HUGHES, S. H. Retroviral reverse transcription and integration: Progress and Problems. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 275-306, 1992.

WHITE, S. M. et al. Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 2832-2840, 1999.

WILEY, J. S. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide - provided by the Journal of Gene Medicine. Disponível em: <<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>> . Acesso em: 20 Jan. 2012.

WOODS, N. B. et al. Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1123, 2006a.

WOODS, W. I.; FALCAO, N. P.; TEIXEIRA, W. G. Biochar trials aim to enrich soil for smallholders. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 144, 2006b.

WU, X. et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. **Science**, v. 300, p. 1749–1751, 2003.

YI, Y.; HAHM, S. H.; LEE, K. H. Retroviral gene therapy: safety issues and possible solutions. **Current Gene Therapy**, v. 5, n. 1, p. 25-35, 2005.

ZHANG, J. et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 481, p. 157-163, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Alinhamento realizado com a ferramenta CLUSTALW2

A sequência clonada de *IL2RG* no vetor Lego-liGAU6 foi comparada com a sequência do GenBank BC014720.1. O start códon e o stop códon estão destacados em cinza. Os asteriscos (*) mostram as bases coincidentes das duas sequências. Em preto estão destacadas as sequências que correspondem ao vetor Lego-liGAU6, mas que não apresentam homologia com o gene de interesse.

Lego-IiGAU6 BC014720.1	CTCTGCTCCGAGCTCTATAAAGAGCTCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTCCGAT	60
Lego-IiGAU6 BC014720.1	TGACTGAGTCGCCCCGATCCCAGTGTGGTGGTACGGGAATTCAGAGCAAGCACCATGTTG	120
	-----GAA-----GAGCAAGCACCATGTTG	20
	*** *****	
Lego-IiGAU6 BC014720.1	AAACTATTATTGTCACCTAGATCCTTCTTAGTCCTTCAGCTGCTCCTGCTGAGGGCAGGG	180
	AAACTATTATTGTCACCTAGATCCTTCTTAGTCCTTCAGCTGCTCCTGCTGAGGGCAGGG	80

Lego-IiGAU6 BC014720.1	TGGAGCTCCAAGGTCTCATGTCCAGTGCGAATGAAGACATCAAAGCTGATTTGATCCTG	240
	TGGAGCTCCAAGGTCTCATGTCCAGTGCGAATGAAGACATCAAAGCTGATTTGATCCTG	140

Lego-IiGAU6 BC014720.1	ACTTCTACAGCCCCTGAACACCTCAGTGCTCCTACTCTGCCCCCTTCCAGAGGTTCAAGTGC	300
	ACTTCTACAGCCCCTGAACACCTCAGTGCTCCTACTCTGCCCCCTTCCAGAGGTTCAAGTGC	200

Lego-IiGAU6 BC014720.1	TTTGTGTTCAACATAGAGTACATGAATTGCACTTGGAAATAGCAGTTCTGAGCCTCAGGCA	360
	TTTGTGTTCAACATAGAGTACATGAATTGCACTTGGAAATAGCAGTTCTGAGCCTCAGGCA	260

Lego-IiGAU6 BC014720.1	ACCAACCTCACGCTGCACTATAGGTACAAGGTATCTGATAATAATACATTCCAGGAGTGC	420
	ACCAACCTCACGCTGCACTATAGGTACAAGGTATCTGATAATAATACATTCCAGGAGTGC	320

Lego-IiGAU6 BC014720.1	AGTCACTATTTGTTCTCCAAGAGATTACTTCTGGCTGTCAGATACAAAAAGAAGATATC	480
	AGTCACTATTTGTTCTCCAAGAGATTACTTCTGGCTGTCAGATACAAAAAGAAGATATC	380

Lego-IiGAU6 BC014720.1	CAGCTCTACCAGACATTTGTTGTCCAGCTCCAGGACCCCCAGAAACCCAGAGGCGAGCT	540
	CAGCTCTACCAGACATTTGTTGTCCAGCTCCAGGACCCCCAGAAACCCAGAGGCGAGCT	440

Lego-IiGAU6 BC014720.1	GTACAGAAGCTAAACCTACAGAATCTTGTGATCCACGGGCTCCAGAAAATCTAACAATC	600
	GTACAGAAGCTAAACCTACAGAATCTTGTGATCCACGGGCTCCAGAAAATCTAACAATC	500

Lego-IiGAU6 BC014720.1	AGCAATCTGAGTGAATCCCAGCTAGAGCTGAGATGGAAAAGCAGACATATTAAAGAACGC	660
	AGCAATCTGAGTGAATCCCAGCTAGAGCTGAGATGGAAAAGCAGACATATTAAAGAACGC	560

Lego-IiGAU6 TGTTTACAATACTTGGTGCAGTACCGGAGCAACAGAGATCGAAGCTGGACGGAAC TAATA 720
 BC014720.1 TGTTTACAATACTTGGTGCAGTACCGGAGCAACAGAGATCGAAGCTGGACGGAAC TAATA 620

Lego-IiGAU6 GTGAATCATGAACCTAGATTCTCCCTGCCTAGTGTGGATGAGCTGAAACGGTACACATTT 780
 BC014720.1 GTGAATCATGAACCTAGATTCTCCCTGCCTAGTGTGGATGAGCTGAAACGGTACACATTT 680

Lego-IiGAU6 CGGGTTCGGAGCCGCTATAACCCA-TCTGTGGAAGTTCTCAACAGTGGAGTAAATGGAGC 839
 BC014720.1 CGGGTTCGGAGCCGCTATAACCCAATCTGTGGAAGTTCTCAACAGTGGAGTAAATGGAGC 740

Lego-IiGAU6 CAGCCTGTCCACTGGGGGAGTCATACTGTAGAGGAGAATCCTTCCTTGTGTTGCACTGGAA 899
 BC014720.1 CAGCCTGTCCACTGGGGGAGTCATACTGTAGAGGAGAATCCTTCCTTGTGTTGCACTGGAA 800

Lego-IiGAU6 GCTGTGCTTATCCCTGTTGGCACCATTGGGGTTGATTATTACCCTGATCTTTGTGTACTGT 959
 BC014720.1 GCTGTGCTTATCCCTGTTGGCACCATTGGGGTTGATTATTACCCTGATCTTTGTGTACTGT 860

Lego-IiGAU6 TGGTTGGAACGAATGCCTCCAATTCCCCCATCAAGAATCTAGAGGATCTGGTTACTGAA 1019
 BC014720.1 TGGTTGGAACGAATGCCTCCAATTCCCCCATCAAGAATCTAGAGGATCTGGTTACTGAA 920

Lego-IiGAU6 TACCAAGGGAACTTTTCGGCCTGGAGTGGTGTGTCTAAAGGGCTGACTGAGAGTCTGCAG 1079
 BC014720.1 TACCAAGGGAACTTTTCGGCCTGGAGTGGTGTGTCTAAAGGGCTGACTGAGAGTCTGCAG 980

Lego-IiGAU6 CCAGACTACAGTGAACGGTTCTGCCACGTCAGCGAGATTCCCCCAAAGGAGGGGCCCTA 1139
 BC014720.1 CCAGACTACAGTGAACGGTTCTGCCACGTCAGCGAGATTCCCCCAAAGGAGGGGCCCTA 1040

Lego-IiGAU6 GGAGAGGGGCCTGGAGGTTCTCCTTGCGAGCCTGCATAGCCCTTACTGGCCTCCCCCATGT 1199
 BC014720.1 GGAGAGGGGCCTGGAGGTTCTCCTTGCGAGCCTGCATAGCCCTTACTGGCCTCCCCCATGT 1100

Lego-IiGAU6 TATTCTCTGAAGCCGGAAGCCTGAACATCAATCCTTTGATGGAACCTCAAAGTCCTATAG 1259
 BC014720.1 TATTCTCTGAAGCCGGAAGCCTGAACATCAATCCTTTGATGGAACCTCAAAGTCCTATAG 1160

Lego-IiGAU6 TCCTAAGTGACGCTAACCTCCCCTACTCACCTTGGCAATCTGGATCCAATGCTCACTGCC 1319
 BC014720.1 TCCTAAGTGACGCTAACCTCCCCTACTCACCTTGGCAATCTGGATCCAATGCTCACTGCC 1220

Lego-IiGAU6 -----CGGGCCC-----CTACGTAA-----ATTCC----- 1339
 BC014720.1 TTCCCTTGGGGCTAAGTTTCGATTTCCTGTCCCATGTAAC TGCTTTTCTGTTCCATATGC 1280
 * * * * * * * * * *

Lego-IiGAU6 -----GCCCCCCCCCCC-----CCTCCC-----CCT----- 1360
 BC014720.1 CCTACTTGAGAGTGTCCCTTGCCCTCTTTCCCTGCACAAGCCCTCCCATGCCAGCCTAA 1340
 * * * * * * * * * *

Lego-IiGAU6 -----
 BC014720.1 CACCTTTCCACTTTCTTTGAAGAGAGTCTTACCCTGTAGCCAGGGTGGCTGGGAGCTCA 1400

Lego-IiGAU6 -----
 BC014720.1 CTATGTAGGCCAGGTTGGCCTCCAACCTCACAGGCTATCCTCCCACCTCTGCCTCATAAGA 1460

Lego-IiGAU6 -----
 BC014720.1 GTTGGGGTTACTGGCATGCACCACCACACCCAGCATGGTCTTCTCTTTTATAGGATTCT 1520

Lego-IiGAU6 -----
 BC014720.1 CCCTCCCTTTTTTCTACCTATGATTCAACTGTTTCCAAATCAACAAGAAATAAAGTTTTTA 1580

Lego-IiGAU6 -----
 BC014720.1 ACCAATAAAAAAAAAAAAAA 1600

APÊNDICE B – Alinhamento realizado com a ferramenta CLUSTALW2

A sequência clonada de *LMO2* no vetor Lego-LiGAU6 comparada com a sequência do GenBank BC057880.1. O start códon e o stop códon estão destacados em cinza. Os asteriscos (*) mostram as bases coincidentes das duas sequências. Em preto estão destacadas as sequências que correspondem ao vetor Lego-LiGAU6, mas que não apresentam homologia com o gene de interesse.

```

Lego-LiGAU6      -----
BC057880.1      GCCCCTCACTGCCCCGGCGCCCCGACCCGGCGAAGGTGCGAGGGGCTCGGGGCGACC 60

Lego-LiGAU6      -----CTCTG----- 5
BC057880.1      GGGCGGAGCCGGCTACTGCGCGGATCGGGACCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCTGTGGTGA 120
                      ** **

Lego-LiGAU6      -----TTCCGAGCT-----CTAT----- 18
BC057880.1      CGGCAGCGGGACCGGGATGGAAGGTTAAGTCTTGAGCAGCGGCAGCTGTGCGAGCCACCG 180
                      * * ****          ** *

Lego-LiGAU6      -AAAGAG-----CTCCAACCCCTCACT-----CGGCGCGCCAGTC----- 52
BC057880.1      GAGGGAGGCCGGGCTGCTCCCCGGCCCCCTGCCCTGGCCGCCGCGCCGGGCGAGCTGGA 240
                      *   ***          * * **** * * * * * * *

Lego-LiGAU6      -----CTC-----CGATTCA-----CTGAG----- 67
BC057880.1      TGATTGCTCTCTCTCTTTGGCGTTTGAAGGGAGCGCGGTGACTGTCTTGTAGCGTGGAG 300
                      ***          ** ****          ****

Lego-LiGAU6      -----TCGCC-----CGGATC-----CCAGTGTGGTGGTAC----- 93
BC057880.1      GGGCGAGCTCGCCAGCGGAGCGACCGAGCAAGAGGAGGCGCAGGAGCGGGCGGCGCCGAG 360
                      ***** ** * * * * *

Lego-LiGAU6      -----GGGAATTTCGC-----CCTTAAAGAA----- 113
BC057880.1      CACCCGAGGGGTCCGAGTCCAGGCAGCTAGCCAGCCACGCGCCACAAAGGGAGCGCCCC 420
                      *** * * *          ** ****

Lego-LiGAU6      -----TCCCCCTCCCCAATGTCCTCGGCCATCGAAAGGAAGAGCCTGG 156
BC057880.1      CGCCGCCCCGGCACGCGCCCCCTCCCCAATGTCCTCGGCCATCGAAAGGAAGAGCCTGG 480
                      *****

Lego-LiGAU6      ACCCGTCTGAGGAACCCGTGGATGAGGTGCTGCAGATACCCCATCCCTGCTGACATGTG 216
BC057880.1      ACCCGTCTGAGGAACCCGTGGATGAGGTGCTGCAGATACCCCATCCCTGCTGACATGTG 540
                      *****

Lego-LiGAU6      GTGGCTGCCAGCAGAACATAGGGGACCGCTACTTCCTGAAAGCCATCGACCAGTACTGGC 276
BC057880.1      GTGGCTGCCAGCAGAACATAGGGGACCGCTACTTCCTGAAAGCCATCGACCAGTACTGGC 600
                      *****

Lego-LiGAU6      ATGAGGATTGCCTCAGCTGTGACCTCTGTGGGTGTCGGCTGGGAGAGGTGGGGAGGCGCC 336
BC057880.1      ATGAGGATTGCCTCAGCTGTGACCTCTGTGGGTGTCGGCTGGGAGAGGTGGGGAGGCGCC 660
                      *****

Lego-LiGAU6      TCTACTACAAGCTGGGACGGAAATTGTGCAGGAGAGACTATCTCAGGCTTTTGGTCAGG 396
BC057880.1      TCTACTACAAGCTGGGACGGAAATTGTGCAGGAGAGACTATCTCAGGCTTTTGGTCAGG 720
                      *****

Lego-LiGAU6      ATGGTCTCTGTGCATCCTGTGACAAGCGGATCCGTGCCTATGAGATGACGATGCGGGTGA 456
BC057880.1      ATGGTCTCTGTGCATCCTGTGACAAGCGGATCCGTGCCTATGAGATGACGATGCGGGTGA 780
                      *****

```


Lego-LiGAU6 AAGACAAAGTGTATCACCTGGAGTGTTCAAATGCGCCGCTGTCAGAAGCATTTCTGTG 516
 BC057880.1 AAGACAAAGTGTATCACCTGGAGTGTTCAAATGCGCCGCTGTCAGAAGCATTTCTGTG 840

Lego-LiGAU6 TAGGTGACAGATACCTTCTCATCAACTCCGACATAGTGTGTGAACAAGACATCTACGAGT 576
 BC057880.1 TAGGTGACAGATACCTTCTCATCAACTCCGACATAGTGTGTGAACAAGACATCTACGAGT 900

Lego-LiGAU6 GGACCAAGATCAATGGGATCATCTAGGCCAGAGTCCCAGGCACCTGGTGTGGGGAGGTGT 636
 BC057880.1 GGACCAAGATCAATGGGATCATCTAGGCCAGAGTCCCAGGCACCTG--TGGGGAGGTGT 957

Lego-LiGAU6 TCAGTGAAGACGC----- 649
 BC057880.1 TCAGTGAAGACGCCGTCTCGGTGTGGTCTTCACCTCTAGGCTCTTTGGGAACCTGAGGGT 1017

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 GGGTGAGGCATTTCTTAGGAGATTATGGACTCTTCCTGGGCACCTAACGACATAGCAATCA 1077

Lego-LiGAU6 -----GCGCC-----CAAAAAGGGC-----GAAAT 668
 BC057880.1 CATGACATAATGCAAAGGCTGAGACTTCAGTGACAAAAAGGACCAGCCCTTAGAGAGAAT 1137
 *** * ***** * ****

Lego-LiGAU6 TCCTC-----CAGGCC-----TCGACGAG-----GGCC 691
 BC057880.1 TTATGGTACAGGCTAGCCATAGTAAGTACAGAAATAGTGGAGGAAATATTTGGGGACC 1197
 * ** ***** *** ** * **

Lego-LiGAU6 GCGCGCC-----CGCGGCC-- 705
 BC057880.1 AGCATGCACCTGTGCCATCCTGATAGGCTTCCCCAGGTAAGTATCGATTAGATGTGACCTT 1257
 ** ** * *

Lego-LiGAU6 -----GCTAC-----CT 712
 BC057880.1 GGTGTTTCATGGACTAGAGTTGTGCAATTAATTTTTTCCTGGCTTTGGTAAGTACCTGTT 1317
 **** **

Lego-LiGAU6 -----AAAT-----TCGCCCCC-----C 725
 BC057880.1 CTAGTCACAGTCCCTTCACACTAGGAAAGGAAAGAGAGAAGAAATAGTCACTCTTTTTC 1377
 **** * * * *

Lego-LiGAU6 CCCCCCCCCTTTTTCG----- 769
 BC057880.1 TTTCTTTCTTTTTCCTTGGTCACCTTCCCGTGGCCTTAAGCTCTGGAGCCAAGGGAAC 1437
 * * *****

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 TGCATGGAGGTACATTTTCAGTTGGGAATGAAATCCACATCTTTCAACCAGACAAATATTT 1497

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 ATAGCGATGTTGATGAATCACTGTTTTTAGACACCTTCATTTTGAGGTGAGGCGCCCCAC 1557

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 AGATTGTTTCTATACAAATGTAAATCTTAAAAAAGGTCAAAGTTGTTCAACTATTT 1617

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 TATTATCTTAGATTATATCAAAGTATTTGTTGTGTGTCATTAAAAAAGTCTCGATTCT 1677

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 GAAGACTTAATAAAAAATGACAAGCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1737

Lego-LiGAU6 -----
 BC057880.1 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1779

ANEXOS

ANEXO A - Resultados dos exames de sangue da segunda coleta

No campo nomeado “Amostras do pesquisador” é possível identificar o animal analisado e o grupo ao qual ele pertence, sendo que o primeiro número corresponde ao grupo e o segundo número ao animal. Por exemplo, 2-1 indica o grupo 2 e o animal número 1. A divisão dos grupos é apresentada no Quadro 8.

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26253
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 25.11.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 16 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2297	2298	2299	2300	2301	2301	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	
WBC x 10 ³ / mm ³	7.0	6.9	7.0	6.2	9.1	8.7	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	02	03	02	01	0	0	0.84 - 3.64
Linfócitos %	73	65	71	71	73	84	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	04	07	05	09	06	04	0
Segmentados %	21	27	22	19	21	12	0
Neutrófilos %	25	34	25	28	27	16	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	2-1	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 20 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					Mielócitos Neutrófilos 7 %
		Coloração: Hiperchromia					RDW ≥ 14 %
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					RDW ≥ 14 %
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-3	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 30 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					RDW ≥ 14 %
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-4	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 25 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					RDW ≥ 14 %
		Coloração: Normochromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-5	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 20 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					Mielócitos Neutrófilos 6 %
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-1	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 20 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					Mielócitos Neutrófilos 5 %
		Coloração: Normochromia					RDW ≥ 14 %
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26253
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 25.11.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 16 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2303	2304	2305	2306	2307	2308	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	3-2	3-3	3-4	3-5	4-1	4-2	
WBC x 10 ³ / mm ³	6.4	5.4	8.7	8.7	4.0	6.2	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	0	0	0	02	01	0	0.84 - 3.64
Linfócitos %	80	82	73	71	60	72	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	06	0	04	12	10	04	0
Segmentados %	14	0	23	15	29	24	0
Neutrófilos %	20	18	27	27	39	28	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	N	↑↑	N	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	3-2	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 15 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					Mielócitos Neutrófilos 6 %
		Coloração: Hiperchromia					RDW ≥ 14 %
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					RDW ≥ 15 %
		Coloração: Normochromia					
		Plaquetas: Normais					
	3-4	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 5 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					RDW ≥ 14 %
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-5	Tamanho: Macrocitose					Linfócitos Atípicos 40 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					RDW ≥ 14 %
		Coloração: Normochromia					
		Plaquetas: Normais					
	4-1	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normochromia					RDW ≥ 14 %
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	4-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					RDW ≥ 14 %
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26253
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 25.11.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 16 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2309	2310	2311	2312	2313	2314	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	4-3	4-4	5-1	5-2	5-3	5-4	
WBC x 10 ³ / mm ³	6.8	7.7	7.1	7.8	12.3	5.8	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	0	0	0	0	0	0	0.84 - 3.64
Linfócitos %	70	83	80	76	82	78	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	05	0	05	04	0	08	0
Segmentados %	25	17	15	20	18	14	0
Neutrófilos %	30	17	20	24	18	22	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	4-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	4-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 10 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-4	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26253
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 25.11.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 16 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2315	2316	2317	2318	2319	2320	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	5-5	6-1	6-2	6-3	7-1	7-2	
WBC x 10 ³ / mm ³	8.1	8.0	7.0	5.3	6.2	4.9	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	0	0	0	0	0	0	0.84 - 3.64
Linfócitos %	85	85	80	75	75	84	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	0	0	05	06	07	0	0
Segmentados %	15	15	10	19	18	16	0
Neutrófilos %	15	15	15	26	25	16	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	N	N	↑↑	N	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	5-5	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	6-1	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normais					
	6-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 10 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normais					
	6-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	7-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Normais					
	7-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26253
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 25.11.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 16 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2321	2322					FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	7-3	7-4					
WBC x 10 ³ / mm ³	4.8	6.3					2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0					0.33 - 0.47
Monócitos %	0	0					0.84 - 3.64
Linfócitos %	81	70					65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0					0.19 - 0.21
Bastonetes %	0	09					0
Segmentados %	19	21					0
Neutrófilos %	19	30					15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	N	↑↑					200 - 300
Morfologia Celular	7-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia RDW ≥ 14 %					
		Plaquetas: Normais					
	7-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose RDW ≥ 14 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

ANEXO B - Resultados dos exames de sangue da quarta coleta

No campo nomeado “Amostras do pesquisador” é possível identificar o animal analisado e o grupo ao qual ele pertence, sendo que o primeiro número corresponde ao grupo e o segundo número ao animal. Por exemplo, 2-1 indica o grupo 2 e o animal número 1. A divisão dos grupos é apresentada no Quadro 8

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26625
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 19.12.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 20 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2610	2611	2612	2613	2614	2615	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	
WBC x 10 ³ / mm ³	7.3	8.4	6.8	6.4	5.6	4.7	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	01	02	01	01	02	02	0.84 - 3.64
Linfócitos %	74	82	73	79	64	82	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	02	03	02	03	07	05	0
Segmentados %	21	10	22	14	20	06	0
Neutrófilos %	23	13	24	17	27	11	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	N	N	N	N	N	N	200 - 300
Morfologia Celular	2-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 40 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
	2-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 30 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
	2-3	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 30 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
	2-4	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
	2-5	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 20 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
	3-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 40 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26625
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 19.12.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 20 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2616	2617	2618	2619	2620	2621	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	3-2	3-3	3-4	3-5	4-2	4-3	
WBC x 10 ³ / mm ³	2.0	3.1	4.4	5.7	5.0	4.7	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	01	03	0	0	0	0	0.84 - 3.64
Linfócitos %	84	81	83	85	84	82	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	03	02	03	03	02	03	0
Segmentados %	09	12	07	09	12	12	0
Neutrófilos %	12	14	10	12	14	15	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	N	N	200 - 300
Morfologia Celular	3-2	Tamanho: Macrocitose, Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-3	Tamanho: Macrocitose , Linfócitos Atípicos 30 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Normais					
	3-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-5	Tamanho: Macrocitose, Linfócitos Atípicos 40 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 30 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normais					
	4-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normais					
	4-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia, céls linfocíticas degenerativas 30 %					
		Plaquetas: Normais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26625
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 19.12.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 20 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2630	2622	2623	2624	2625	2626	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	4-4	5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	
WBC x 10 ³ / mm ³	5.2	6.4	5.4	8.8	3.3	6.3	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	01	0	01	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	01	01	0	0	01	01	0.84 - 3.64
Linfócitos %	74	80	63	72	75	77	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	06	04	09	05	03	04	0
Segmentados %	12	11	24	20	18	04	0
Neutrófilos %	18	15	33	25	21	08	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	N	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	4-4	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-1	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-3	Tamanho: Macrocitose, Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hiperocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-4	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 10 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-5	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 10 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26625
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 19.12.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 20 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2627	2628	2629	2631	2632	2633	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	6-1	6-2	6-3	7-1	7-2	7-3	
WBC x 10 ³ / mm ³	6.5	4.4	7.1	5.5	3.9	4.4	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	01	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	0	0	0	0	01	02	0.84 - 3.64
Linfócitos %	70	78	81	75	78	74	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	04	03	04	06	04	08	0
Segmentados %	22	16	11	12	13	08	0
Neutrófilos %	26	19	15	18	17	16	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	N	↑↑	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	6-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 35%					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 30%					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	6-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 20 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 30 %					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	6-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose Linfócitos Atípicos 20 %					
		Coloração: Hipocromia céls linfocíticas degenerativas 30 %					
		Plaquetas: Normais					
	7-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	7-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	7-3	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 20 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose, céls linfocíticas degenerativas 30 %					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 26625
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 19.12.2011
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 20 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	2634						FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	7-4						
WBC x 10 ³ / mm ³	5.2						2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0						0.33 - 0.47
Monócitos %	0						0.84 - 3.64
Linfócitos %	75						65.62 - 84.81
Basófilos %	0						0.19 - 0.21
Bastonetes %	07						0
Segmentados %	13						0
Neutrófilos %	20						15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑						200 - 300
Morfologia Celular	7-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hipocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					

Responsável: Marilda Spinelli /
CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

ANEXO C - Resultados dos exames de sangue da sexta coleta

No campo nomeado “Amostras do pesquisador” é possível identificar o animal analisado e o grupo ao qual ele pertence, sendo que o primeiro número corresponde ao grupo e o segundo número ao animal. Por exemplo, 2-1 indica o grupo 2 e o animal número 1. A divisão dos grupos é apresentada no Quadro 8

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27067
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 23.01.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 25 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	190	191	192	193	194	195	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	
WBC x 10 ³ / mm ³	5.8	6.9	4.7	5.1	5.6	8.7	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	01	0	01	02	03	0.33 - 0.47
Monócitos %	04	04	04	07	05	09	0.84 - 3.64
Linfócitos %	65	72	60	63	62	57	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	12	10	10	05	07	14	0
Segmentados %	19	13	26	24	24	17	0
Neutrófilos %	31	23	36	29	31	31	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	N	N	↑↑	N	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	2-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 10 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normais					
	2-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normais					
	2-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-4	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 30 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose céis linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hiperchromia Monoblastos 4 %					
		Plaquetas: Normais					
	2-5	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 45 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose céis linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hiperchromia Monoblastos 10 %					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 45 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose Monoblastos 25 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27067
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 23.01.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 25 semanas

Resultados Hematológicos								
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA	
PARÂMETROS	196	197	198	199	200	201	FEMEA	
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	3-2	3-4	3-5	4-2	4-3	4-4		
WBC x 10 ³ / mm ³	3.2	6.1	3.8	6.7	5.0	5.4	2.82 - 5.11	
Eosinófilos %	0	0	0	02	0	0	0.33 - 0.47	
Monócitos %	07	02	08	03	01	02	0.84 - 3.64	
Linfócitos %	61	67	56	63	65	61	65.62 - 84.81	
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21	
Bastonetes %	11	07	06	05	06	04	0	
Segmentados %	21	24	30	27	28	33	0	
Neutrófilos %	32	31	36	32	34	37	15.52 - 30.65	
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	↑↑	N	↑↑	↑↑	200 - 300	
Morfologia Celular	3-2	Tamanho: Macrocitose						Monoblastos 15 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						céis linfocíticas degenerativas 20 %
		Coloração: Normocromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	3-4	Tamanho: Macrocitose						Linfócitos Atípicos 10 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Normocromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	3-5	Tamanho: Macrocitose						Monoblastos 15 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						céis linfocíticas degenerativas 25 %
		Coloração: Hiperchromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	4-2	Tamanho: Macrocitose						Linfócitos Atípicos 40 %
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						céis linfocíticas degenerativas 30 %
		Coloração: Hiperchromia						
		Plaquetas: Normais						
	4-3	Tamanho: Macrocitose						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Hiperchromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	4-4	Tamanho: Macrocitose						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Hiperchromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

• Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27067
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 23.01.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 25 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	202	203	204	205	206	207	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	6-2	
WBC x 10 ³ / mm ³	9.0	6.4	6.0	4.1	6.3	6.6	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	01	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	03	03	04	04	02	01	0.84 - 3.64
Linfócitos %	67	67	65	65	59	69	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	04	07	09	08	08	03	0
Segmentados %	25	17	22	23	31	27	0
Neutrófilos %	29	30	31	31	39	30	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	N	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	5-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normais					
	5-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose céls linfocíticas degenerativas 30 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-3	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 20 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-4	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 30 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose céls linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-5	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 30 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose céls linfocíticas degenerativas 40 %					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	6-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normochromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27067
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 23.01.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 25 semanas

Resultados Hematológicos								
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA	
PARÂMETROS	208	209	210	211	212		FEMEA	
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	6-3	7-1	7-2	7-3	7-4			
WBC x 10 ³ / mm ³	4.9	4.9	5.2	5.0	6.8		2.82 - 5.11	
Eosinófilos %	0	0	0	0	02		0.33 - 0.47	
Monócitos %	01	04	03	02	06		0.84 - 3.64	
Linfócitos %	61	67	69	65	57		65.62 - 84.81	
Basófilos %	0	0	0	0	0		0.19 - 0.21	
Bastonetes %	06	04	04	05	07		0	
Segmentados %	32	25	24	28	28		0	
Neutrófilos %	38	29	28	33	35		15.52 - 30.65	
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	↑↑	N	↑↑		200 - 300	
Morfologia Celular	6-3	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Hipocromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	7-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 20 %						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Hipocromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	7-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 25 %						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Hiperchromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
	7-3	Tamanho: Macrocitose						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose						
		Coloração: Normocromia						
		Plaquetas: Normais						
	7-4	Tamanho: Macrocitose Monoblastos 4 %						
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose Megarioblastos 2 %						
		Coloração: Hiperchromia						
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais						
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

ANEXO D - Resultados dos exames de sangue da oitava coleta

No campo nomeado “Amostras do pesquisador” é possível identificar o animal analisado e o grupo ao qual ele pertence, sendo que o primeiro número corresponde ao grupo e o segundo número ao animal. Por exemplo, 2-1 indica o grupo 2 e o animal número 1. A divisão dos grupos é apresentada no Quadro 8

Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27630
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 27.02.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 30 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	644	645	646	647	648	649	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	
WBC x 10 ³ / mm ³	5.2	7.0	4.2	7.3	6.1	6.1	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	0	0	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	01	02	01	01	03	04	0.84 - 3.64
Linfócitos %	56	59	60	57	56	50	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	07	09	06	07	10	11	0
Segmentados %	29	21	27	28	20	24	0
Neutrófilos %	36	30	33	35	31	35	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	↑↑	↑↑	N	↑↑	N	200 - 300
Morfologia Celular	2-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 20 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-2	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Hiperchromia					
		Coloração: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-3	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose Hemácias deformadas					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	2-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normocitose					
	2-5	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 10 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose Hemácias deformadas					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-1	Tamanho: Macrocitose Linfócitos Atípicos 15 %					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose Hemácias deformadas					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normocitose					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27630
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 27.02.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 30 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	650	651	652	653	654	655	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	3-2	3-4	3-5	4-2	4-3	4-4	
WBC x 10 ³ / mm ³	3.1	4.9	4.7	4.9	3.1	4.2	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	01	01	0	0	0.33 - 0.47
Monócitos %	03	02	01	03	02	01	0.84 - 3.64
Linfócitos %	54	55	59	43	49	50	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	12	08	10	15	10	10	0
Segmentados %	19	27	19	24	39	29	0
Neutrófilos %	31	35	29	39	49	39	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	N	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	200 - 300
Morfologia Celular	3-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normocitose					
	3-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	3-5	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	4-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	4-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	4-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

- Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27630
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 27.02.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 30 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	656	657	658	659	660	661	FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	5-1	5-2	5-3	5-5	6-2	6-3	
WBC x 10 ³ / mm ³	6.8	5.9	5.0	7.8	5.3	3.6	2.82 - 5.11
Eosinófilos %	01	01	0	0	0	01	0.33 - 0.47
Monócitos %	03	03	0	02	0	01	0.84 - 3.64
Linfócitos %	53	58	80	56	64	67	65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0	0	0	0.19 - 0.21
Bastonetes %	12	10	05	11	05	05	0
Segmentados %	16	20	15	20	26	21	0
Neutrófilos %	28	30	20	31	31	26	15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	↑↑	N	↑↑	↑↑	N	N	200 - 300
Morfologia Celular	5-1	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normochromia					
		Plaquetas: Normocitose					
	5-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	5-5	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	6-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocitose					
		Plaquetas: Trombocitose-Aglomerados Plaquetários periféricos e centrais					
	6-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Hiperchromia					
		Plaquetas: Normocitose					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.

**Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

**LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA
ANIMAL**

Nº do cliente: 2655	Sequência: 27630
Espécie: Camundongo	Data do último exame: 27.02.2012
Linhagem: C57Bl/6	Procedência: Daniela - Incor
Sexo: Fêmea	Idade: 30 semanas

Resultados Hematológicos							
	AMOSTRAS						**REFERÊNCIA
PARÂMETROS	662	663	664	665			FEMEA
AMOSTRAS DO PESQUISADOR	7-1	7-2	7-3	7-4			
WBC x 10 ³ / mm ³	2.5	4.1	4.1	4.0			2.82 - 5.11
Eosinófilos %	0	0	01	0			0.33 - 0.47
Monócitos %	0	01	01	03			0.84 - 3.64
Linfócitos %	70	73	72	61			65.62 - 84.81
Basófilos %	0	0	0	0			0.19 - 0.21
Bastonetes %	06	07	07	12			0
Segmentados %	18	12	12	12			0
Neutrófilos %	24	19	19	24			15.52 - 30.65
Plaquetas x 10 ³ / mm ³	N	N	N	↑↑			200 - 300
Morfologia Celular	7-1	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normocitose					
	7-2	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normocitose					
	7-3	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normocitose					
	7-4	Tamanho: Macrocitose					
		Forma: Anisocitose, Poiquilocitose					
		Coloração: Normocromia					
		Plaquetas: Normocitose					
Responsável: Marilda Spinelli / CRBM - 1805

* Referência Laboratório de Hematologia do Centro de Bioterismo - FMUSP - 2007. Swiss - 10 semanas.