

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Jéssica Luana Souza Cardoso

Geração de uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima lisossomal β -
glicosilceramidase recombinante por meio do sistema lentiviral

Ribeirão Preto

2018

JÉSSICA LUANA SOUZA CARDOSO

Geração de uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante por meio do sistema lentiviral

Versão Original

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto

2018

Autorizo, após 24 meses, a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cardoso, Jéssica Luana Souza

Geração de uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante por meio do sistema lentiviral. Ribeirão Preto, 2018. 93p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Genética.

Orientadora: Fontes, Aparecida Maria.

1. Doença de Gaucher. 2. Glicosilceramidase recombinante. 3. Sistema lentiviral. 4. Linhagem celular humana. 5. Proteína recombinante GFP (*green fluorescent protein*)

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Candidata: JÉSSICA LUANA SOUZA CARDOSO

Título da dissertação: Geração de uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante por meio do sistema lentiviral

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, sem sessão pública realizada a ____ / ____ / _____, considerou

Aprovada

Reprovada

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

*Dedico esse trabalho aos meus pais,
Maria José Souza Cardoso e Nivaldo Cardoso,
com muito amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por conduzir-me em cada etapa desse projeto, sustentar-me e renovar-me diariamente, para passar pelas dificuldades.

Aos meus pais, Maria José Souza Cardoso e Nivaldo Cardoso, que são minha fortaleza, porto seguro e meus maiores amores, agradeço pela paciência e incentivo para conclusão desse trabalho, o qual é fruto de esforço e sacrifício deles também. Por me fazerem crer que todas as dificuldades seriam vencidas e valeriam à pena. Que sempre valorizaram cada pequena conquista e que me ensinaram valores essenciais.

Ao meu namorado, Sherlock Franco Alvarenga Borges, meu amigo e companheiro, que está ao meu lado nos momentos de felicidade e também nas dificuldades. Agradeço pela paciência e incentivo durante cada etapa.

Aos meus amigos pela paciência e conselhos, que me acolheram sempre que precisei. Em especial agradeço a Gabriella Macedo M. Diniz e Ana Carolina Coelho pela amizade construída ao longo desses anos, que me deram suporte em todas as etapas do projeto.

A orientadora Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes pela oportunidade que me foi concedida, e sua orientação que contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo Luíz Simões por me acolher e aconselhar em momentos difíceis, por ajudar-me a ultrapassar os obstáculos que surgiram nessa jornada.

Agradeço às funcionárias Dra. Cláudia Emília Vieira Wiesel e Elisabete Maria da Silveira Barreto Beira, pela ajuda em experimentos e também apoio emocional, ambas foram fundamentais para a conclusão do trabalho, sempre dispostas a ensinar, e agradeço também, pelo convívio harmonioso no ambiente de trabalho.

Agradeço a colaboração dos docentes da FMRP, FFCLRP e FCFRP do *campus* da USP de Ribeirão Preto, que possibilitaram a realização de experimentos em seus respectivos laboratórios e também auxiliaram com as discussões científicas, a Prof. Dra. Zilá Luz Paulino Simões, Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior, Profa. Dra. Danielle Pretti da Cunha Tirapelli, Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira, Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson, Prof. Dr. Roy Edward Larson, Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto, Prof. Dr. Kuruvilla Joseph Abraham, Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco e Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci e as funcionárias Silvia Regina Andrade Nascimento e Tânia Paula Aguiño Defina, bem como, das funcionárias Renata Rosada De Biase, Patrícia Vianna Bonini Palma, Camila Cristina de Oliveira Menezes, Sandra Navarro Bresciani e Dra. Maristela Delgado Orellana do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Agradeço a colaboração da Profa Dra. Vânia D'Almeida da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e as funcionárias Joyce Umbelino da Silva

Yamamoto e Dra Vanessa Gonçalves Pereira que auxiliaram nos ensaios de padronização da atividade biológica *in vitro* da enzima lisossomal.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento e incentivo à pesquisa.

Muito obrigada!

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou nesse caminho.”

Abraham Lincoln

RESUMO

CARDOSO, J.L.S. **Geração de uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante por meio do sistema lentiviral.** 2018. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A doença de Gaucher (DG) é uma doença de acúmulo lisossomal, com padrão de herança autossômico recessivo, devido a mutação no gene que codifica a enzima β -glicosilceramidase ácida (GBA), que hidrolisa o esfingolípido glicosilceramida. Atualmente, o tratamento mais utilizado para a DG é a Terapia de Reposição Enzimática (TRE), que faz uso de infusões de GBA recombinante para elevar o catabolismo da glicosilceramida. Entre as diferentes estratégias para produção de GBA recombinante o uso do sistema lentiviral é pouco explorado. Nesse sentido, esse trabalho visa a geração de uma linhagem celular humana com produção estável da enzima β -glicosilceramidase recombinante utilizando o sistema lentiviral. Como controle, foram geradas linhagens celulares humanas com expressão estável da proteína recombinante GFP (*green fluorescent protein*) para avaliar a eficiência da transdução por meio de diferentes quantidades virais. Primeiramente foram produzidas partículas lentivirais por meio da transfecção dos respectivos plasmídeos na linhagem celular 293-FT. A análise do título viral das partículas lentivirais portadoras dos cDNAs codificantes para GFP e GBA revelou níveis da ordem de $7,9 \times 10^6$ e $4,3 \times 10^7$ unidades transducionais/ mL de sobrenadante, respectivamente. Em seguida foram geradas duas linhagens celulares humanas com produção estável de GFP: 1) L22_293-FT_GFP_M1 transduzida com MOI igual a 1,0 e um ciclo de transdução e que mostrou apresentar 67% de células positivas para GFP e 2) L22_293-FT_GFP_M10 transduzida com MOI igual a 10 e três ciclos de transdução e que mostrou apresentar 94% de células positivas para GFP. Esses dados sugerem que houve diferença no nível de expressão conforme o MOI utilizado e o número de ciclos de transdução. Com base nessas informações, foi gerada uma terceira linhagem celular humana nomeada L20_293-FT_GBA_Mut-1 com MOI igual a 15 e produção estável da enzima GBA recombinante. Após a seleção da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 com puromicina, a molécula GBA_Mut-1 foi caracterizada pelo ensaio de fluorimetria para avaliação da atividade biológica da enzima recombinante. O nível da atividade biológica da enzima GBA_Mut-1 presente no sobrenadante foi $34,19 \pm 4,74$ U GBA/mL e a atividade

específica foi $231,8 \pm 51,62$ U GBA/mg de proteína. Por fim, foi avaliada a produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 que mostrou níveis de secreção de $38,74 \pm 4,8$ U/ 10^6 células e de produção intracelular de $119,1 \pm 34,71$ U GBA/ 10^6 células. Em conclusão, esse trabalho mostrou a eficácia do sistema lentiviral em manter a expressão estável e duradoura da enzima lisossomal recombinante e sugere a tecnologia para geração de linhagens celulares humanas transgênicas produtoras de enzima lisossomal no sobrenadante e intracelular.

Palavras – chave: Doença de Gaucher, glicosilceramidase recombinante, sistema lentiviral, linhagem celular humana, proteína recombinante GFP (*green fluorescent protein*)

ABSTRACT

CARDOSO, J.L.S. **Generation of a human cell line with stable production of lysosomal recombinant β -glucosylceramidase enzyme by lentiviral system.** 2018. Dissertation (Masters in Genetics) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Gaucher disease (DG) is a lysosomal storage disease with an autosomal recessive inheritance pattern caused by mutation in the gene that encodes an acidic β - glucosylceramidase (GBA) enzyme, which hydrolyzes the glucosylceramide sphingolipid. Currently, the most commonly used treatment for GD is the Enzyme Replacement Therapy (TRE), which uses infusions of recombinant GBA to raise the catabolism of glucosylceramide. Among the various strategies for GBA production, the use of the lentiviral system is little explored. In this sense, this work aims to generate a human cell line with stable production of the recombinant β -glucosylceramidase enzyme using the lentiviral system. As a control, human cell lines with stable expression of the recombinant green fluorescent protein (GFP) were generated to evaluate the efficiency of the transduction by means of different viral amounts. First lentiviral particles were produced by transfection of the respective plasmids into the 293-FT cell line. Analysis of the viral titer from GFP- and GBA-expressing vectors revealed a level of 7.9×10^6 and 4.3×10^7 transductional units / mL of supernatant, respectively. Two human cell lines were then generated with stable GFP production: 1) L22_293-FT_GFP_M1 cell line transduced with MOI equal to 1 and one transduction cycle, which showed 67% GFP positive cells and 2) L22_293-FT_GFP_M10 cell line transduced with MOI equal to 10 and three transduction cycles, which showed 94% of GFP positive cells. These data suggest that there was a difference in expression level according to the MOI used and the number of transduction cycles. Based on this information, a third human cell line named L20_293-FT_GBA_Mut-1 with MOI equal to 15 and stable production of the recombinant GBA enzyme was generated. After selection of the L20_293-FT_GBA_Mut-1 cell line with puromycin, the GBA_Mut-1 molecule was characterized by the fluorimetry assay for evaluation of the biological activity of the recombinant enzyme. Biological activity levels of the GBA_Mut-1 enzyme present in the supernatant were $34.19 + 4.74$ U GBA / ml and the specific activity was $231.8 + 51.62$ U GBA / mg protein. Finally, the productivity of the cell line L20_293-FT_GBA_Mut-1 was determined, which showed secretion levels of $38.74 + 4.8$ U/ 10^6 cells and intracellular production of $119.1 + 34.71$ U GBA/ 10^6 cells. In conclusion, this work showed the

effectiveness of the lentiviral system in maintaining the stable and long term expression of the recombinant enzyme and suggests the technology for the generation of transgenic human cell lines producing lysosomal enzyme in the supernatant and intracellular.

Keywords: Gaucher Disease, recombinant glucosylceramidase, lentiviral system; human cell line; recombinant green fluorescent protein (GFP).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do gene β -glicosilceramidase (*GBA*). I. O gene *GBA* é constituído por 11 éxons e 10 íntrons. As mutações mais comuns em cada éxon são descritas: substituições de bases, deleção, inserção e em sítio de “splicing” alternativo. II. Número de mutações reportadas em cada éxon até 2008. (Fonte: Retirado e modificado de Hruska et al., 2008).....29
- Figura 2.** Estrutura tridimensional da enzima lisossomal β -glicosilceramidase. O domínio I (verde) contém duas pontes dissulfeto, onde os átomos de enxofre estão destacados como esferas laranja. Além disso, pode-se observar o local de glicosilação em N19 mostrado em modelo “bastões e esferas”. O domínio II é mostrado em rosa e contém um sítio de glicosilação (N59). O domínio III (catalítico) está representado em bege, e os aminoácidos do sítio catalíticos (E235 e E340) são mostrados como modelos “bastões e esferas” no centro da figura. Também são mostrados dois sítios de glicosilação (N146 e N270). Obtida do banco de dados: Protein Data Bank (PDB).....29
- Figura 3.** Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho.....41
- Figura 4.** Representação esquemática do mapa físico dos vetores (A) pLV_HeF1 α _GBA_Mut-1_UbC_Puro e (B) pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro.....43
- Figura 5.** Representação esquemática do mapa físico dos plasmídeos acessórios (A) pMD2.G e (B) p8.91.....44
- Figura 6.** DNAs plasmidiais utilizados para a produção de partículas lentivirais. Eletroforese em gel de agarose. (A) raia 1 – Marcador λ DNA/HindIII; raia 2 – pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro; raia 3 – pLV_HeF1 α _Mut_UbC_Puro; raia 4 – pMD2.G e raia 5 – p8.91. (B) raia 1 – Marcador λ DNA/HindIII; raia 2 – pLV_HeF1 α _GBA_Mut-1_UbC_Puro não digerido e raia 3 – pLV_HeF1 α _GBA_Mut-1_UbC_Puro digerido.....47
- Figura 7.** Curva de eficiência para padronização da amplificação da sequência LTR, utilizando a concentração final de cada um dos *primers* a 0,075 μ M. Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. O eixo do X representa o número de cópias do plasmídeo (escala logarítmica) e o eixo do Y apresenta os valores de CTs de cada diluição do plasmídeo.....53
- Figura 8.** Curva padrão da sequência LTR construída a partir de concentrações conhecidas do DNA plasmidial lentiviral associada ao parâmetro C_T , para cálculo do título viral. Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software do aparelho de PCR em tempo real. O eixo do X representa o número de cópias do plasmídeo (escala logarítmica) e o eixo do Y apresenta os valores de CTs de cada diluição do plasmídeo.....55
- Figura 9.** Curva padrão para amplificação do gene endógeno β -actina construída partir de concentrações conhecidas do DNA genômico da célula virgem associada ao parâmetro C_T , para cálculo do título viral. Gráfico de regressão linear estabelecido pelo *software* do aparelho de PCR em tempo real. O eixo do X representa o número de cópias do DNA genômico (escala logarítmica) e o eixo do Y apresenta os valores de CTs de cada diluição do DNA genômico.....56
- Figura 10.** Gráfico da curva padrão para quantificação de proteínas pelo método de Lowry. A curva padrão foi construída com a BSA nas seguintes concentrações em mg/mL: 1,4; 0,7; 0,35 e 0,175.....61

Figura 11. Gráfico da curva padrão para determinação da atividade biológica *in vitro* da GBA. A curva padrão foi construída com o substrato sintético 4MU nas seguintes concentrações em nmol: 1,5; 0,75; 0,1875; 0,09375 e 0,0468.....62

Figura 12. Porcentagem de células 293FT que expressam GFP antes e após a transdução lentiviral, a partir da avaliação por FACS. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular 293-FT de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade). (B) análise por citometria de fluxo mostrando a ausência de células positivas para GFP na população celular 293FT virgem. O gráfico de histograma com intensidade de fluorescência vs número de eventos avaliados mostra que a curva até 10^1 representa a população 293FT negativa para GFP. (C e D) porcentagem de células 293FT positivas para GFP, 48 h após a transdução com 2 μ L do concentrado lentiviral portador do gene GFP.....65

Figura 13. Porcentagem de células 293FT que expressam GFP, após a transdução com diferentes concentrações de lentivírus, a partir da avaliação por FACS. (E e F) porcentagem de células 293FT positivas para GFP, 48 h após a transdução com 5 μ L do concentrado lentiviral portador do gene GFP. (G e H) porcentagem de células 293FT positivas para GFP, 48 h após a transdução com 10 μ L do concentrado lentiviral portador do gene GFP.....66

Figura 14. Caracterização de duas populações celulares transgênicas com expressão permanente de GFP, após o tratamento com puromicina. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular 293-FT de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade). (B) análise por citometria de fluxo mostrando a ausência de células positivas para GFP na população celular 293FT antes da transdução lentiviral. (C) população celular transgênica L22_293-FT_GFP_M1 em que 67% das células expressam GFP. (D) população celular transgênica L22_293-FT_GFP_M10 em que 94% das células expressam GFP.....68

Figura 15. Heterogeneidade da população celular transgênica L22_293-FT_P2_GFP_M1. Análise das subpopulações obtidas após a seleção com puromicina. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular L22_293-FT_P2_GFP_M1 de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade) (B) gráfico *dotplot* demonstrando as 3 subpopulações SP, P2 e P3 que expressam diferentes níveis de GFP.....69

Figura 16. Homogeneidade da população celular transgênica L22_293-FT_P2_GFP_M10. Análise da população celular com produção permanente de GFP por citometria de fluxo. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular L22_293-FT_P2_GFP_M1 de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade) (B) gráfico *dotplot* demonstrando que 90% da população celular expressa elevados níveis de GFP.....70

Figura 17. Produção da enzima lisossomal GBA na ausência de SFB, pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1, após 48 h de cultivo estático em monocamada. O número de unidades de GBA biologicamente ativa foi determinado pelo ensaio fluorimétrico. A linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 produz 7,85 vezes mais GBA que a linhagem celular virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,0071$).....72

Figura 18. Produtividade da população celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 na ausência de SFB, após 48 h de cultivo estático em monocamada. O número de unidades de GBA biologicamente ativa foi determinado pelo ensaio fluorimétrico. A produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 é cerca de 10,14 vezes maior comparado com a linhagem celular virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,0049$).....73

Figura 19. Atividade específica da enzima recombinante GBA produzida pela linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1. Foram utilizados 40-60 µg do extrato proteico total obtido após a coleta das células em cultura, seguida da lise celular por sonicação. A reação foi reação a 37°C por 2 horas utilizando o substrato sintético 4MUG. Os valores da atividade específica da enzima GBA lisossomal foram determinados pelo ensaio fluorimétrico e apresentam níveis 4,51 vezes maiores que a linhagem 293-FT virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,037$).....74

Figura 20. Produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem celular controle (293-FT virgem). O número de unidades de GBA biologicamente ativa foi determinado pelo ensaio fluorimétrico. A produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 é cerca de 10,14 vezes maior comparado com a linhagem celular virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,0049$).....75

Figura 21. Análise comparativa do nível de GBA secretada e intracelular/ 10^6 células L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem controle após 48 h de cultivo estático em monocamada.....76

Figura 22. Associação entre o nível da enzima GBA secretada e o nível da enzima GBA produzida pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem controle após 48 h de cultivo estático em monocamada. O coeficiente de correlação de Spearman $\rho = 0,88$ e valor de $p = 0,0072$ indicando que existem fortes indícios que maiores níveis de GBA intracelular implicam em maiores níveis de GBA secretada no sobrenadante da cultura celular.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação dos DNAs plasmidiais pLV_HeF1 α _Mut-UbC_Puro, pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro, pMD2.G e p8.91.....	45
Tabela 2. Ensaio Imunoenzimático de Elisa do antígeno p24 do HIV-1 para o diagnóstico sobre a formação de partículas lentivirais nos respectivos sobrenadantes das culturas celulares.....	50
Tabela 3. Características dos <i>primers</i> utilizados.....	52
Tabela 4. Quantificação de Proteínas das linhagens L20_293-FT_P2_GBA_Mut- 1 e 293FT virgem pelo método de Lowry.....	61
Tabela 5. Título do sobrenadante viral utilizando diferentes concentrações virais.....	71
Tabela 6. Atividade biológica da molécula GBA_Mut-1 secretada pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 obtida após a modificação gênica utilizando o sistema lentiviral. Como controle foi avaliada a atividade biológica de GBA da célula virgem.....	73
Tabela 7. Atividade biológica da molécula GBA_Mut-1 produzida pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 obtida após a modificação gênica utilizando o sistema lentiviral. Como controle foi avaliada a atividade biológica de GBA da célula virgem.....	75

ABREVIATURAS

4MU	<i>4-methylumbelliperyl</i>
5' /3' UTR	- <i>Untranslated Transcription Region</i>
ABX	Ambroxol
ADA	Adenosina Desaminase
Amp	Gene de resistência a ampicilina
CBE	β -epóxido conduritol
cDNA	DNA complementar
<i>CHO</i>	<i>Chinese Hamster ovary cells</i>
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
DG	Doença de Gaucher
DNA	Ácido desoxiribonucléico – “ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ”
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio imunoenzimático - <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EIM	Erro Inato do Metabolismo
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GBA	Beta-glucosilceramidase
GCS	Glicosilceramida sintase
gDNA	DNA genômico
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GlcCer	Glicosilceramida
GleSph	Glicosilesfingosina
HbS	Hemoglobina falciforme
HEF1a	<i>Human elongation factor-1 alpha</i>
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney 293T</i>

HGD	Dioxigenase de homogentisato
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSC	Células tronco Hematopoiéticas
iDA	Neurônios Dopaminérgicos
iMacs	Macrófagos
IN	Integrase
iPSCs	Células Tronco pluripotentes induzidas
Meio LB	Meio de cultura de bactérias Lúria Bertani
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
MLV	<i>Murine Leukemia Viruses</i>
mRNA	RNA mensageiro – “ <i>RNA messenger</i> ”
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
NB-DNJ	N-butildeoxinojirimicina
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
ORI	Origem de replicação
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Puro	Puromocina
q-PCR	PCR quantitativa em tempo real
Rev	Responsive Element
RNA	Ácido Ribonucleico - “ <i>Ribonucleic acid</i> ”
RT	Transcriptase reversa
SBF	Soro Fetal Bovino
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TRE	Terapia de Reposição Enzimática
TRS	Terapia de Redução de Substrato

UbC	Ubiquitina
VSV-G	<i>Vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>

NOTA DE ESCLARECIMENTO

Espera-se que o produto desse projeto de pesquisa gere uma patente. Para evitar a quebra de novidade, atividade inventiva e suficiência descritiva, requisitos mínimos de patenteabilidade, os resultados foram apresentados sem mencionar as mutações geradas (mutações não caracterizadas).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Doença de Gaucher: histórico e características clínicas	26
1.2. Caracterização molecular da β-glicosilceramidase: gene e proteína	28
1.3. Abordagens Terapêuticas	30
1.3.1. Terapia de Reposição Enzimática (TRE)	30
1.3.2. Terapia de Redução de Substrato (TRS)	31
1.3.3. Chaperonas Farmacológicas	32
1.4. Expressão de Proteínas Recombinantes Terapêuticas	33
1.4.1. Vetores de expressão: sistemas retrovirais e lentivirais	34
1.5. Proteínas recombinantes mutantes em ensaios de terapia gênica	37
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo Geral	40
3.2. Objetivos Específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Fluxograma	41
4.2. MATERIAIS	41
4.2.1. Linhagens bacterianas	41
4.2.2. Linhagem celular humana	42
4.2.3. Plasmídeos	42
4.2.3.1. Plasmídeos lentivirais para expressão dos genes de interesse	42
4.2.3.2. Plasmídeos Acessórios	43
4.3. MÉTODOS	44
4.3.1. Preparo de DNA	44
4.3.1.1. Transformação Bacteriana	44
4.3.1.2. Midi – Preparação de DNA Plasmidial	44

4.3.1.3. Extração de DNA Genômico da linhagem celular 293FT.....	45
4.3.1.4. Digestão do DNA Plasmidial com Enzima de Restrição	46
4.3.1.5. Purificação do DNA plasmidial após a Digestão Enzima de Restrição	46
4.3.1.6. Análise de Ácidos Nucleicos por Eletroforese em Gel de Agarose.....	46
4.3.2. Cultura de Células.....	47
4.3.2.1. Manutenção e Propagação de Linhagens Celulares Humanas	47
4.3.2.2. Contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer.....	47
4.3.2.3. Criopreservação de Linhagens Celulares Humanas	48
4.3.3. Preparo de Lentivírus	48
4.3.3.1. Produção de Sobrenadante Lentiviral.....	48
4.3.3.2. ELISA – Ensaio Imunoenzimático.....	49
4.3.3.3. Concentração do Sobrenadante Lentiviral	50
4.3.3.4. Determinação do Título Lentiviral por Citometria de Fluxo	50
4.3.3.5. Determinação do Título Lentiviral por PCR em Tempo Real	51
4.3.3.5.1. Otimização e Eficiência do LTR	51
4.3.4. Modificação Gênica de Linhagem Celular Humana.....	56
4.3.4.1. Transdução com Vetor Lentiviral portador do Gene GFP	56
4.3.4.2. Transdução com Vetor Lentiviral portador do Gene GBA_Mut-1	57
4.3.4.3. Tratamento com Antibiótico para Obtenção de uma População Celular com Produção estável da Proteína Recombinante	57
4.3.5. Análise da Linhagem Celular Humana 293FT/GFP por Citometria de Fluxo..	58
4.3.6. Análise da Linhagem Celular Humana 293FT/GBA_Mut-1.....	58
4.3.6.1. Coleta do Sobrenadante Celular	58
4.3.6.2. Preparo de Extrato Proteico Celular	59
4.3.6.3. Quantificação de Proteínas Totais pelo Método de Lowry.....	59
4.3.6.4. Análise da Atividade Biológica da Enzima Lisossomal por Fluorimetria.....	61
4.3.7. Análises Estatísticas	63
5. RESULTADOS.....	64

5.1.A construção plasmidial pLV_HeF1α_GFP_UbC_Puro portadora de GFP sob controle do promotor HeF1a apresenta capacidade de formar partículas virais	64
5.2.Avaliação da eficiência da transdução <i>ex vivo</i> da linhagem celular 293-FT utilizando o sistema lentiviral.....	67
5.3.Geração de uma população celular humana com produção permanente do transgene GBA_Mut-1.	70
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	93

1. INTRODUÇÃO

O termo Erro Inato do Metabolismo (EIM) foi elucidado pela primeira vez pelo médico Archibald Edward Garrod para descrever desordens genéticas causadas por alterações em uma reação química específica no metabolismo. Em 1902, Garrod constatou que a individualidade química e os efeitos da consanguinidade, resultavam em diferentes fenótipos, e por meio da construção de heredogramas, demonstrou que essa desordem é transmitida segundo as leis de Mendel (Garrod, 1902).

Garrod descreveu a alcaptonúria (OMIM 203500) como uma doença rara, recessiva, hereditária, onde os pacientes apresentam um defeito metabólico, a ausência da enzima dioxigenase do homogentisato (HGD). A enzima HGD está envolvida no catabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, tendo como função converter o ácido homogentísico no ácido maleilacetoacético, sendo que na ausência da HGD tem-se como consequência o acúmulo do ácido homogentísico, cuja oxidação resulta no pigmento escuro na urina dos portadores da doença. Esse pigmento também é encontrado nos tecidos conjuntivos, causando sua degeneração – ocronose (Garrod, 1902).

Entretanto, nesse período, não era possível associar uma doença genética a uma deficiência enzimática. Existiam algumas evidências de que o mecanismo responsável por essa deficiência seriam alterações enzimáticas e isto vinha sendo discutido por Garrod (Garrod, 1923) e Haldane (Haldane, 1954). O sucesso alcançado pelos estudos com as análises dos mutantes da cor de olho na mariposa *Ephestsia kuhniella* por Kuhn (Kuhn, 1961) e na *Drosophila* por Beadle e Ephrussi (Beadle and Ephrussi, 1936) eram limitados, pois o problema era muito complexo para uma abordagem direta. Um organismo que atendia essas características era o ascomiceto *Neurospora crassa*. Assim, a proposta de Beadle e Tatum foi submeter o fungo a raio X ou radiação ultravioleta para a indução de mutações. Em seguida, colocar o organismo para crescimento em meio mínimo e testar a adição de qual componente seria necessária para restaurar a capacidade de crescimento do organismo (Beadle and Tatum, 1941). Desta maneira, seria possível identificar o bloqueio genético e a reação metabólica associada à mesma. Com esse estudo, esses pesquisadores estabeleceram o conceito “um gene, uma enzima”, que hoje tem uma sólida fundamentação experimental. (Beadle and Tatum, 1941).

Esses conceitos deram suporte para algumas doenças de EIM que já haviam sido descobertas, entre elas, Doença de Tay-Sachs (OMIM 272800) por Warren Tay e Bernad Sachs entre 1881-1887 (Sachs, 1887; Tay, 1881); Doença de Gaucher (OMIM 230800) por

Phillipe Gaucher, 1882 (Gaucher, 1882); Doença de Fabry (OMIM 301500) por Johannes Fabry e Willian Anderson em 1898 (Anderson, 1898; Fabry, 1898); Doença de Niemann-Pick (OMIM 257200) por Albert Niemann e Ludwig Pick em 1914-1927 (Niemann, 1914; Pick, 1927); Doença de Hunter (OMIM 309900), conhecida como mucopolissacaridose tipo II por Charles Hunter em 1917 (Hunter, 1917); Doença de Hurler (OMIM 607014), conhecida como mucopolissacaridose tipo I, por G. Hurler em 1919 (Hurler, 1919); Doença de Pompe (OMIM 232300) por Joannes C. Pompe em 1933 (Pompe, 1933), Fenilcetonúria (OMIM 161600) por Ivar Fölling em 1934 (Fölling, 1934), entre outras.

A partir da década de 1950, os avanços científicos permitiram a descoberta de novas organelas celulares, entre elas, os ribossomos, por George Emil Palade (Palade, 1955) e os lisossomos, por Christian de Duve (Appelmans et al., 1955). Associado ao desenvolvimento de técnicas de cromatografia para separação de compostos orgânicos nas décadas de 60 e 70, como a cromatografia líquida de alta eficiência, conhecida como HPLC (*high performance liquid chromatography*) e em seguida novas técnicas que permitiram o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas para obter informações mais exatas sobre a massa molecular e a estrutura química do composto a ser investigado conduziu a avanços na técnicas de diagnóstico das EIM e melhor compreensão sobre métodos para avaliar o prognóstico e eficiência da resposta terapêutica. Por fim, no final da década de 90, o desenvolvimento da técnica de espectrometria de massa *in tandem* capaz de realizar o diagnóstico de diferentes doenças genéticas simultaneamente, trouxe grande avanço para a triagem neonatal das doenças de EIM (Camelo Jr, 2017; Casella, 2010).

Atualmente, mais de 500 diferentes doenças resultantes de EIM são conhecidas e podem ser classificadas conforme o tipo de metabolismo envolvido, ou de acordo com as perspectivas terapêuticas. No primeiro caso, as EIM poderiam ser classificadas em 14 grupos principais conforme descrito por (Turnpenny and Ellard, 2012). No segundo caso, as EIM poderiam ser classificadas em 3 grupos principais, conforme proposto por (Saudubray et al., 1989).

Com base nas duas propostas de classificação, a Doença de Gaucher, objeto da atual investigação, pode ser classificada como uma doença de acúmulo lisossomal seguindo a proposta de (Turnpenny and Ellard, 2012) ou uma doença que envolve moléculas complexas, de acordo com a proposta de (Saudubray et al., 1989).

1.1. Doença de Gaucher: histórico e características clínicas

Doença de Gaucher (DG) caracteriza-se como uma doença do erro inato do metabolismo de herança mendeliana autossômica recessiva, descrita pela primeira vez em 1882, pelo médico francês Philippe Charles Ernest Gaucher, em sua tese de doutorado, em que descreveu os sintomas de uma mulher de 32 anos. O pesquisador reportou que a paciente apresentava esplenomegalia e sugeriu que o aumento das células desse órgão se tratava de um neoplasma (Gaucher, 1882).

Em 1924, foi identificado que o grupo de moléculas que se acumula nas células dos órgãos acometidos dos pacientes com doença de Gaucher, trata-se de esfingolipídeos (Lieb, 1924). Os esfingolipídios pertencem à classe dos lipídeos estruturais e constituem os principais constituintes das membranas biológicas em organismos eucariotos. Os esfingolipídeos têm como estrutura básica a ceramida, constituída basicamente por um aminoálcool de cadeia longa denominada esfingosina, ligada a ácidos graxos. Em 1934, foi identificada uma classe especial de esfingolipídeo em que a ceramida apresenta uma molécula glicose associada e foi denominada glicosilceramida ou glucocerebrosídeo e é o substrato que se acumula nos lisossomos de pacientes com Doença de Gaucher (Aghion, 1934).

A base bioquímica da doença foi descrita em 1965 pelo grupo do Dr. Roscoe Owen Brady do *National Institutes of Health (NIH)*, que iniciou uma pesquisa com o objetivo de descobrir a causa dessa anormalidade. Nesse trabalho, os autores mostraram a atividade específica da enzima β -glicosilceramidase (GBA), utilizando o substrato glucocerebrosídeo marcado com radioisótopo ^{14}C , presente no sobrenadante do baço de pacientes afetados com Doença de Gaucher e em indivíduos saudáveis. Em pacientes com DG a atividade da enzima GBA é da ordem de $11,1 \pm 2,24$ c.p.m/mg proteína enquanto que em amostras controle a mesma é da ordem de $77,6 \pm 11,5$ c.p.m/mg de proteína (Brady, 1965). De acordo com o órgão internacional dedicado ao estabelecimento da nomenclatura universal de genes humanos (HGNC, *HUGO Gene Nomenclature Committee*) o nome oficial do gene GBA é β -glicosilceramidase, e será utilizado nesse estudo.

Hoje em dia, o diagnóstico de doença de Gaucher é realizado em gota de sangue seca em papel filtro por meio do ensaio fluorimétrico e utilizando o substrato sintético 4-methylumbellipheryl (4-MU) conforme descrito em (Muller et al., 2010). Sob essas condições, a análise de 156 doadores saudáveis mostrou que o nível de GBA é em média $3,06 \mu\text{mol/L sangue/h}$, com o intervalo de $1,51-7,23 \mu\text{mol/L sangue/h}$ (Muller et al., 2010). É também conhecido que o nível da enzima lisossomal GBA difere conforme o tipo celular. Por

exemplo, a atividade específica da enzima GBA em leucócito e baço de pacientes afetados com Doença de Gaucher, é cerca de 1,75 e 1,18 nmol/mg/h, respectivamente (Peters et al., 1976). Em indivíduos saudáveis, a atividade específica da enzima GBA em leucócito e baço é cerca de 9,7 e 33 nmol/mg/h, respectivamente. Por outro lado, no rim e fígado de indivíduos saudáveis é da ordem de 40 e 14 nmol/mg/h, respectivamente seguindo a mesma metodologia (Peters et al., 1976).

É importante também ressaltar, que há variações do nível da atividade biológica da GBA conforme a metodologia utilizada. Por exemplo, a análise por espectrometria de massa *in tandem* mostrou que a atividade enzimática da GBA em gota de sangue de indivíduos saudáveis é em média 3,3 $\mu\text{mol/h/L}$ de sangue (intervalo de 0,89-9,60 $\mu\text{mol/h/L}$ sangue) e em indivíduos afetados com doença de Gaucher é cerca de 0,18 $\mu\text{mol/h/L}$ de sangue (Li et al., 2004). Ou ainda, conforme o tipo de substrato utilizado. Por exemplo, utilizando o substrato natural do plasma marcado com radioisótopo [I^{14}C], a atividade específica de GBA no plasma de indivíduos saudáveis é 1800 pmol/min/mg proteína e em indivíduos com Doença de Gaucher entre 49-348 pmol/min/mg proteína (Whitfield et al., 2002).

Além da diminuição da atividade enzimática da enzima GBA, os pacientes com doença de Gaucher apresentam diferentes manifestações clínicas. Entre elas podemos citar: hepatoesplenomegalia, alterações hematológicas, como anemia, trombocitopenia e leucopenia, osteoporose, lesões líticas, deformidade óssea em frasco de *Erlenmeyer*, necrose avascular, particularmente na cabeça do fêmur, entre outras, as quais podem ser avaliadas pela investigação radiológica (Balicki e Beutler, 1995; Ferreira et al., 2008). Além disso, alguns pacientes apresentam comprometimento do sistema nervoso central (listed], 1996). Historicamente, com base nos sinais clínicos e sintomas, os pacientes com doença de Gaucher são classificados em três tipos denominados, subtipo 1, 2 e 3 (Stirnemann et al., 2017). Entretanto, embora atualmente a tendência seja investigar, a partir do diagnóstico, o espectro de manifestações clínicas ao longo do seguimento clínico, a classificação em três tipos ainda é utilizada (Stirnemann et al., 2017).

Tipo 1 (OMIM 230800): Representa 90% dos casos da doença. Apresenta-se como não neurológica, embora uma associação entre DG e Parkinsonismo venha sendo investigada (O'Regan et al., 2017). É caracterizada por aumento nos órgãos afetados, levando a uma distensão abdominal e anemia.

Tipo 2 (OMIM 230900): Esse tipo compromete o sistema nervoso central – SNC causando neuropatia aguda, ou seja, deterioração neurológica progressiva. Manifesta-se em crianças, levando a morte nos primeiros anos de idade (Stirneemann et al., 2017).

Tipo 3 (OMIM 231000): Trata-se da forma neuropática crônica com progressão lenta. É identificada antes dos dois anos de idade e observam-se sintomas como aumento dos órgãos acima mencionados (Stirneemann et al., 2017).

1.2. Caracterização molecular da β -glicosilceramidase: gene e proteína

Em 1985 foi elucidada a base molecular da doença de Gaucher por meio da clonagem do cDNA que contém a região codificadora da glicosilceramidase humana. O gene possui 7,6 kb de tamanho e compõe-se de 11 éxons e 10 íntrons (Figura 1) (Sorge et al., 1985; Tsuji et al., 1985) e está localizado na posição 1q22 (cromossomo 1, braço longo, região 2 e banda 2) (Barneveld et al., 1983). Cerca de 16 kb a jusante do *locus GBA* localiza-se o pseudogene *GBAP1* que apresenta 96% de homologia com o gene *GBA* (Horowitz et al., 1989).

Mais de 300 mutações já foram identificadas no gene da β -glicosilceramidase, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo, *splicings* alternativos, inserções e deleções e rearranjos gene-pseudogene. A figura 1 mostra as principais mutações descritas no *locus* gênico *GBA* conforme descrito por Hruska et al 2008.

Como esperado, a frequência dos alelos mutantes varia de acordo com a população. Em geral, os alelos mutantes mais comuns são N370S e a L444P na maior parte das populações (Hruska et al 2008). Também é conhecido que a presença de apenas um alelo N370S resulta no não comprometimento do sistema nervoso central, enquanto que a homozigose para L444P resulta no desenvolvimento da doença neuropática (Charrow et al., 2000; Sobreira et al., 2007) Um estudo populacional envolvendo 1698 indivíduos afetados com doença de Gaucher, sendo 223 pacientes do Brasil e 1477 pacientes de outros países (Europa n= 349; USA n= 572 e etc.) dos quais 692 não apresentam descendência dos judeus de Ashkenzi mostrou que no Brasil o genótipo mais frequente é o heterozigoto composto N370S/L444, com uma frequência de 46,8%, enquanto nos outros países (Europa, USA e outros países da América) foi 16,3% e retirando a população judia de Ashkenazi esse valor é da ordem de 25,7% (Sobreira et al., 2007). Esse estudo mostrou ainda que o genótipo mais frequente no mundo é o homozigoto N370S/N370S (40,4%), mas retirando a população judia de Ashkenazi esse valor é 10,6% sugerindo, portanto, que a diferença da frequência genotípica no Brasil em relação aos outros países é devido a baixa frequência de pacientes descendentes dos judeus de Ashkenazi (Sobreira et al., 2007).

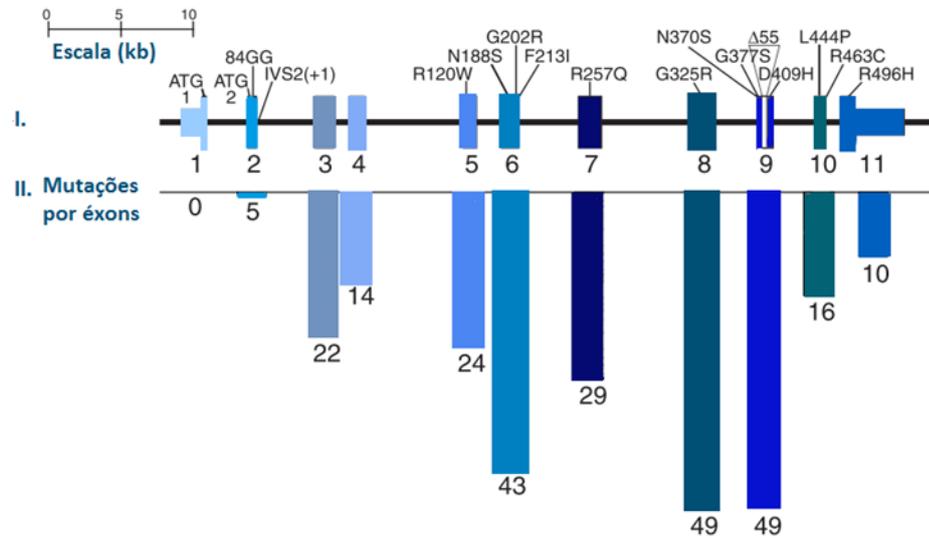
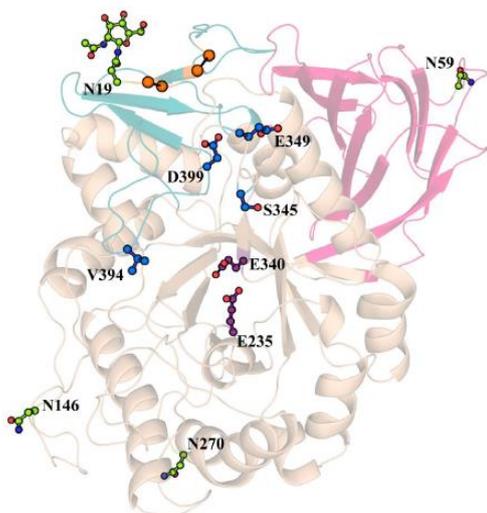


Figura 1. Estrutura do gene β -glicosilceramidase (*GBA*). I. O gene *GBA* é constituído por 11 éxons e 10 íntrons. As mutações mais comuns em cada éxon são descritas: substituições de bases, deleção, inserção e em sítio de “*splicing*” alternativo. II. Número de mutações reportadas em cada éxon até 2008. (Fonte: Retirado e modificado de Hruska et al., 2008).

A proteína β -glicosilceramidase madura é composta por 497 aminoácidos, derivados de 536 resíduos, incluindo o peptídeo sinal (Beutler, 1988). A enzima *GBA* possui cinco sítios de N-glicosilação, entretanto, apenas os quatro primeiros são utilizados (N19, N59, N146 e N270) (Erickson et al., 1985).

A enzima β -glicosilceramidase apresenta três domínios: o primeiro e o segundo domínio possuem função regulatória ou estrutural, onde o domínio I contém duas pontes dissulfeto que são necessárias para a manutenção da estrutura terciária da proteína. Já o domínio III contém o sítio catalítico, formado pelos aminoácidos E235 e E340 (Dvir et al., 2003).



Fonte: RCSB Protein Data Bank (2003).

Figura 2. Estrutura tridimensional da enzima lisossomal β -glicosilceramidase. O domínio I (verde), contém duas pontes dissulfeto, onde os átomos de enxofre estão destacados como esferas laranja. Além disso, pode-se observar o local de glicosilação em N19 mostrado em modelo “bastões e esferas”. O domínio II é mostrado em rosa e contém um sítio de glicosilação (N59). O domínio III (catalítico) está representado em bege, e os aminoácidos do sítio catalíticos (E235 e E340) são mostrados como modelos “bastões e esferas” no centro da figura. Também são mostrados dois sítios de glicosilação (N146 e N270). Obtida do banco de dados: RCSB Protein Data Bank (PDB).

1.3. Abordagens Terapêuticas

1.3.1. Terapia de Reposição Enzimática (TRE)

Por meio do estudo de diferentes esfingolipídoses, Roscoe O'Brady observou que a causa na maioria delas era a deficiência de uma determinada enzima, então propôs que uma potencial abordagem terapêutica seria a reposição dessas enzimas deficientes via a administração exógena (Brady, 1966). Em 1973, foi isolada e purificada a β -glicosilceramidase humana a partir do tecido de placenta humana (Pentchev et al., 1973).

Em 1983, a *Food and Drug Administration* – FDA estabeleceu o *Orphan Drug Act*, o qual apoia o desenvolvimento de drogas para doenças raras, que atinjam menos de 200.000 pessoas ao redor do mundo. Esse ato fornece incentivos fiscais em custos de pesquisas e exclusividade de mercado por sete anos para a empresa que colocar uma droga órfã no mercado, a qual se torna mais vantajoso do que o patenteamento do produto, pois este ato além de impedir que outra empresa fabrique o mesmo produto por um determinado período de tempo, também impede que outras empresas produzam biossimilares durante sete anos (Goozner, 2004; Hill et al., 2015).

A *Cerezyme* (imiglucerase) foi lançada no mercado pela *Genzyme* em 1991, a primeira β -glicosilceramidase humana recombinante obtida a partir de células *CHO* - *Chinese Hamster ovary cells* (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA). A enzima apresenta como principal modificação a substituição da arginina no resíduo 495 por uma histidina, o que contribui para uma maior entrega da droga nas células. Após sua produção a proteína é submetida à digestão por exoglicosidases com o objetivo de expor os resíduos de manose os quais permitem o deslocamento para os lisossomos (Rasmussen et al., 1990).

A *Genzyme* manteve um monopólio com a imiglucerase até 2010 quando a *Velaglucerase alfa* foi aprovada pela FDA para uso em Terapia de Reposição Enzimática (Burrow e Grabowski, 2011). A enzima β -glicosilceramidase recombinante desenvolvida pela *Shire Human Genetic Therapies*, é produzida em células humanas de fibrosarcoma contendo *Kifunensina*, um potente inibidor da enzima *manosidase I*. Logo, uma glicoproteína com grande quantidade de manose é produzida (Daniel, 2011).

Outra droga utilizada na TRE para doença de Gaucher desenvolvida pela empresa *Protalix* foi aprovada pela FDA em 2012: *Taliglucerase alfa*. É também uma enzima recombinante, porém, é expressa em células de plantas. A plataforma de produção utiliza células de cenoura geneticamente modificadas para produzir uma enzima com elevadas quantidades de resíduos de manose. A sequência de aminoácidos dessa proteína difere da β -

glicosilceramidase humana por dois aminoácidos na porção N-terminal (GluPhe) e sete aminoácidos na porção C-terminal (AspLeuLeuValAspThrMet) (Shaaltiel et al., 2007).

A Terapia de Reposição Enzimática é considerada o tratamento padrão-ouro para a Doença de Gaucher e segundo dados do Ministério da Saúde (2014), dos 670 pacientes em tratamento no país, 96% fazem uso do TRE. Outra forma de Terapia também aprovada pelo Ministério da Saúde é a Terapia de Reposição de Substrato.

1.3.2. Terapia de Redução de Substrato (TRS)

O conceito de Terapia de Redução de Substrato – TRS – foi proposto pela primeira vez para tratamento de Doença de Gaucher por Norman Radin em 1980 e tem como objetivo a redução do substrato por meio da inibição de sua síntese (Vunnam e Radin, 1980). Para a doença de Gaucher têm sido desenvolvidos diferentes compostos inibidores da enzima glicosilceramida sintase (GCS), a qual é responsável pela transferência de uma glicose da molécula UDP- glicose para uma ceramida para formar a glicosilceramida (Butters et al., 2003).

Um dos estudos pioneiros foi desenvolvido por Platt e colaboradores utilizando o composto N-butildeoxinojirimicina (NB-DNJ) (Platt et al., 1994). Nesse estudo, os autores desenvolveram um modelo “*in vitro*” de Doença de Gaucher, por meio do tratamento da linhagem de macrófago de camundongo WEHI-3B como um inibidor da enzima lisossomal β -glicosilceramidase denominado β -epóxido conduritol (CBE). A análise por microscopia eletrônica mostrou o acúmulo de lipídeos em culturas tratadas com CBE e a ausência do mesmo em culturas tratadas com CBE (50 μ M) + Nb-DNJ (50 ou 500 μ M) (Platt et al., 1994). A *Actelion Pharmaceuticals LTD* é responsável pela produção desse composto também chamado de miglustat ou Zavesca e constituiu o primeiro inibidor para o tratamento da doença de Gaucher (Actelion Pharmaceuticals Ltd).

Outro composto investigado é denominado Eliglustat tartrate (Cerdelga) (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA). Sua atividade inibitória da GCS foi detectada *in vitro* por meio da medição de níveis de glicolípídios na superfície celular, onde foi observado um alto potencial inibitório em concentrações nanomolar (Hirth et al., 2002).

Recentemente a Genzyme desenvolveu uma nova molécula denominada Genz – 682452, a qual pode ser utilizada na TRS, inibindo a GCS. Uma característica diferenciada é seu potencial de atravessar a barreira hematoencefálica e assim atingir o Sistema Nervoso Central para o tratamento da forma neuropática da doença, além de contribuir na diminuição

do volume dos órgãos. Em camundongos nos quais foi induzida quimicamente a doença de Gaucher, Masrshal e cols mostraram que o tratamento com 60 mg de Genz-682452/kg/dia reduziu o acúmulo de substrato (lyso GL-1) no fígado e cérebro cerca de 75 e 25-50%, respectivamente em relação ao camundongo não tratado. Além disso, os autores estudaram o efeito da mesma droga no modelo transgênico para DG (Gba V395L + sapocin C-/-) e observou-se que o tratamento com 12,5 mg/kg de Gezn-682452 entre os dias 5 e 20 resultou em uma redução do substrato lyso-GL1 no fígado e cérebro de cerca de 50% em relação ao camundongo não tratado (Marshall, 2016). Esses resultados são promissores para investigações sobre o papel desse inibidor de GCS em pacientes com Doença de Gaucher tipo 3.

Entretanto, a terapia de redução de substrato, como segunda forma de tratamento de pacientes com doença de Gaucher ainda vem sendo investigada. Um estudo multicêntrico envolvendo 10 países, incluindo o Brasil, realizado por Cox et al, 42 pacientes afetados com DG que recebiam TRE e substituíram para o uso de TRS mostrou efeito terapêutico (Cox et al., 2012). Entretanto, cerca de 50% dos pacientes descontinuaram o tratamento, em virtude dos efeitos colaterais (Cox et al., 2012).

1.3.3. Chaperonas Farmacológicas

Nas doenças genéticas que envolvem o acúmulo de alguma macromolécula ou composto nos lisossomos, uma dentre as causas da disfunção proteica pode ser devido ao dobramento incorreto e inadequado da proteína durante sua biossíntese no retículo endoplasmático da célula. Essas mutações podem levar ao dobramento errôneo da proteína e interferir na transferência dessas enzimas do complexo de Golgi para o seu destino, os lisossomos (Benito et al., 2011; Parenti et al., 2015).

As chaperonas farmacológicas consistem em pequenas moléculas inovadoras que apresentam grande potencial como abordagem terapêutica. Sua função é restaurar a função celular da proteína mutante por se ligar a mesma permitir seu dobramento apropriado e aumentar seu transporte para os lisossomos (Benito et al., 2011). No caso da doença de Gaucher, um segundo papel promissor seria pela sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo importante alvo para DG tipo 2 e 3. Além disso, indivíduos heterozigotos para Doença de Gaucher tem um risco aumentado para Doença de Parkinson podendo constituir outro alvo importante para esse tipo de terapia (Migdalska-Richards e Schapira, 2016).

A chaperona que vem sendo mais investigada para doença de Gaucher é o ambroxol (Mucosolvan ou ABX), a qual mostrou aumentar a atividade enzimática residual do alelo mutante mais frequente em Doença de Gaucher tipo 1, conhecido como N370S. Em 2009, Maegawa e cols, mostraram que o tratamento de linhagens celulares de fibroblastos de pacientes com Gaucher (N370S/N370S) com 20% de atividade residual de β -glicosilceramidase (230 nmol de MUGlc/h/mg de proteína total) com 60 μ M de ambroxol por 5 dias mostrou um aumento de cerca de 3 vezes da atividade biológica da enzima GBA conforme avaliado pelo ensaio fluorimétrico. Além disso, análises por *western blot* mostraram um aumento de cerca de 2x da quantidade de proteína GBA, após esse tratamento (Maegawa et al., 2009). Embora ABX seja a chaperona mais estudada em doença de Gaucher, seu uso clínico ainda encontra-se sob investigação (Narita et al., 2016).

Aflaki e colaboradores reportaram uma nova chaperona farmacológica, a NCG607 que atua estabilizando a enzima mutante, restaurando sua atividade e os níveis da proteína, e por consequência reduz o armazenamento de glicolipídios. Para esse estudo, os pesquisadores diferenciaram as iPSCs (células-tronco pluripotente induzidas) de 4 pacientes com Doença de Gaucher tipo 1 (2 com Doença de Parkinson e 2 sem Doença de Parkinson) e de 2 pacientes com DG tipo 2 em macrófagos (iMacs) e neurônios dopaminérgicos (iDA). O tratamento de iMacs com 3 μ M de NCG607 por 6 dias mostrou o aumento da atividade biológica da enzima lisossomal GBA e uma diminuição do acúmulo dos substratos glicosilceramida (GlcCer) e glicosilesfingosina (GlcSph). Além disso, o tratamento dos neurônios iDA por 21 dias com 3 μ M de NCG607 também mostraram resultados similares. Os autores mostraram também que o tratamento dos neurônios iDAs com essa substância reduziu os níveis de alfa-sinucleína, sugerindo que essa molécula apresenta potencial para o tratamento da doença de Gaucher e Parkinson (Aflaki et al., 2016).

1.4. Expressão de Proteínas Recombinantes Terapêuticas

A área de produção de proteínas recombinantes está expandindo progressivamente, e consequentemente a maioria dos biofármacos produzidos hoje em dia são recombinantes (Gecchele et al., 2015). O valor de mercado desses produtos biológicos foi recentemente estimado em 140 bilhões de dólares, superando 200 moléculas terapêuticas, sendo que uma parte significativa desses produtos foi gerada em plataformas de expressão em células de mamíferos (Lalonde e Durocher, 2017). Entre as células de mamíferos utilizadas para produção de proteína recombinante temos linhagens celulares derivadas de *hamster* (CHO e

BHK), linhagens celulares derivadas de camundongos (NS0 e Sp2/0) e linhagens celulares humanas (HEK293, HT-1080, PER.C6, CAP, HKB-1 e HuH-7). Entre essas linhagens celulares a maior parte das glicoproteínas bioterapêuticas aprovadas pelo FDA são produzidas pelas células CHO (Lalonde e Durocher, 2017). Entretanto, apesar de seu elevado uso comercialmente, uma desvantagem é não apresentar a maquinaria para alguns tipos de glicosilação e a indução da resposta imune em humanos tornando em muitas situações o uso da célula humana mais apropriado.

Entre as células humanas acima citadas, os tipos celulares mais utilizados para produção de glicoproteínas são a HEK293 e HT-1080 (Lalonde e Durocher, 2017). Como exemplos de glicoproteínas recombinantes aprovadas pelo FDA e produzidas pela linhagem celular HEK293 disponíveis no mercado temos os fatores VIII e IX da coagulação rFVIII_{FC} (ALPROLIX) e rFIX_{FC} (ELOCTATE), respectivamente. Como exemplo de proteína recombinante produzida pela linhagem celular HT-1080 temos as proteína recombinante Epoetin detla (DYNEPO) e β -glicosilceramidase (Velaglucerase alfa) (Lalonde e Durocher, 2017).

Em nosso projeto de pesquisa optamos pelo uso da linhagem celular 293FT derivada da linhagem 293F. A 293F apresenta um potencial proliferativo maior que a 293 original, enquanto a linhagem 293T expressa o antígeno T derivado de SV40 e permite uma maior produção da proteína recombinante. Assim, a linhagem celular 293FT possui essas duas características: elevado potencial proliferativo e aumento da produção da proteína recombinante (Ooi et al., 2016).

1.4.1. Vetores de expressão: sistemas retrovirais e lentivirais

Por definição, terapia gênica é o tratamento de doenças baseado na transferência de material genético. Em sua forma mais simples consiste na inserção de genes funcionais em células com alelos mutantes para substituir alelos causadores de doenças. O panorama atual indica que a terapia gênica não se limita às possibilidades de substituir ou eliminar seletivamente células específicas. Um espectro terapêutico mais amplo apresenta-se a medida que novos sistemas são desenvolvidos para permitirem a liberação de proteínas terapêuticas.

Hoje em dia, os sistemas mais eficientes para a entrega do gene terapêutico na célula hospedeira utilizam-se das propriedades de vetores derivados de vírus que infectam células animais. O genoma viral com os genes virais potencialmente patogênicos removidos e outras modificações para acomodar o gene terapêutico é denominado vetor (Giacca, 2010).

Entre os vetores virais mais utilizados, temos os vetores da família *Retroviridae*, os quais foram desenvolvidos na década de 80 por Perkins e cols (1983) e desde esse período vem sendo submetidos a constantes modificações com o objetivo de aumentar sua eficácia e segurança (Perkins et al., 1983). Sua principal vantagem em relação a outros vetores é a capacidade de integração no genoma da célula hospedeira, o que permite a produção estável e duradoura da proteína codificada pelo gene de interesse. Isso trouxe grande entusiasmo à comunidade científica e permitiu o desenvolvimento dos primeiros protocolos clínicos de terapia gênica utilizando o sistema retroviral.

Historicamente, o primeiro ensaio de terapia gênica foi aprovado oficialmente nos USA em Outubro de 1988 e liderado pelo oncologista Steven Rosenberg para imunoterapia do câncer (Rosenberg et al., 1990; Rosenberg et al., 1988). Após dois anos, em 1990, foi conduzido o primeiro protocolo de terapia gênica para doenças monogênicas pelos pesquisadores Michael Blaese e French Anderson, também no NIH em Bethesda. Receberam esse tratamento, duas pacientes com deficiência da enzima adenosina deaminase (ADA). Nesse protocolo, a cada dois meses linfócitos T das crianças eram coletados e nesses inseridos o gene ADA. Os linfócitos T/ADA+ eram expandidos e re-infundidos nas crianças (Blaese et al., 1995).

Esses primeiros vetores retrovirais eram derivados do vírus da leucemia de camundongo (MLV, do inglês "*murine leukemia viruses*") e além dos ensaios de terapia gênica utilizando os mesmos acima citados, outros foram desenvolvidos, por exemplo, para a deficiência da proteína de membrana conhecida como γc (do inglês, "*common gamma chain*"), uma proteína comum de receptores de várias interleucinas e cuja deficiência leva ao desenvolvimento da doença genética SCID ligada ao cromossomo X (SCID-X1) (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Também nosso grupo de pesquisa, realizou estudos de terapia gênica utilizando os vetores retrovirais derivados de MLV para terapia gênica na área da oncologia (Fontes et al., 2006), hemofilia A (Fontes et al., 2012; Rodrigues et al., 2013) e hemofilia B (Fernandes et al., 2011).

Entretanto, a principal desvantagem do sistema retroviral é o fato da integração ocorrer apenas em células em mitose, o que limitou sua aplicação na terapia gênica (Miller et al., 1990). Além disso, outras limitações do mesmo são: apresentam um elevado risco de mutagênese no sítio de inserção (Montini et al., 2009) e a dificuldade de se produzir elevados títulos virais (Merten et al., 2016).

Na década de 90, surgiram os vetores lentivirais derivados do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), que apresentam o potencial de integrar em células diferenciadas, isto é, sem o potencial de proliferação e foram originalmente desenvolvidos por Naldini e cols 1996 (Naldini et al., 1996; Poeschla et al., 1996). Outra vantagem do sistema lentiviral é o uso da proteína do envelope de outra classe de vírus (VSV-G, do inglês “*vesicular stomatitis virus glycoprotein*”). Vetores virais portadores da proteína do envelope VSV-G podem transduzir uma variedade de tipos celulares e tecidos, como por exemplo, células hepáticas, células-tronco hematopoéticas, células de rim, entre outras. Além disso, o sítio de integração preferencial dos vetores lentivirais é distante do sítio de início de transcrição gênica, sugerindo possuir um menor risco de mutagênese insercional (Vannucci et al., 2013).

Outras características do sistema lentiviral foram revisadas por (Picanço-Castro et al., 2008). Conforme descrito pelos autores, o sistema lentiviral emprega o uso de três plasmídeos para a produção viral: 1. o plasmídeo contendo o gene terapêutico, o qual contém a região LTR (do inglês “*long terminal repeat*”), a sequência de encapsulação, a sequência RRE (do inglês “*Rev responsive element*”) e uma sequência promotora para expressão do transgene; 2. o plasmídeo contendo o gene que codifica a proteína do envelope conhecida como VSV-G (do inglês “*vesicular stomatitis virus glycoprotein*”) e 3. o plasmídeo contendo os genes *gag-pol*, os quais codificam a proteína estrutural que forma o capsídeo (*gag*) e a proteína responsável pela transcrição reversa. Esse vetor contém ainda os genes *tat* e *rev* que codificam as proteínas reguladoras do ciclo de vida do vírus (Picanço-Castro et al., 2008). Desta maneira, por meio da transfecção transiente dos três plasmídeos na linhagem celular humana 293T, a qual possui uma elevada taxa de transfecção, devido apresentar o antígeno T de SV-40, é possível coletar partículas lentivirais no sobrenadante da cultura celular cerca de 48 horas após o ensaio de transfecção plasmidial. Essas partículas lentivirais podem ser utilizadas para estudos de terapia gênica ou produção estável e duradoura da proteína recombinante de interesse. Experiências anteriores em nosso laboratório mostraram o potencial uso do sistema lentiviral para a produção da proteína humana do Fator VIII da coagulação para Terapia de Reposição para Hemofilia A (Fantacini et al., 2016; Picanco-Castro et al., 2008 (b)).

Com base em nossa experiência em Hemofilia A, conduziu-nos ao uso do sistema lentiviral para a produção da proteína humana recombinante conhecida como β -glicosilceramidase para terapia de reposição enzimática da Doença de Gaucher, que consiste no objetivo da atual proposta.

1.5. Proteínas recombinantes mutantes em ensaios de terapia gênica

Proteínas recombinantes com mutações sítio-específicas vêm sendo utilizadas em ensaios pré-clínicos e clínicos de terapia gênica há mais de uma década (Payen et al., 2014). Por exemplo, em 2001, o grupo do pesquisador Philippe Leboulch mostrou a correção fenotípica para anemia falciforme em modelo animal após o transplante de medula óssea de células tronco hematopoéticas (HSC) modificadas geneticamente com a variante do gene da β -globina β^{A-T87Q} , portadora na mutação *missense* na posição 87 da cadeia β da hemoglobina A, aminoácido crítico para impedir a polimerização da hemoglobina falciforme (HbS) (Pawliuk et al., 2001). Ensaios pré-clínicos adicionais mostraram elevados níveis de produção da variante β -globina β^{A-T87Q} em células-tronco hematopoéticas humanas modificadas geneticamente com essa construção lentiviral (Imren et al., 2004). A segurança e eficácia observada nesses ensaios pré-clínicos conduziu ao início da elaboração de um ensaio clínico utilizando essa variante β -globina β^{A-T87Q} em 3 pacientes com β -talassemia (Bank et al., 2005). Esse protocolo clínico consistiu em uma única infusão de $1-4 \times 10^6$ células-tronco hematopoéticas autólogas modificadas geneticamente com a variante β -globina β^{A-T87Q} / kg do paciente. Em dois pacientes foi observado o “*engraftment*” da medula óssea cerca de 22 a 27 dias após o transplante e a correção fenotípica teve uma duração de 1 a 7 anos após o ensaio clínico (Negre et al., 2016).

Também na área da oncologia, mutações *missense* sítio-específica em genes terapêuticos têm sido uma estratégia de terapia gênica promissora. Por exemplo, em estudos *in vitro* realizados em colaboração com o Prof. Stanton Gerson da CWRU-USA foi possível comparar a capacidade de quatro variantes da enzima de reparo DNA alkyltransferase (AGT) (G156A-MGMT; P140K-MGMT; MGMT-2; MGMT-3 e MGMT-5) de reparar lesões do DNA após a exposição de células hematopoéticas humanas a agentes alquilantes. Observamos que as cinco variantes mantêm a capacidade de reparar danos no DNA com diferentes potenciais mutação-dependente (Fontes et al., 2006). Também ensaios pré-clínicos permitiram mostrar a eficácia dessas variantes MGMT na terapia de gênica (Wang et al., 2018). Hoje em dia, a variante P140K vem sendo utilizada em protocolos clínicos anti-tumorais para glioblastoma (Sloan et al., 2016), câncer colorretal (Sartore-Bianchi et al., 2017), entre outros.

Esse conjunto de dados conduziu-nos ao desenvolvimento de vetores lentivirais para terapia gênica, bem como, para a produção da proteína recombinante em células humanas para a terapia de reposição para Doença de Gaucher. Esse projeto, é parte de um projeto maior do laboratório que tem o objetivo de realizar a análise comparativa de diferentes variantes do

gene que codifica a enzima lisossomal GBA quanto sua capacidade de clivar o esfingolípídeo alvo. Em um projeto anterior foram desenvolvidos 5 variantes do gene GBA e o projeto aqui realizado trata-se do estudo de uma dessas variantes conhecida como GBA_Mut-1.

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Gaucher foi descrita em 1882 e ainda não possui cura, apenas tratamentos que não são eficientes para todos os pacientes. A TRE é a terapia mais utilizada até o momento, porém não é eficaz para todos os tipos da doença, além de apresentar um custo de produção e do produto elevado. De acordo com dados de 2013 da CONITEC – Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS, no Brasil, 618 pacientes foram tratados por essa terapia, sendo 579 pacientes com imiglucerase e 39 com alfataliglucerase, distribuindo respectivamente 61966 e 11952 unidades da enzima. O valor de cada unidade da imiglucerase é de R\$ 1451,96 e o da alfataliglucerase é de R\$ 857,52 (CONITEC, 2014). Além disso, a produção e comercialização desses medicamentos são realizadas por grandes laboratórios internacionais, sendo o mais conhecido a Genzyme Corporation, o que eleva o custo da terapia. Assim, é de grande importância o desenvolvimento de sistemas de produção mais eficientes de menor custo e nacionais para o tratamento da doença de Gaucher.

Assim, visando desenvolver uma nova GBA com maior atividade biológica, comparada com a GBA selvagem foram realizadas algumas mutações sítio-específicas na enzima lisossomal GBA, aqui denominada GBA_Mut-1. Porém, em contato com a Agência USP de Inovação foi sugerido não apresentar as características da nova GBA neste documento público para manter os termos de confidencialidade como mutação não caracterizada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visa gerar uma linhagem celular humana com produção estável da enzima lisossomal β -glicosilceramidase humana recombinante, portadora de mutações sítios específicas, utilizando o sistema lentiviral.

O segundo objetivo do presente estudo é gerar uma linhagem celular humana portadora em seu genoma do cDNA relativo ao GFP, o qual codifica a proteína *Green Fluorescent Protein*, utilizando o sistema lentiviral, como linhagem celular controle.

3.2. Objetivos Específicos

- I. Produzir em larga escala os vetores lentivirais pLV_HeF1 α _Mut-1_Ubc_Puro e pLV_HeF1 α _GFP_Ubc_Puro;
- II. Avaliar a funcionalidade de ambos vetores lentivirais quanto sua capacidade de formação de partículas virais e de infecção celular;
- III. Analisar comparativamente a eficiência da transdução da construção lentiviral pLV_HeF1 α _GFP_Ubc_Puro na linhagem celular humana 293T-FT utilizando dois diferentes MOIs (do inglês, *multiplicity of infection*);
- IV. Gerar uma linhagem celular humana com produção permanente da enzima lisossomal mutante (GBA_Mut-1) utilizando o sistema lentiviral;
- V. Analisar a atividade biológica *in vitro* da enzima lisossomal recombinante mutante GBA_Mut-1 presente no sobrenadante da linhagem celular humana que apresenta o transgene integrado em seu genoma;
- VI. Analisar a atividade específica da enzima lisossomal recombinante GBA_Mut-1 produzida pela linhagem celular humana recombinante com produção estável da mesma.
- VII. Avaliar a produtividade da linhagem celular recombinante humana quanto o nível da enzima lisossomal recombinante mutante (GBA_Mut-1) secretada e intracelular / 10^6 células em cultivo estático em monocamada por 48 h.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fluxograma

O trabalho foi desenvolvido seguindo as etapas no fluxograma descrito na figura 3:

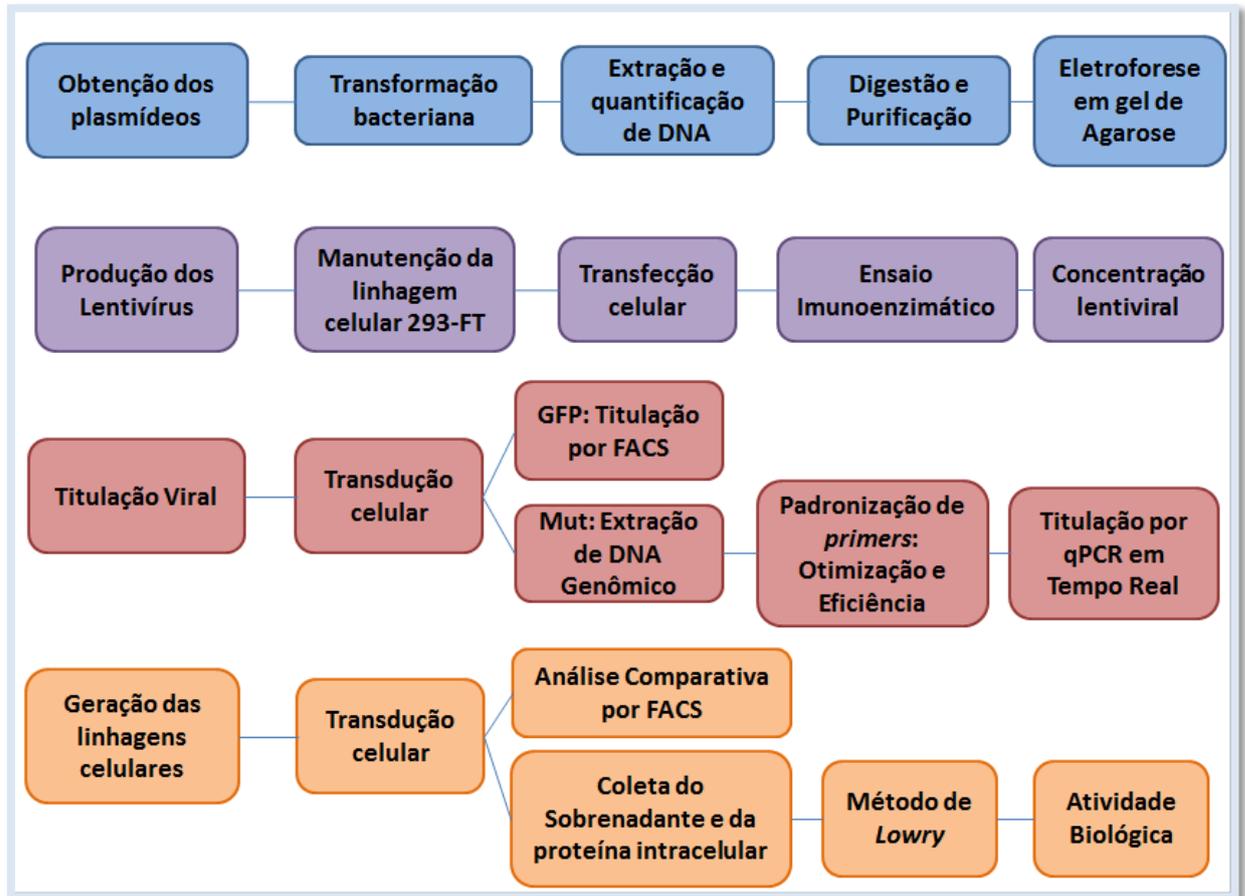


Figura 3. Fluxograma das etapas desenvolvidas no presente trabalho

4.2. MATERIAIS

4.2.1. Linhagens bacterianas

Para os ensaios de transformação bacteriana foram utilizadas duas linhagens de *Escherichia coli* competentes: DH10 β e Stb13.

A linhagem *E. coli* DH10 α foi utilizada para a obtenção dos plasmídeos acessórios para a produção de partículas lentivirais (pMD2.G e pCMV_dr8.91). **Genótipo:** F ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *recA1 endA1 hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1* (ThermoFisher – Cat. No 18265017).

A linhagem *E. coli* Stb13 é derivada de HB101 e foi utilizada para a obtenção dos plasmídeos lentivirais portadores da região LTR (*long terminal repeat*). **Genótipo:** F⁻*mcrB*

mrrhsdS20 (r_B^- , m_B^-) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ-leumtl-1* (ThermoFisher Scientific – Cat. No C737303).

4.2.2. Linhagem celular humana

Para a produção do vírus e para a geração de linhagens celulares humanas com produção estável de proteínas recombinantes (GBA_Mut-1 e GFP) foi utilizada a linhagem celular 293FT (Cat. Number R700-07, Gibco, by Thermo Fisher Scientific).

Essa linhagem celular é derivada da linhagem 293F, a qual é uma linhagem de rim embrionário humano (HEK293). Trata-se de uma linhagem transfectada com o adenovírus Typ-5, o que resultou na incorporação de cerca de 4,5kb do genoma viral no cromossomo 19 da linhagem celular. A linhagem 293FT expressa estavelmente o antígeno T do vírus SV40 sob controle do promotor CMV por meio da modificação gênica com o plasmídeo pCMVSPORTT6TAg.neo. Esse antígeno é importante na replicação dos plasmídeos e no aumento da expressão dos vetores resultando em maiores níveis de produção proteica ou viral.

4.2.3. Plasmídeos

4.2.3.1. Plasmídeos lentivirais para expressão dos genes de interesse

Os plasmídeos lentivirais utilizados nesse estudo foram derivados do plasmídeo de destino pDEST_R4_R2 gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ron Weiss - Diretor do Centro de Biologia Sintética do Departamento de Engenharia Biológica do *Massachusetts Institute of Technology* – MIT, Cambridge, MA, USA (Guye et al., 2013). A construção dos mesmos foi desenvolvida em seu laboratório sob a responsabilidade da Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes e contou com o auxílio da Dra. Velia Siciliano, como parte da colaboração obtida por meio da chamada FAPESP-MIT Processo Número 2013/50764-7 que permitiu a concretização dessa parceria.

A figura 4 mostra o esquema dos dois plasmídeos lentivirais utilizados nesse estudo: o vetor pLV_HeF1 α _GBA_Mut-1_UbC_Puro apresenta 13.592 pb e o vetor pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro apresenta 11.988 pb. Ambos os vetores são bicistrônicos, isto é, são portadores de dois genes de interesse que estão sob controle de diferentes promotores. Os genes de interesse (GBA_Mut-1 ou GFP) são expressos sob controle do promotor HeF1 α (*Human elongation factor-1 alpha*) (KIM et al., 2007) e o gene marcador de seleção confere resistência a puromicina (Puro) e está sob controle do promotor Ubiquitina (UbC).

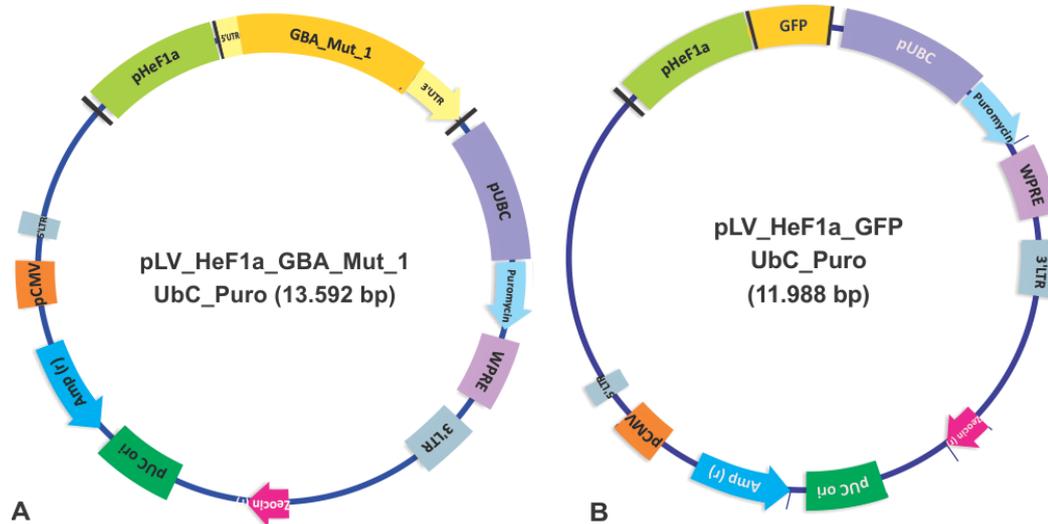


Figura 4. Representação esquemática do mapa físico dos vetores (A) pLV_HeF1α_GBA_Mut_1_UbC_Puro e (B) pLV_HeF1α_GFP_UbC_Puro.

4.2.3.2. Plasmídeos Acessórios

Para a produção de partículas lentivirais foram utilizados dois vetores plasmidiais acessórios: o plasmídeo pMD2.G que apresenta 5.824 pb e o plasmídeo p8.91 que apresenta 12.120 bp. Esses plasmídeos foram gentilmente cedidos por Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, SP.

A figura 5 mostra o esquema dos dois plasmídeos acessórios: o vetor pMD2.G é portador do gene que codifica o envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) sob controle do promotor CMV e o vetor p8.91 codifica os genes lentivirais *gag* e *pol*, também sob controle do promotor CMV. O gene *gag* codifica três proteínas finais, após o correto processamento: matriz, capsídeo e núcleo-capsídeo. O gene *pol* codifica três proteínas: a transcriptase reversa (RT), a integrase (IN) e a protease responsável pela maturação das proteínas dos genes *gag* e *pol*.

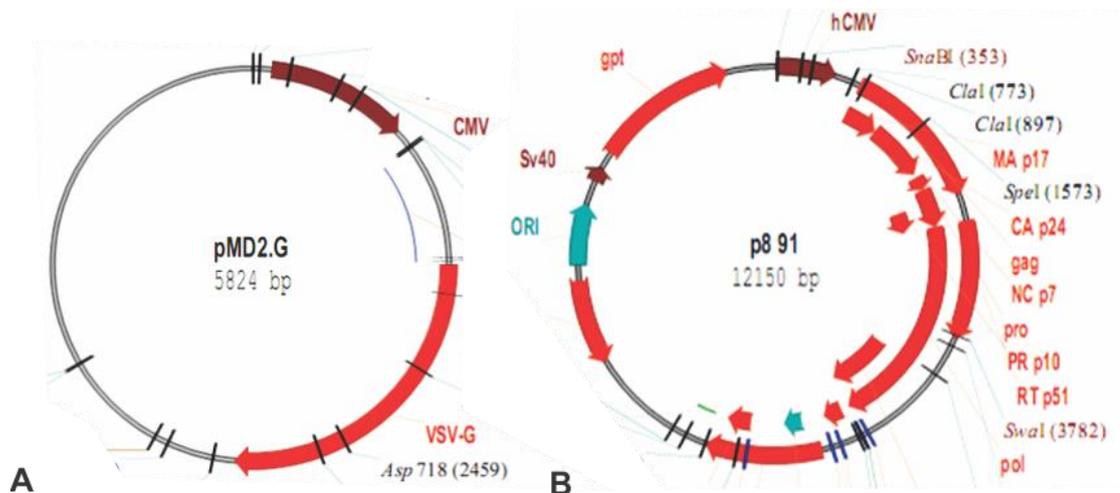


Figura 5. Representação esquemática do mapa físico dos plasmídeos acessórios (A) pMD2.G e (B) p8.91.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Preparo de DNA

4.3.1.1. Transformação Bacteriana

A transformação bacteriana foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Gomes, 2016, previamente padronizado em nosso laboratório. A cada 30 μL de suspensão de células quimiocompetentes (linhagem *E. coli* DH5 α) foram adicionados 20 ng dos plasmídeos de interesse. Em seguida, as bactérias foram incubadas no gelo por 30 minutos. Após esse período, as bactérias são submetidas à um choque térmico (42°C) por 30 segundos em banho de água e subsequente recolocadas no gelo por 5 minutos. Por fim, 200 μL de meio SOC foram adicionados às bactérias e as mesmas incubadas por 1h a 37°C sob agitação de 180 rpm.

Depois da incubação, cerca de 30 μL de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) na presença de ágar e suplementado com carbenicilina (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a fim de selecionar as bactérias recombinantes. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, *overnight* (12-16h), e em seguida armazenadas em geladeira (4°C).

4.3.1.2. Midi – Preparação de DNA Plasmidial

As colônias bacterianas de *E. coli* transformadas com os plasmídeos lentivirais ou com os plasmídeos acessórios foram inoculadas em 30 mL de meio LB na presença de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina e incubada sob agitação a 180 rpm, a 37°C, *overnight*. No dia seguinte, realizou-se a extração do DNA plasmidial seguindo o protocolo do QIAGEN® *Plasmid Plus Midi*. O protocolo do kit é baseado na técnica modificada de lise alcalina descrita por

Birnboim e Dolly (1979), onde foram adicionados os tampões P1, P2 e S3. Após o tratamento com essas soluções RNAs, proteínas e impurezas de baixo peso molecular foram removidas e o DNA plasmidial é então concentrado e precipitado.

A quantificação do DNA plasmidial obtido após sua extração, foi determinada no aparelho *NanoDrop*TM 1000 (*Thermo Scientific, Inc*) (Tabela 1). A pureza do DNA dos plasmídeos foi avaliada por meio da razão do comprimento de onda de 260/230 nm e 260/280 nm, considerando-se adequada a amostra cuja razão foi maior ou igual a 1.8. As amostras plasmidiais foram consideradas adequadas com base na pureza do DNA, para o experimento em questão.

Tabela 1. Quantificação dos DNAs plasmidiais pLV_HeF1 α _Mut-_UbC_Puro, pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro, pMD2.G e p8.91

Amostras	ng/ul	260/280	260/230
pLV_HeF1 α _Mut-_UbC_Puro	733,0	1,96	2,42
pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro	476,2	1,85	2,34
pMD2.G	588,8	1,89	2,38
p8.91	452,6	1,94	2,40

4.3.1.3. Extração de DNA Genômico da linhagem celular 293FT

Foi realizada a extração do DNA genômico da linhagem celular 293FT antes e após a transdução viral. Para tanto, foram plaqueadas 1×10^5 de células 293FT em placas 6 *well* e após 8 horas foi adicionado 2, 5 μ L e 10 μ L em duplicata dos concentrados dos sobrenadantes virais produzidos. Como controle, em 2 poços, 1×10^5 células 293FT não foram submetidas ao cultivo na presença do concentrado lentiviral. O reagente polibreno (hexadimethrine bromide, No catálogo 10689 ou H9268 – Sigma) foi adicionado em cada cultura celular na concentração de 6 μ g/ mL. Esse reagente é um polímero carregado positivamente e auxilia a adsorção das partículas lentivirais na membrana celular permitindo a transdução viral. Em seguida, procede-se o protocolo conhecido em “*spinoculation*” em que as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 40 minutos a 14°C para aumentar a eficiência da adsorção viral às mesmas, e, por fim, as células são colocadas na estufa. Após 48 horas foi extraído o DNA genômico da linhagem utilizando o *DNeasy Blood and Tissue Kit* conforme recomendações do fabricante.

4.3.1.4. Digestão do DNA Plasmidial com Enzima de Restrição

Para a determinação do título lentiviral por PCR em tempo real é necessário a linearização e purificação do DNA plasmidial. As reações de digestão de DNA plasmidial foram realizadas utilizando 2,0 µL da enzima de restrição HpaI (5.000 Units/ mL – No. Cat. R0105S, *New England Biolabs Inc.*), 1 µg do DNA plasmidial e 4 µl de tampão *Cutsmart* (10x). O volume final da reação foi de 40 µL, completando com água MiliQ quando necessário. As reações de digestão ocorreram durante 4 horas a uma temperatura de 37°C.

4.3.1.5. Purificação do DNA plasmidial após a Digestão Enzima de Restrição

As amostras de DNA plasmidial digeridas foram submetidas ao processo de purificação, utilizando o *Gel Band Purification Kit* (GE) conforme recomendações do fabricante.

4.3.1.6. Análise de Ácidos Nucleicos por Eletroforese em Gel de Agarose

Para verificar a integridade dos DNAs plasmidiais utilizados na produção de lentivírus e na determinação do título lentiviral, foram preparados géis de agarose a 1% (Figura 6). Os géis de agarose na concentração de 1,0% foram preparados com UltraPure™ Agarose (*Invitrogen – Life Technologies*) em tampão TAE 1,0X. A solução de agarose em TAE foi aquecida até dissolução completa. Após o resfriamento, foi adicionado 3-6 µL do reagente *Syber Safer Green*® (*Invitrogen – Life Technologies*). O DNA marcador referência utilizado foi o λDNA/Hind III [0,5mg/ml], e o *loading buffer* (LB) (Glicerol (50%), Azul de Bromofenol (0,125%), Xileno Cianol (0,125%), TE pH8,0). Foi aplicado no gel 7 µL de volume final, sendo 1 µL a 5 µL de DNA plasmidial (400 a 1000ng), 2 µL de LB e quando necessário, o restante foi completado com tampão TE (Tris-EDTA) pH 8,0.

A eletroforese foi realizada sob uma corrente de 100 volts por 40-60 minutos. A detecção dos ácidos nucléicos foi realizada por meio de um transluminador de luz ultravioleta. Conforme mostra a figura 6, os plasmídeos pLV_HeF1α_GFP_UbC_Puro, pLV_HeF1α_GBA_Mut-1_UbC_Puro e p8.91 com tamanho de 11.988, 13.592 e 12.150 pb, respectivamente, se encontram presentes entre as bandas de tamanho 23,1 e 9,4 kb e portanto, de acordo com o tamanho esperado. O plasmídeo pMD2.G que apresenta um tamanho de 5.824pb, se encontra entre as bandas de tamanho 6,5 e 4,3 kb e também apresenta o tamanho esperado.

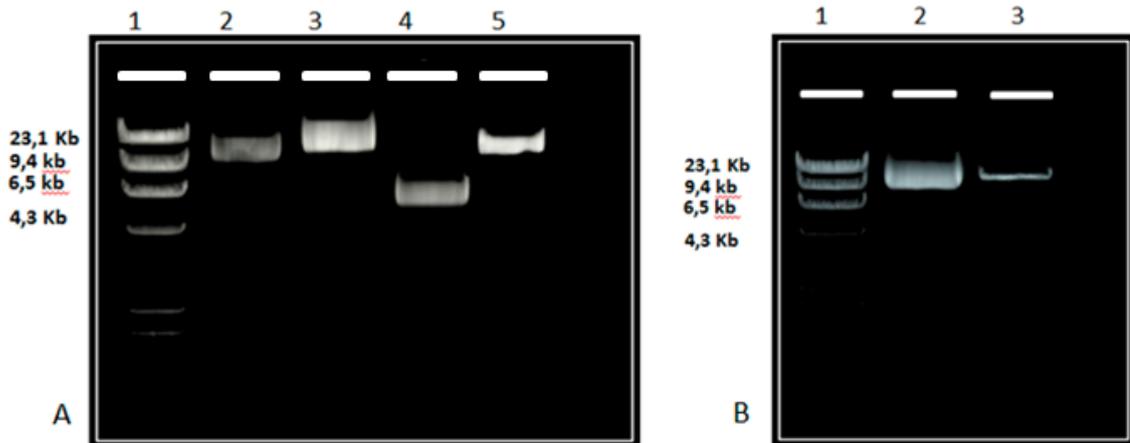


Figura 6. DNAs plasmidiais utilizados para a produção de partículas lentivirais. Eletroforese em gel de agarose. (A) raia 1 – Marcador λ DNA/HindIII; raia 2 – pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro; raia 3 – pLV_HeF1 α _Mut_UbC_Puro; raia 4 – pMD2.G e raia 5 – p8.91. (B) raia 1 – Marcador λ DNA/HindIII; raia 2 – pLV_HeF1 α _GBA_Mut-1_UbC_Puro não digerido e raia 3 – pLV_HeF1 α _GBA_Mut-1_UbC_Puro digerido.

4.3.2. Cultura de Células

4.3.2.1. Manutenção e Propagação de Linhagens Celulares Humanas

A linhagem celular 293FT, foi mantida em DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (Gibco – Life Technologies) suplementado com 10% de SFB (*Hyclone™ GE Healthcare Life Sciences*) previamente inativado em banho maria durante 30 minutos a 56°C, e 1% de antibiótico Pen/Strep - (Gibco – Life Technologies). As culturas foram plaqueadas em placas e garrafas de poliestireno estéreis, e colocadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Uma vez atingida a confluência, as células foram lavadas com PBS 1X, e em seguida foram submetidas ao tratamento com tripsina por 2 min. a 37°C para serem destacadas do fundo das garrafas de cultivo. Após esse período, é realizada a inativação da tripsina por meio da adição de 2 volumes de meio DMEM/10% SFB e as células transferidas para tubos Falcon de 15 mL. Em seguida, as células foram centrifugas a 1.200 rpm por 5 minutos, contadas e transferidas para nova placa de cultura ou congeladas para estoque.

4.3.2.2. Contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer

Para a contagem celular, o precipitado celular formado após a centrifugação foi ressuspensionado em meio DMEM/10%SFB. O volume em que as células foram ressuspensionadas é dependente do tamanho do precipitado celular. Em geral, a cultura resultante de 1 poço de 6

wells foi ressuspensionado em 500 µL ou 1 mL de meio DMEM/10% SFB, de acordo com a confluência celular. Por outro lado, a cultura resultante de uma garrafa p75 é ressuspensionada em 3-7 mL de meio DMEM/10% SFB, conforme a confluência celular. Em seguida, primeiro foi realizada uma diluição (D1), em geral 1:5 (120 µL de meio DMEM + 30 µL de células pré-ressuspensionadas). Por fim, foi realizada uma segunda diluição (D2) contendo 30 µL de D1 + 30 µL do corante *Trypan Blue Solution* (Sigma - Aldrich) a 0,4% (v/v). Para a contagem em *Câmara de Neubauer*, 10 µL de D2 foram aplicados em cada lado da mesma. As células viáveis foram observadas em microscópio óptico invertido e estimadas segundo a fórmula:

$$(\text{N}^{\circ} \text{ de células totais contadas} \div \text{quantidade de quadrantes contados}) \times \text{fator de diluição} \times 10^4 = \text{número de células/mL}$$

4.3.2.3. Criopreservação de Linhagens Celulares Humanas

Para a criopreservação das populações celulares geradas nesse estudo, bem como a linhagem celular 293FT antes da modificação gênica, as células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (p75) visando obter 1x10⁷ células, quantidade essa suficiente para obtenção de 5 criotubos (2-2,5 x 10⁶ células/criotubo). Para tanto, no dia 1 foram plaqueadas 3 x 10⁵ células/ garrafa p75. Após, 48 h a cultura foi suplementada com meio de cultura DMEM/10%SFB fresco. Em seguida, novo meio de cultura foi adicionado após 24-48 h e no dia seguinte as células foram submetidas ao tratamento com tripsina, como descrito acima, para a obtenção do precipitado celular.

Após a contagem na *Câmara de Neubauer*, acima descrito, as células foram submetidas a centrifugação a 1200 rpm por 5 min. e o precipitado celular foi ressuspensionado na solução de congelamento (90% SFB + 10% DMSO) e distribuído nos criotubos devidamente identificados. Por fim, as células foram mantidas no freezer -80°C por 24 h, antes de serem transferidas para o tanque de Nitrogênio líquido.

4.3.3. Preparo de Lentivírus

4.3.3.1. Produção de Sobrenadante Lentiviral

Para a produção do lentivírus, 2x10⁶ células 293FT foram plaqueadas em 5 placas de 145 mm² contendo 12 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico. Após 48 horas quando foi observada uma confluência de 70 – 80%, as células foram transfectadas com 12 µg do plasmídeo lentiviral, 6,5 µg do plasmídeo p8.91 e 3,2 µg do plasmídeo pMD2.G. Para a transfecção foi utilizado o reagente *Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent* (Invitrogen™ - Thermo Fisher Scientific Ref. L3000-008).

Para tanto, primeiramente foi retirado o meio DMEM/10% SFB, as células lavadas 1 vez em meio DMEM e adicionado 12 mL de meio DMEM/10% SFB fresco / placa de cultura. A segunda etapa foi preparar duas reações. Reação 1: em um volume 200 μ L de meio DMEM sem SFB foi realizada a mistura dos 3 DNAs plasmidiais circulares (na proporção 4:2:1), como descrito acima. Reação 2: foi adicionado 66,9 μ L do reagente lipofectamina 3000 e completado o volume para 100 μ L com a adição de 44,6 μ L do reagente de diluição P3000. Em seguida, estas duas reações foram misturadas e mantidas a temperatura ambiente por 10 min. para a formação do complexo DNA-lipossomo. Uma vez formado o complexo, essa solução foi adicionada sobre as células. Após 48 horas, o sobrenadante, o qual contém as partículas lentivirais (60 mL), foi coletado e centrifugado a 1500 rpm por 15 min. a 14°C para a remoção dos *debris* celulares. O sobrenadante coletado foi armazenado a 4°C. Por fim, foram adicionados novamente 12 ml de meio DMEM suplementado com SBF às placas de cultura para nova coleta de sobrenadante no dia seguinte. O procedimento da coleta do sobrenadante foi realizado como descrita acima e o sobrenadante foi armazenado a 4°C para a realização da concentração de 120 mL de sobrenadante lentiviral.

4.3.3.2. ELISA – Ensaio Imunoenzimático

Antes do processo de concentração do sobrenadante lentiviral, foi realizado um ensaio imunoenzimático para confirmação da presença do lentivírus pelo teste de ELISA. Essa análise permite detectar a presença do antígeno do capsídeo viral P24 e a mesma foi realizada no Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto com o auxílio da biomédica Renata Rosada De Biase. Essa análise é qualitativa e um valor acima de 1 significa positividade sobre a formação de vírus no sobrenadante celular.

Conforme mostra a Tabela 2, pode-se observar a presença de partículas virais para ambos plasmídeos lentivirais. O controle negativo não foi reativo como esperado.

Tabela 2. Ensaio Imunoenzimático de Elisa do antígeno p24 do HIV-1 para o diagnóstico sobre a formação de partículas lentivirais nos respectivos sobrenadantes das culturas celulares.

Amostras	Ensaio (P24)	Resultado	Resultado Branco
HeF1 α _GFP_Puro	HIV Ag/Ab	2049,55 S/CO Reativo	0,06 S/CO Não Reativo
HeF1 α _GFP_Puro	HIV Ag/Ab	2046,96 S/CO Reativo	0,08 S/CO Não Reativo
HeF1 α _GFP_Puro	HIV Ag/Ab	2044,86 S/CO Reativo	0,07 S/CO Não Reativo
HeF1 α _GBA_Mut-1_Puro	HIV Ag/Ab	2086,75 S/CO Reativo	0,08 S/CO Não Reativo
HeF1 α _GBA_Mut-1_Puro	HIV Ag/Ab	2087,56 S/CO Reativo	0,07 S/CO Não Reativo
HeF1 α _GBA_Mut-1_Puro	HIV Ag/Ab	2060,75 S/CO Reativo	0,07 S/CO Não Reativo

4.3.3.3. Concentração do Sobrenadante Lentiviral

Para a concentração do sobrenadante lentiviral, o mesmo foi transferido para tubos para uso na ultracentrífuga Beckman no laboratório do Prof. Dr. Roy Larson.

Foi preparado 100 mL de solução tampão de sacarose 20% segundo descrito por Kutner et al 2009. A solução tampão de sacarose contém: 20 mM Tampão HEPES, pH 7,4; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA e 20 g de sacarose. A cada tubo foi adicionado 30 mL de sobrenadante lentiviral e o tubo foi calibrado 2 a 2. Em seguida, o sobrenadante viral foi centrifugado em colchão de sacarose a 25000rpm, 4°C por 120 minutos. Para tanto, foi utilizada a ultracentrífuga *OPTIMATM XL 100K Ultracentrifuge* (SW28 Beckman rotor). Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos sobre papel toalha por 10 minutos. Em seguida, cada *pellet* lentiviral foi ressuscitado em 200 μ L de PBS 1x e estocado *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foram feitas alíquotas de 50 μ L do concentrado viral em tubos de 0,6mL, e estocadas em *freezer* -80°C.

4.3.3.4. Determinação do Título Lentiviral por Citometria de Fluxo

A determinação do título do sobrenadante lentiviral portador do gene GFP foi realizado por Citometria de Fluxo, a partir da obtenção do número de células GFP positivas 48 h após a infecção viral.

Para a obtenção da população celular GFP⁺ foram plaqueadas 1x10⁵ células 293FT em placas 6 *well* com meio DMEM suplementado com 10% de SBF, e após 8 horas foi adicionado 2, 5 μ L e 10 μ L em duplicata do concentrado viral GFP e 2 poços sem o

concentrado foi utilizado como controle. O reagente *Hexadimethrine Bromide (Polybrene® - Sigma Aldrich)* foi adicionado em cada poço na concentração de 6 µg/ mL. Em seguida as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 40 minutos a 14°C e colocadas na estufa. Após 8 horas o meio foi trocado e após 72 horas da transdução as células foram coletadas, centrifugadas e ressuspensas em 500 µL de PBS. As amostras celulares foram encaminhadas para análise da porcentagem de células GFP positivas em citômetro de fluxo FACScalibur™ (*Becton Dickinson Biosciences*) no laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto sob coordenação de Patrícia Vianna Bonini Palma. A fluorescência da proteína GFP é detectada pelo filtro de 530nm quando excitada pelo laser do FACS. As células não transduzidas foram utilizadas como controle negativo para calibração. O título viral foi calculado levando em consideração o número de células plaqueadas no dia 1, porcentagem de células positivas para o GFP e volume do sobrenadante. A equação utilizada foi a seguinte:

$$\text{TU/mL} = (\text{células plaqueadas no dia 1}) \times (\% \text{ GFP positivas}) \times 1000/\text{volume do sobrenadante}$$

4.3.3.5. Determinação do Título Lentiviral por PCR em Tempo Real

A determinação do título do sobrenadante lentiviral portador do gene GBA_Mut-1 foi realizado por qPCR em tempo real, a partir da obtenção do número de cópias da sequência LTR integradas na linhagem celular 293FT, 48 horas após a infecção viral. Para tanto, iniciou-se o protocolo como descrito acima, ou seja, foram plaqueadas 1×10^5 células 293T em 8 poços de placa 6 *well*, e após 8 horas, foi adicionado o concentrado viral nos volumes de 2µL, 5µL e 10µL em 2 poços cada (duplicata). Para garantir a infecção viral, foi adicionado *Hexadimethrine Bromide (Polybrene® - Sigma Aldrich)* na concentração de 6µg/mL. As células foram centrifugadas a 1200rpm por 40 minutos a 10°C. Entretanto, após 48 horas, ao invés da análise por citometria de fluxo, foi realizada a extração do DNA genômico com o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, CA, USA). Em seguida, foi feito um gel de agarose 1%, com o DNA genômico das transduções com diferentes volumes de vírus, para confirmação da integridade do DNA genômico.

4.3.3.5.1. Otimização e Eficiência do LTR

A sequência LTR (*Long Terminal Repeats*) apresenta sequências repetidas e está presente no vetor lentiviral flanqueando os genes GBA_Mut-1 e resistência a puromicina.

Essa região permite a integração do gene de interesse na célula-alvo e por isso pode ser utilizada para determinar o número de cópias LTR presente na célula 293FT.

As sequências LTR foram amplificadas pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o sistema TaqMan. Como controle endógeno foi utilizado o gene β -actina. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e a sonda estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Características dos *primers* utilizados

Sequência amplificada	<i>Primer</i>	Tamanho do Amplicon
LTR	<i>sense</i> 5'- GCCCGAACAGGGACTTGA -3'	61 bp
	<i>Antisense</i> 5'- CGAGTCCTGCGTCGAGAGA -3'	
Sonda LTR	6-FAM-AGCGAAAGGGAAACC-MGB/NFQ <i>reporter: FAM e Quencher: MGB e NFQ</i>	
ACTB	Hs03023880_g1 (<i>inventoried assay</i>)	139 bp

Foi realizada a otimização para se determinar a concentração ideal dos *primers* nos ensaios subsequentes. O volume de cada primer utilizado foi 0,9 μ L nas seguintes concentrações: 2,5 μ M; 1,25 μ M; 0,62 μ M e 0,31 μ M. A melhor concentração dos *primers* a ser utilizada pôde ser verificada na curva “*amplification plot*”, observando qual a menor concentração de *primers* que gerou uma máxima amplificação. Foi observado que essa concentração foi a de 1,25 μ M. A reação de amplificação da curva padrão para o LTR foi realizada em um volume final de 15 μ L contendo: 5,0 μ L do DNA plasmidial com diluições seriadas (300.000, 30.000, 3.000, 300 e 30 cópias); 7,5 μ L do reagente Taqman TaqMan™ Gene Expression Master Mix (2X), 0,7 μ L da sonda LTR (20X), 0,9 μ L de cada *primer* na concentração de 1,25 μ M.

Conforme mostra a figura 6, nessa concentração a curva obtida apresentou um coeficiente de determinação R^2 de 0,997 e *slope* igual a -3,493, revelando uma eficiência de amplificação de 93,3 % para o par de *primers* LTR na concentração final de 0,075 μ M.

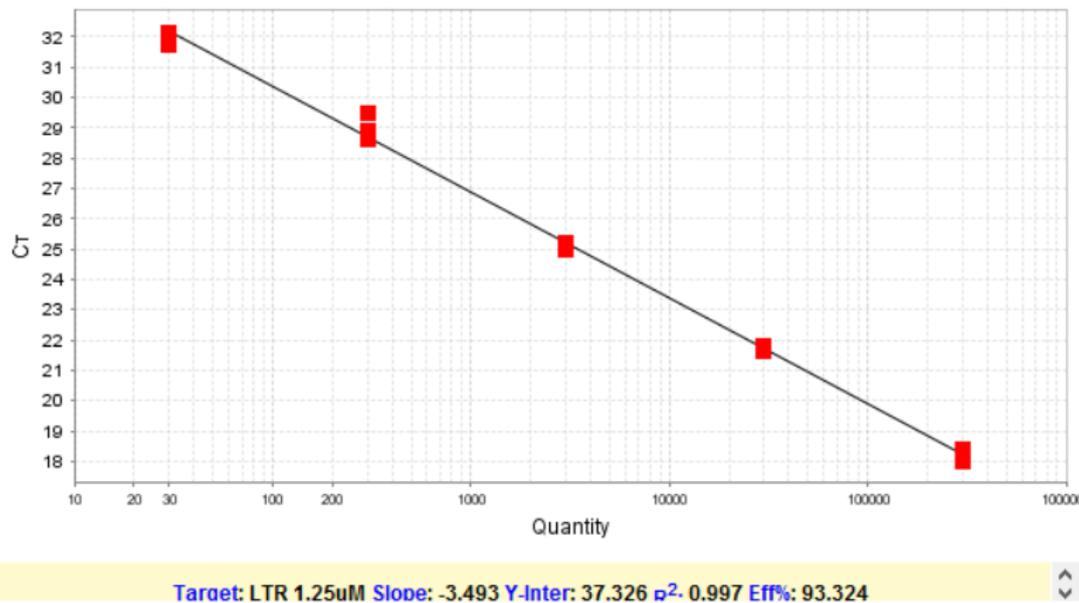


Figura 7. Curva de eficiência para padronização da amplificação da sequência LTR, utilizando a concentração final de cada um dos *primers* a 0,075 μ M. Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software *StepOnePlus™ System* do PCR em tempo real. O eixo do X representa o número de cópias do plasmídeo (escala logarítmica) e o eixo do Y apresenta os valores de C_Ts de cada diluição do plasmídeo.

Em seguida, foi necessário obter duas curvas padrão: 1) curva padrão para a sequência LTR utilizando o plasmídeo linearizado e digerido e 2) curva padrão para a β -actina (gene endógeno) utilizando o DNA genômico.

Para tanto, foram feitas diluições seriadas de 1:10 com o DNA genômico da linhagem celular 293FT e do DNA plasmidial linearizado pLV_HeF1a_GBA_Mut-1_UbC_Puro, com o valor inicial de 300.000 cópias do gene da β -actina e para o DNA plasmidial foram feitas as diluições com o valor inicial de 300.000 cópias da sequência LTR. O volume de plasmídeo necessário para obter o primeiro ponto da curva é obtido no site *Science Primer*, onde se deve colocar o tamanho do plasmídeo e a concentração em ng/ul obtida após quantificação. Em ambos os casos foram realizadas cinco diluições seriadas 1:10 até o valor de 30 cópias. O cálculo referente às diluições e número de cópias foi realizado de acordo com o protocolo “*Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR*” da *Applied Biosystems*.

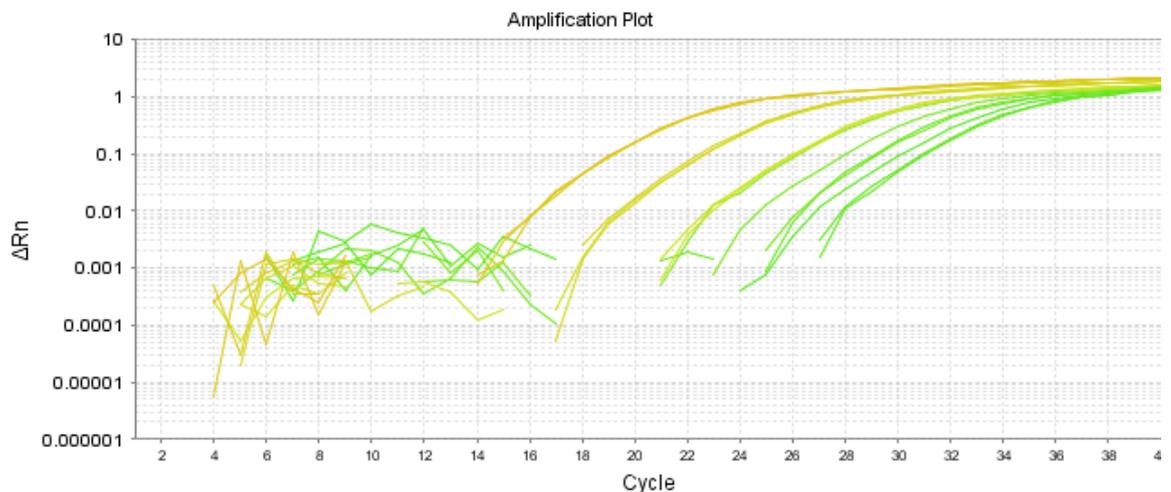
A reação de amplificação da β -actina foi realizada em um volume final de 15 μ L contendo: 5,0 μ L do DNA genômico de 293-FT virgem com diluições seriadas (300.000; 30.000; 3.000; 300 e 30 cópias), 7,5 μ L do reagente Taqman TaqMan™ Gene Expression

Master Mix (2X), 0,75 μL da sonda β actina (20X) e 1,75 μL de água. A reação de amplificação da curva padrão para o gene LTR foi realizada como descrita acima.

Foi utilizado o software *StepOnePlusTM System*, e a reação de PCR iniciou com desnaturação a 95°C por 10 minutos antes do início da ciclagem que consistiu de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação e 1 minuto a 60°C para amplificação. No final a reação foi mantida a 4°C.

As curvas de amplificação e padrão para amplificação da sequência LTR (Figura 8A e B) e do gene endógeno β -actina (Figura 9A e B). Para amplificação da sequência LTR observa-se na eletroforese dos *amplicons* que houve amplificação do DNA plasmidial de 300.000 cópias até 30 cópias (Figura 8A), com coeficiente de determinação R^2 de 0,99, slope de -3,227 e uma eficiência de amplificação de 104,129 % (Figura 8B). Para amplificação do gene β -actina observa-se na eletroforese dos *amplicons* que houve amplificação do DNA genômico de 300.000 cópias até 30 cópias (Figura 9A), com coeficiente de determinação R^2 de 0,99, slope de -3,29 e uma eficiência de amplificação de 101% (Figura 9B). A avaliação desses parâmetros indica que as reações estão adequadas para amplificação de ambas sequências de DNA.

A



B

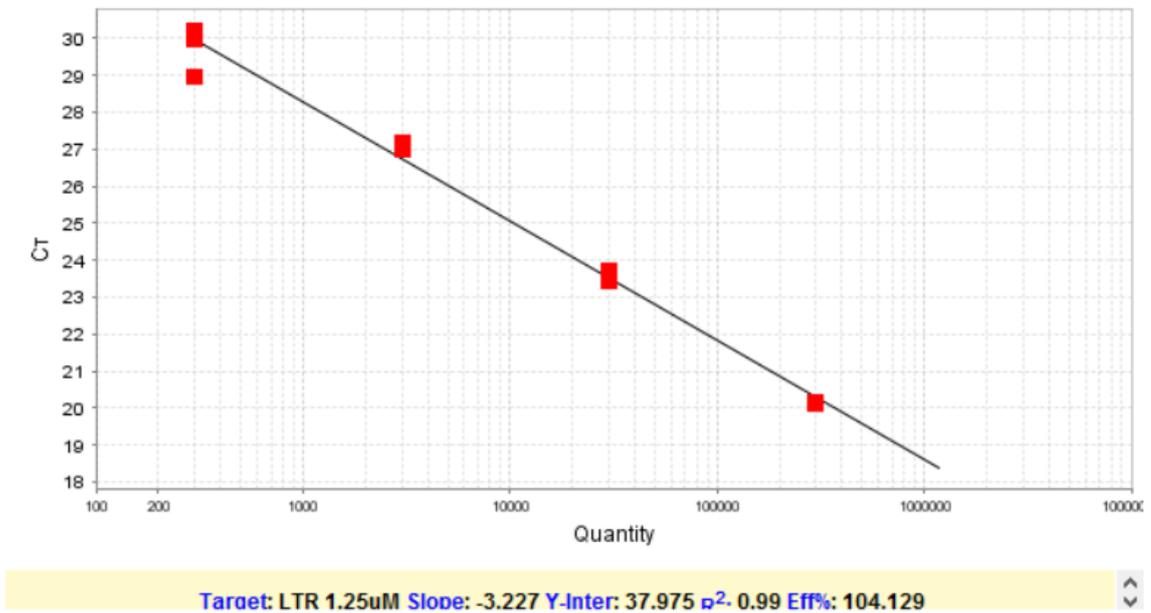
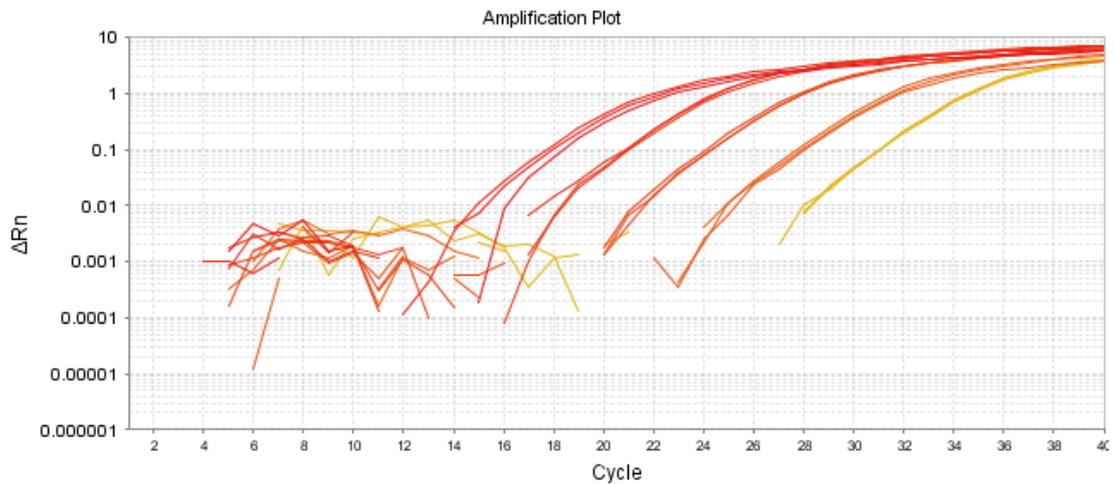


Figura 8. Curva de amplificação e curva padrão para amplificação da sequência LTR construída a partir de concentrações conhecidas do DNA plasmidial lentiviral associada ao parâmetro C_T , para cálculo do título viral. (A) Curva de amplificação da sequência LTR nas diluições seriadas do DNA plasmidial. O eixo do X representa os valores de C_T s de cada diluição do plasmídeo e o eixo Y representa o número de cópias do plasmídeo (B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software *StepOnePlus™ System* do PCR em tempo real. O eixo do X representa o número de cópias do plasmídeo (escala logarítmica) e o eixo do Y apresenta os valores de C_T s de cada diluição do plasmídeo.

A



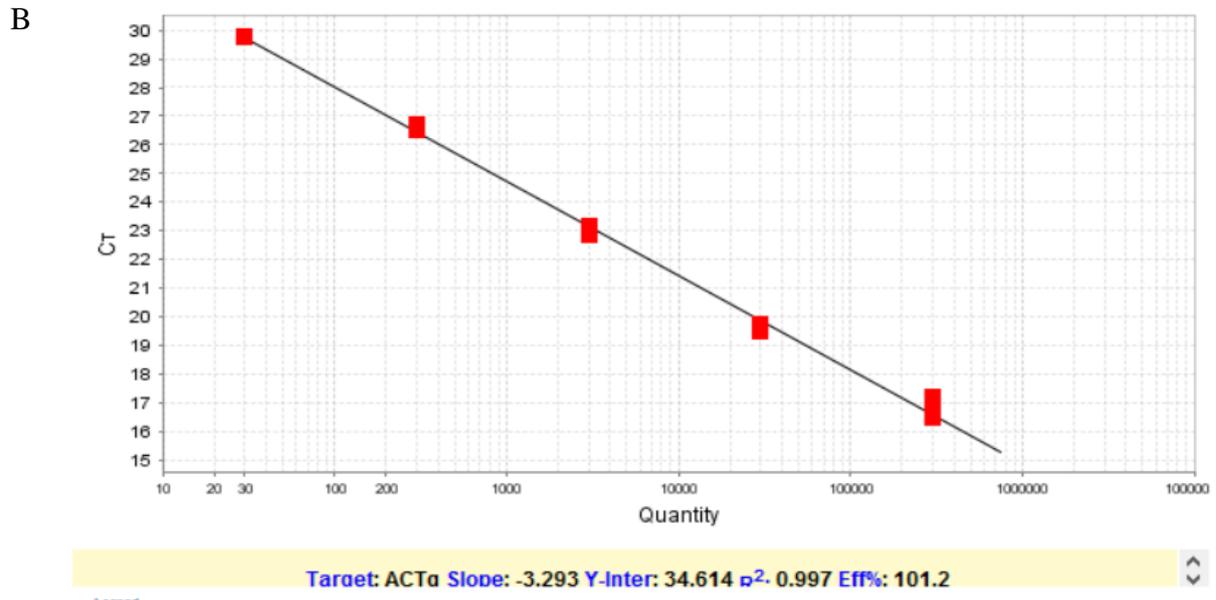


Figura 9. Curva de amplificação e curva padrão para amplificação do gene endógeno β -actina construída a partir de concentrações conhecidas do DNA genômico da célula virgem associada ao parâmetro C_T , para cálculo do título viral. (A) Curva de amplificação do gene β -actina nas diluições seriadas do DNA genômico. O eixo do X representa os valores de C_{Ts} de cada diluição do DNA genômico e o eixo Y representa o número de cópias do DNA genômico (B) Gráfico de regressão linear estabelecido pelo software *StepOnePlus™ System* do PCR em tempo real. O eixo do X representa o número de cópias do DNA genômico (escala logarítmica) e o eixo do Y apresenta os valores de C_T s de cada diluição do DNA genômico.

O cálculo do título viral foi realizado de acordo com Matsui e colaboradores (2007). Ao inserir esses valores na fórmula:

$$\text{Média do número de cópias LTR} / (\text{Média do número de cópias } \beta\text{-actina} / 2) \times \\ \text{Número de células plaqueadas} \times \text{Fator de diluição}$$

O ensaio de determinação do título viral foi realizado em duplicata.

4.3.4. Modificação Gênica de Linhagem Celular Humana

4.3.4.1. Transdução com Vetor Lentiviral portador do Gene GFP

O protocolo para a modificação da linhagem celular humana utilizando o concentrado viral é o mesmo utilizado para a determinação do título do sobrenadante lentiviral descrito na seção 4.3.3.4.

Para investigar a sensibilidade da linhagem celular 293-FT à infecção viral foram geradas duas populações celulares transduzidas com diferentes MOIs (do inglês *multiplicity of infection*). No primeiro caso, foi utilizado MOI igual a 1 (e apenas 1 ciclo de transdução) e no segundo caso foi utilizado o MOI igual a 10 (e foram realizados 3 ciclos de transdução).

Como descrito acima, a transdução foi realizada na presença de *Hexadimethrine Bromide* na concentração de 6µg/mL e foi utilizado o protocolo “*spinoculation*”.

Ao término da transdução, as células foram mantidas em cultura para recuperarem da infecção viral por 24-48h e prosseguiu-se com o tratamento com puromicina (seção 4.3.4.3) para a obtenção de uma população celular com produção estável de GFP.

4.3.4.2. Transdução com Vetor Lentiviral portador do Gene GBA_Mut-1

O protocolo para a modificação da linhagem celular humana utilizando o concentrado viral é o mesmo utilizado para a determinação do título do sobrenadante lentiviral descrito na seção 4.3.3.4.

Para a geração de uma população celular com produção estável de GBA_Mut-1 foi utilizado um único ciclo de transdução utilizando o MOI igual a 15. Ao término da transdução, foi esperado as células recuperarem da infecção viral por 24-48h e prosseguiu-se com o tratamento com puromicina para a obtenção de uma população celular com produção estável de GBA_Mut-1.

4.3.4.3. Tratamento com Antibiótico para Obtenção de uma População Celular com Produção estável da Proteína Recombinante

Em um trabalho anterior no laboratório foi realizada a curva dose-resposta para investigar a sensibilidade da linhagem celular 293FT ao tratamento com puromicina. Observou-se que a concentração de 2µg/mL de puromicina foi eficiente, pois no 5º dia as células não apresentavam viabilidade alguma. Portanto, utilizou essa dose para a seleção de das populações celulares com produção estável de GFP e GBA_Mut-1.

Para tanto, 5×10^4 células foram plaqueadas em placa 6 *well* em meio DMEM/10% SFB Após 24 h foi realizado o primeiro tratamento. O meio DMEM/10% SFB é retirado e substituído por meio fresco na presença de 2µg/mL de puromicina. O tratamento com o antibiótico foi diário e realizado por um período de 10 dias. Quando a cultura celular atingiu uma confluência de 90%, as células foram submetidas ao tratamento com tripsina e transferidas para uma garrafa de cultura p75 na concentração de 3×10^5 células/ garrafa. Após 24 h, para a adesão celular, prosseguiu-se com o tratamento de puromicina até completar 10 dias de tratamento.

Após a seleção com puromicina, as populações celulares foram expandidas para a criopreservação das mesmas e para a caracterização quanto o nível de produção das respectivas proteínas recombinantes.

4.3.5. Análise da Linhagem Celular Humana 293FT/GFP por Citometria de Fluxo

Após o descongelamento, as células foram transferidas para tubo cônico (Falcon) de 15 mL na presença de 5 mL de meio DMEM/10% SFB. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 min. a 15°C. Após centrifugação, a solução de congelamento foi retirada, sobrando apenas o precipitado celular. Em seguida, as células foram ressuspensas em 5mL de meio DMEM/10% SFB e transferidas para garrafas de cultura de 25 cm² (p25).

Após 48 h, o meio de cultura foi retirado e conforme a confluência, as células foram mantidas em cultura sob as mesmas condições, ou submetidas ao tratamento com tripsina e semeadas em placa 6 poços em meio DMEM/10% SFB.

Quando a cultura atingiu uma confluência de 90%, as células foram submetidas ao tratamento com tripsina para a obtenção da suspensão celular. Como controle, foi utilizada a linhagem celular 293FT virgem, isto é, antes da modificação gênica. Foi obtida a suspensão celular na concentração 1x10⁶ células/ mL em PBS 1x e analisadas em citômetro de fluxo *FACSScan*. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para GFP.

4.3.6. Análise da Linhagem Celular Humana 293FT/GBA_Mut-1

Para caracterização da linhagem celular com produção estável de GBA_Mut-1 foi avaliada o nível de produção da enzima recombinante GBA_Mut-1 secretada no sobrenadante da cultura celular e da enzima recombinante GBA_Mut-1 intracelular. No primeiro caso, o nível de enzima lisossomal recombinante produzida foi avaliada por mL de meio de cultura ou pelo número de células. No segundo caso, o nível de enzima lisossomal recombinante produzida é avaliada pela atividade específica, isto é, IU GBA/mg de proteína. Para tanto, foi necessário quantificar a proteína total por meio do método de Lowry.

Para a padronização do ensaio de atividade biológica da enzima lisossomal contamos com a colaboração da Profª. Dra. Vânia D'Almeida, coordenadora do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. A atividade biológica foi determinada por meio do ensaio fluorimétrico que permite avaliar a quantidade de moléculas fluorescentes presentes na amostra liberadas com o 4MU

4.3.6.1. Coleta do Sobrenadante Celular

Para a coleta do sobrenadante, 2x10⁵ células foram plaqueadas em placas 6 *well* com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. Após 24 horas, o meio foi retirado, as células foram lavadas 1 vez com 1 mL de meio DMEM sem SFB e em seguida foi

adicionado 1,8 mL de meio DMEM sem SFB. Após 48h, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1.500 rpm por 15 min. a 14°C para retirada dos *debris* celulares. Em seguida, o sobrenadante foi distribuído em alíquotas para armazenar a -80°C até o momento da análise da atividade biológica.

Além disso, as células foram submetidas ao tratamento com tripsina (400 µL) para a obtenção da suspensão celular e determinação do número de células/ cultura celular. Nesse caso, conforme a confluência da cultura, as células foram ressuspensas em 0,5-1,0 mL de meio DMEM/10% SFB para contagem em câmara de Neubauer.

4.3.6.2. Preparo de Extrato Proteico Celular

Para a coleta de proteína intracelular, $1,5 \times 10^5$ células foram plaqueadas em placas 6 *well*, com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. Após 24 horas, o meio foi descartado, as células foram lavadas em meio DMEM/10% SFB e adicionado 1,8 mL de meio DMEM/10% SFB. Após 48 horas, a coleta foi realizada. Para isso, o meio foi descartado, e as células lavadas com PBS e submetidas ao tratamento com tripsina (400 µL). Após a inativação da tripsina com 2 volumes de meio com SFB, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM/10% SFB e realizada a contagem do número de células em Câmara de Neubauer. Após a determinação do número de células, as mesmas são centrifugada, lavadas 1 vez em PBS e ressuspensas em 245 µL de *Mammalian Protein Extraction Buffer* (GE Healthcare Life Sciences) e 5 µL de Inibidor de Protease (Protease Inhibitor Cocktail P8340, Sigma). O extrato celular foi alíquotado e armazenado a -80°C.

4.3.6.3. Quantificação de Proteínas Totais pelo Método de Lowry

O método de Lowry utiliza-se do princípio da espectrofotometria descrita pela Lei de Lambert-Beer, a qual afirma que há uma relação linear entre a absorbância (A) e a concentração de determinada substância num dado comprimento de onda, desde que o caminho ótico seja constante (Lowry et al., 1951). Assim, foi preparada uma solução padrão de concentração conhecida, no caso, a albumina bovina (BSA) e a dosagem proteica foi realizada utilizando o *kit* colorimétrico *DC Protein Assay Reagent* (Bio-Rad – No Catálogo 500-0113 e 500-0114) e seguindo as recomendações do fabricante. Foi realizada uma diluição seriada 1:2 a partir da solução mãe, na concentração de 1,4 mg/mL. O princípio básico do método de Lowry consiste na ligação do reagente a aminoácidos tirosina e triptofano. Após a ligação às proteínas observa-se uma mudança no perfil cromático e a leitura pode ser realizada em comprimento de onda de 750 nm.

As proteínas foram quantificadas em um espectrofotômetro, a partir da construção da curva de calibração com albumina de soro bovino como padrão obtido após o preparo de quatro diluições da solução-mãe. As concentrações utilizadas da albumina de soro bovino foram: 1,4 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,35 mg/mL e 0,175 mg/mL.

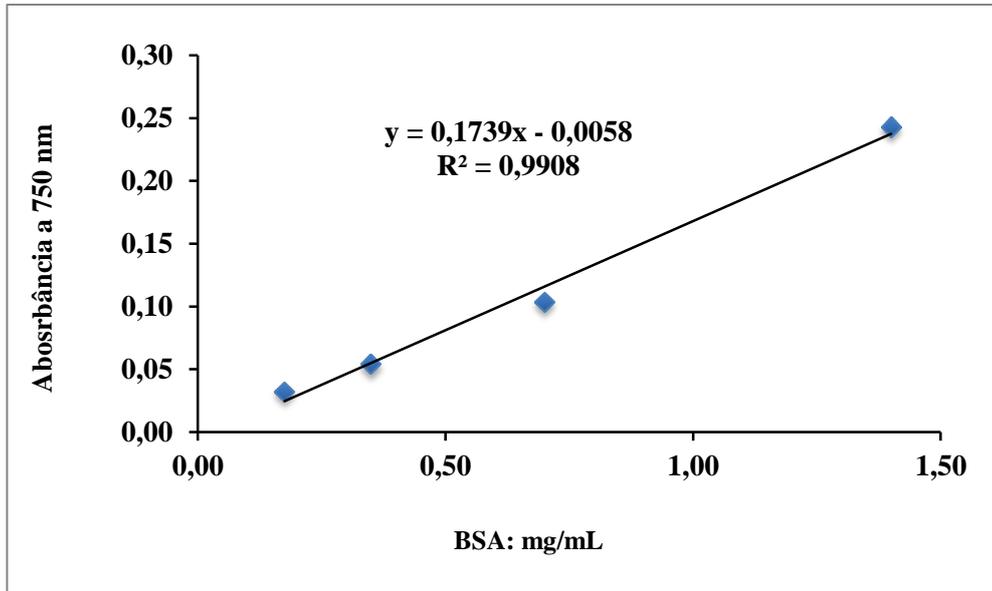


Figura 10. Gráfico da curva padrão para quantificação de proteínas pelo método de Lowry. A curva padrão foi construída com a BSA nas seguintes concentrações em mg/mL: 1,4; 0,7; 0,35 e 0,175.

Com base na equação da reta obtida e nos valores de leituras da absorbância, foram obtidos os valores das respectivas quantificações de proteína total (Tabela 4) de cada amostra. Esses valores foram utilizados para obter a diluição necessária para que seja adicionado entre 40-60 μ g de proteína na reação para a análise da atividade biológica.

Tabela 4. Quantificação de Proteínas das linhagens L20_293-FT_P2_GBA_Mut- 1 e 293FT virgem pelo método de Lowry

Culturas celulares	Proteínas (mg/ml)
293-FT Controle (1)	4,186
293-FT Controle (2)	4,158
293-FT Controle (3)	3,554
293-FT Controle (4)	4,560
L20_293-FT_P2_GBA_Mut-1 (1)	3,525
L20_293-FT_P2_GBA_Mut-1 (2)	3,611
L20_293-FT_P2_GBA_Mut-1 (3)	2,979
L20_293-FT_P2_GBA_Mut-1 (4)	2,202
Leucócito	1,340

4.3.6.4. Análise da Atividade Biológica da Enzima Lisossomal por Fluorimetria

O método permite medir a intensidade de fluorescência emitida pelo composto fluorescente 4-metilumbeliferona (4MU) utilizando comprimento de onda de excitação de 360 nm e emissão de 450 nm. As leituras foram realizadas nos fluorímetros *SpectraMax M2* (Molecular Devices, UNIFESP) e *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer* (Agilent, USP).

Para tanto, primeiro foi construída uma curva padrão contendo concentrações conhecidas do substrato sintético 4-MU e realizada a leitura no fluorímetro utilizando os comprimentos de onda acima descritos. No caso da fluorescência, sua intensidade nem sempre é função linear da concentração porque ela é muito mais suscetível a variação de fatores ambientais (pH, temperatura etc.) do que a absorbância. Além disso, a fluorescência emitida por uma substância pode também ser absorvida ou diminuída por outras substâncias da amostra (*quenching*). A curva padrão com o composto 4-MU deve ser realizada em cada análise enzimática e uma das curvas obtidas está representada na figura 10. A partir da curva padrão pode-se obter a quantidade de 4 MU liberada nas respectivas amostras biológicas.

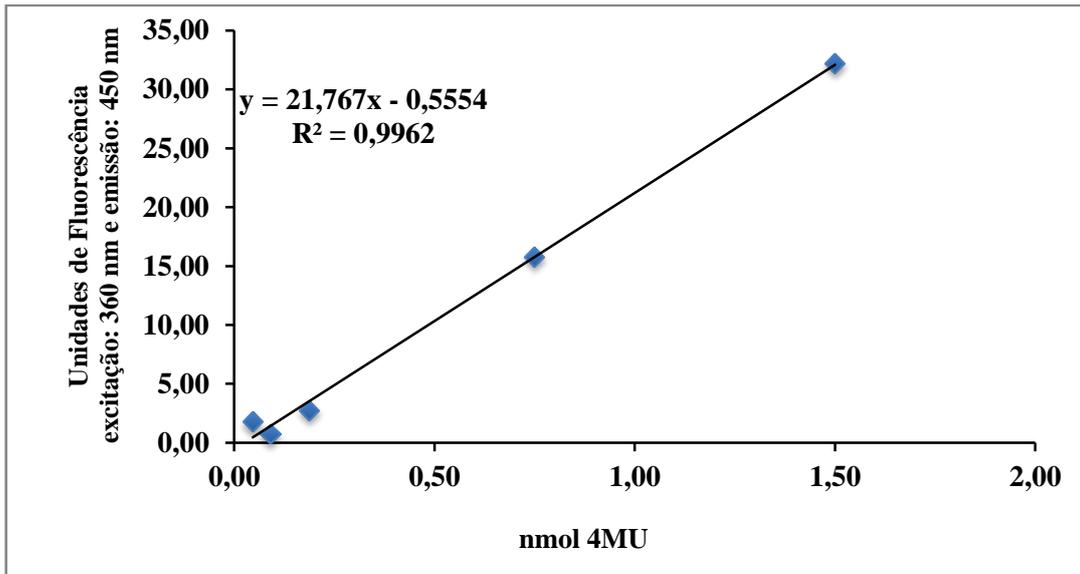


Figura 11. Gráfico da curva padrão para determinação da atividade biológica *in vitro* da GBA. A curva padrão foi construída com o substrato sintético 4MU nas seguintes concentrações em nmol: 1,5; 0,75; 0,1875; 0,09375 e 0,0468.

Como controle da reação foi utilizado um *pool* de leucócitos de pessoas saudáveis. Esse precipitado celular foi sonificado (amplitude 60%) para que ocorra a lise celular (3 vezes de 10 segundos cada) ou até formar uma solução homogênea. Antes de realizar a dosagem enzimática, foi avaliada a quantidade de proteína presente na amostra. Após a leitura da proteína, os resultados foram analisados para que o valor de absorbância obtido nesta leitura corresponda a uma quantidade de proteína entre 40-60µg nos 30µl de amostra que foi utilizado no ensaio de atividade.

O ensaio de atividade biológica foi realizado em tubo Eppendorf âmbar em um volume final de 100 µL nas seguintes condições: 20µl de solução trabalho (TDC [taurocolato de sódio] a 2% + tampão citrato/ fosfato 0,5 M pH 5,0); 50 µL de substrato 4 metilumbeliferona – β-D- glicopiranosídeo (4MUG, 20 mM) e 30µl da amostra (sobrenadante ou lisado celular recém sonificado com 40 a 60 µg de proteína total). As reações foram incubadas a 37°C em banho maria por 2h, sob agitação de 100 rpm. Após 2h, as amostras foram resfriadas em gelo por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL da solução STOP (0,25 M glicina, pH 5,1) e realizou-se a leitura em fluorímetro como descrito acima. Para tanto, foram transferidos 300 µL da solução de reação em placa preta.

Uma unidade de atividade biológica da enzima lisossomal GBA foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de 4 MU por hora e por mL de meio de cultura. A atividade específica foi definida como a atividade biológica da enzima GBA por mg de proteína.

4.3.7. Análises Estatísticas

A estratégia utilizada para a análise dos resultados foi a utilização de métodos estatísticos considerando o pequeno número de amostras ($n=4$)/ grupo e a grande dispersão dos dados. Para análise estatística dos dados referentes à avaliação da atividade biológica da enzima lisossomal GBA secretada e intracelular na população celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 e população celular virgem foi aplicado o teste t assumindo que as variâncias das duas populações são diferentes, ou Teste t de Welch. A hipótese nula assume que a média do nível da enzima GBA nas duas populações celulares, no caso a população celular virgem e a população celular modificada geneticamente utilizando o sistema lentiviral, são similares. A hipótese alternativa indica que as duas populações celulares produzem níveis diferentes da enzima lisossomal GBA.

Apesar do número pequeno de amostras optamos por realizar uma análise estatística para investigar uma possível associação entre o nível de enzima secretada e o nível de enzima intracelular para ambas populações celulares (293FT virgem e L20_293-FT_GBA_Mut-1). Para tanto, foi determinado o coeficiente de correlação de Spearman a partir do nível de enzima secretada/ 10^6 células *versus* o nível de enzima intracelular/ 10^6 células sem qualquer restrição sobre a distribuição dos valores.

Os gráficos foram gerados pelo software GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA) e o programa R (versão 3.4.3) e as análises estatísticas foram realizadas pelo programa R.

5. RESULTADOS

Os resultados a seguir estão organizados em duas partes: a primeira parte mostra a geração de duas linhagens celulares com produção estável de GFP, sob controle do promotor HeF1 α e a segunda parte mostra a geração de uma linhagem celular com produção estável da enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante e mutante nomeada por GBA_Mut-1 sob controle do promotor HeF1 α .

Em um trabalho anterior, essa enzima lisossomal recombinante e mutante GBA_Mut-1 foi caracterizada por meio da produção transiente na linhagem celular 293FT e mostrou apresentar níveis mais elevados da enzima lisossomal, quando comparada às outras moléculas recombinantes mutantes. Nesse estudo, essa enzima GBA_Mut-1 foi caracterizada por meio da produção estável na linhagem celular humana 293FT.

5.1. A construção plasmidial pLV_HeF1 α _GFP_UbC_Puro portadora de GFP sob controle do promotor HeF1 α apresenta capacidade de formar partículas virais

Para geração de uma linhagem celular com produção estável de GFP é necessário o cálculo do título viral para que a linhagem celular humana possa ser modificada com um MOI (multiplicidade de infecção) conhecido. Nesse caso, o título viral pode ser determinado a partir da análise da eficiência de transdução lentiviral avaliada por citometria de fluxo (FACS) como a porcentagem de células 293-FT/GFP⁺ pela intensidade de fluorescência.

Para tanto, uma quantidade definida de células foi submetida a diferentes volumes virais e a porcentagem de células positivas para o GFP foi avaliada 48 h após a infecção. Conforme mostra as figuras 12 e 13, as populações celulares apresentaram uma média de células positivas de 16,5%, 29,9% e 39,3% para 2 μ L, 5 μ L e 10 μ L do concentrado lentiviral, respectivamente.

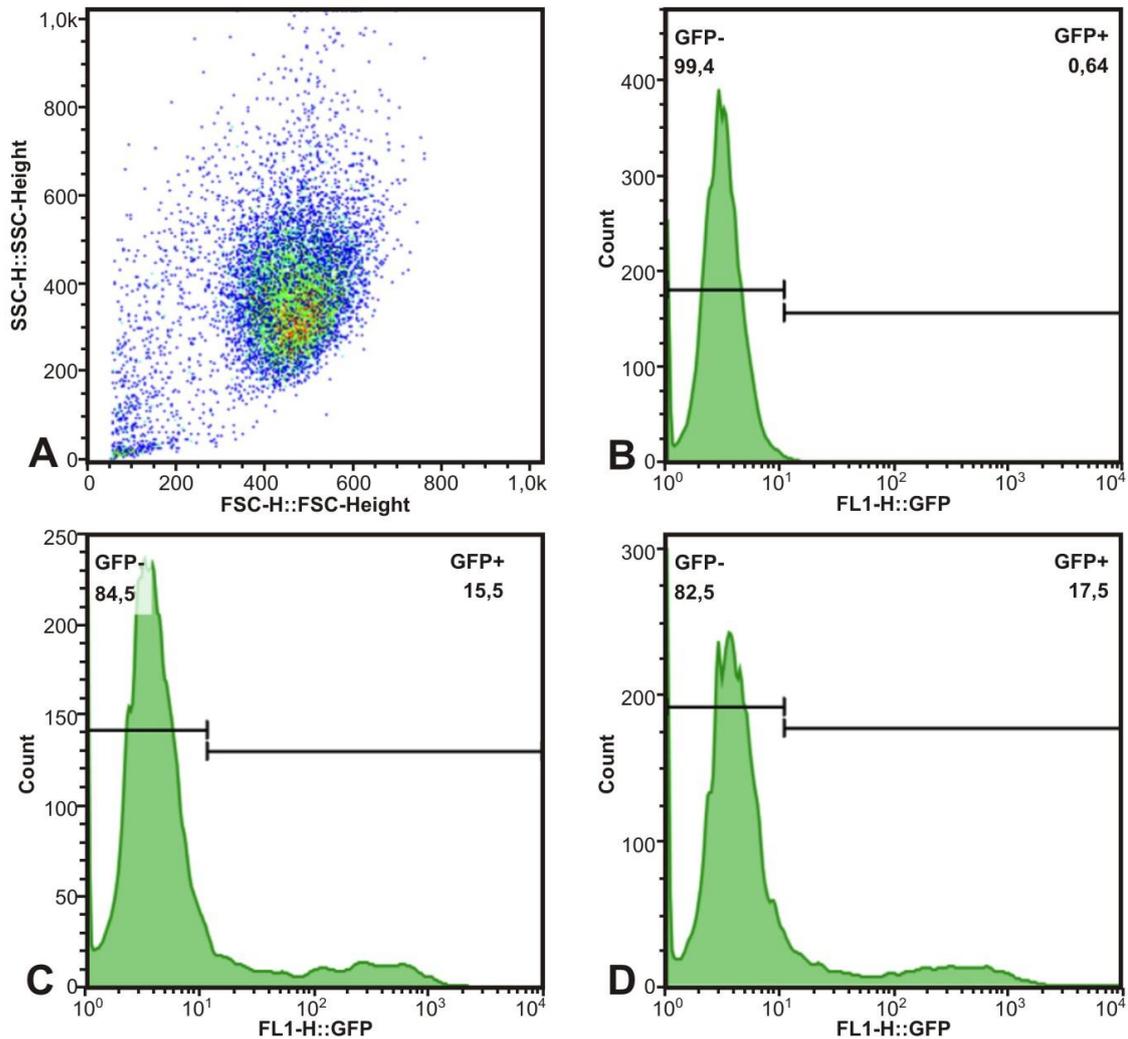


Figura 12. Porcentagem de células 293FT que expressam GFP antes e após a transdução lentiviral, a partir da avaliação por FACS. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular 293-FT de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade). (B) análise por citometria de fluxo mostrando a ausência de células positivas para GFP na população celular 293FT virgem. O gráfico de histograma com intensidade de fluorescência vs número de eventos avaliados mostra que a curva até 10^1 representa a população 293FT negativa para GFP. (C e D) porcentagem de células 293FT positivas para GFP, 48 h após a transdução com 2 μ L do concentrado lentiviral portador do gene GFP.

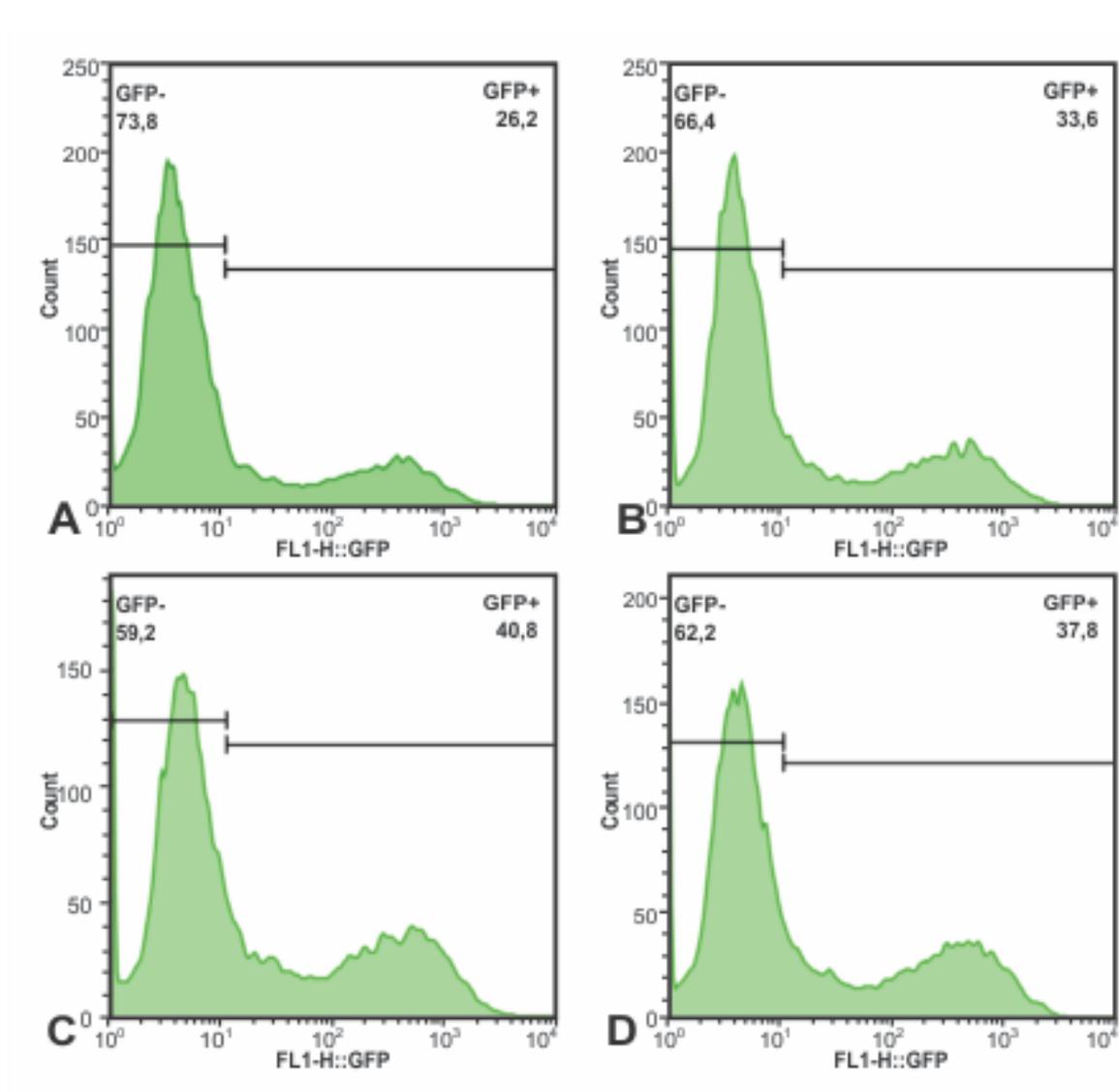


Figura 13. Porcentagem de células 293FT que expressam GFP, após a transdução com diferentes concentrações de lentivírus, a partir da avaliação por FACS. (E e F) porcentagem de células 293FT positivas para GFP, 48 h após a transdução com 5 μ L do concentrado lentiviral portador do gene GFP. (G e H) porcentagem de células 293FT positivas para GFP, 48 h após a transdução com 10 μ L do concentrado lentiviral portador do gene GFP.

A partir destes dados de positividade de GFP por citometria de fluxo pôde-se obter o título viral no sobrenadante da cultura celular. O título médio obtido foi da ordem de $7,9 \times 10^6$ unidades transducionais por mililitro de sobrenadante viral.

5.2. Avaliação da eficiência da transdução *ex vivo* da linhagem celular 293-FT utilizando o sistema lentiviral

Devido ao potencial interesse terapêutico de se conseguir realizar a transferência de material genético em uma célula humana utilizando o sistema lentiviral em ensaios de terapia gênica com baixa carga viral, bem como, ensaios de terapia celular com foco no processo de reprogramação gênica, ou ainda, o interesse biotecnológico de se conseguir gerar uma célula humana com várias cópias do gene terapêutico para a produção em larga escala do mesmo foi investigada a eficiência de transdução *ex vivo* da célula humana 293-FT frente a exposição a diferentes cargas virais e a capacidade de modificar permanentemente o conteúdo genético da célula alvo. Para tanto, foram geradas duas populações celulares com produção estável de GFP: 1) L22_293-FT_GFP_M1, a qual foi submetida a um único ciclo de transdução com MOI igual a 1 e 2) L22_293-FT_GFP_M10 a qual foi submetida a três ciclos de transdução com MOI igual a 10. Após a transdução, as populações celulares foram submetidas ao tratamento com o antibiótico puromicina (2 µg/mL) por 10 dias e ao término da recuperação desse tratamento, as populações celulares foram caracterizadas quanto ao nível de expressão de GFP.

Conforme mostra a figura 14, a população celular L22_293-FT_GFP_M1 apresenta níveis de GFP da ordem de 67% (figura 14C) e a população celular L22_293-FT_GFP_M10 apresenta níveis de GFP da ordem de 97,4% (figura 14 D). Observou-se também que a população celular não transduzida não expressa GFP (figura 14 B). Portanto, concluímos que é possível infecção da linhagem celular humana 293FT com baixa carga viral (MOI 1) e que a infecção com maior carga viral (MOI 10) promoveu um aumento no percentual de células GFP⁺.

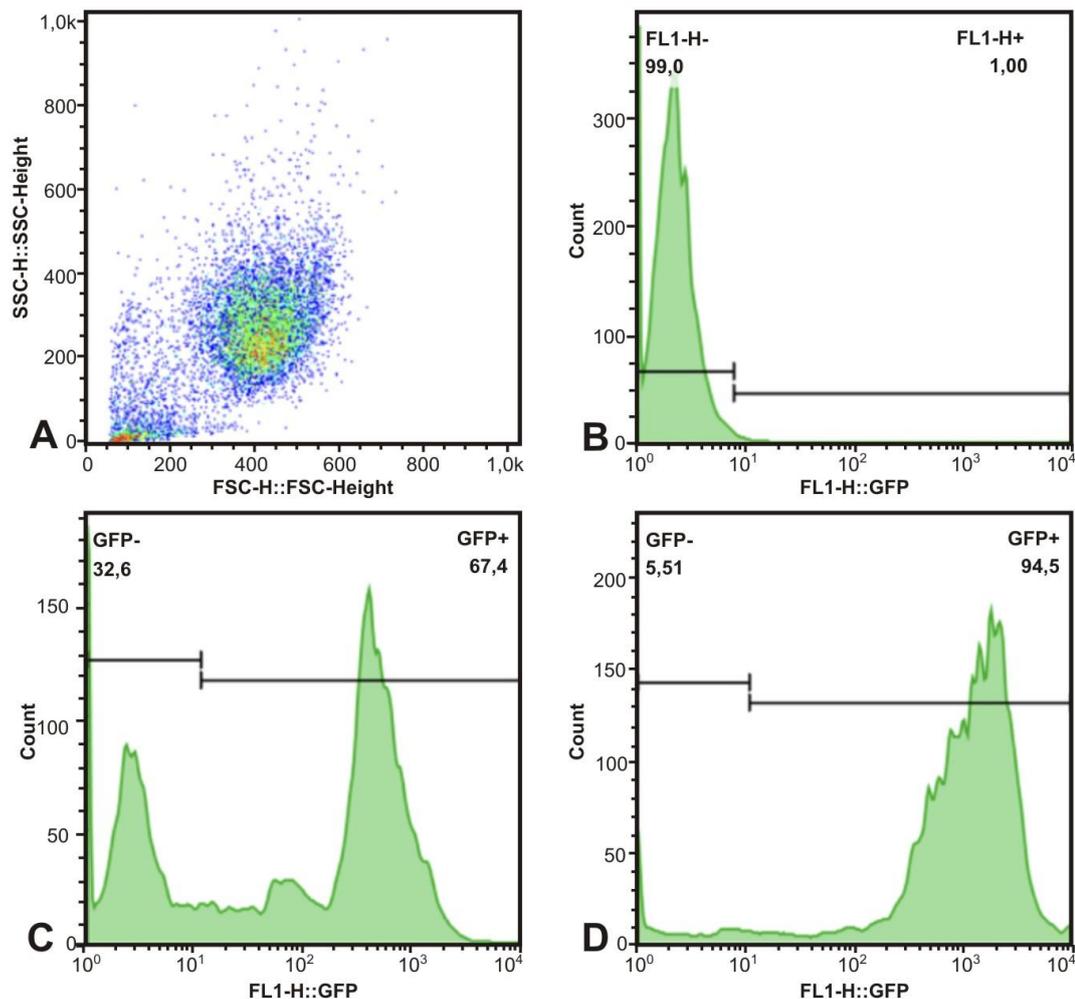


Figura 14. Caracterização de duas populações celulares transgênicas com expressão permanente de GFP, após o tratamento com puromicina. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular 293-FT de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade). (B) análise por citometria de fluxo mostrando a ausência de células positivas para GFP na população celular 293FT antes da transdução lentiviral. (C) população celular transgênica L22_293-FT_GFP_M1 em que 67% das células expressam GFP. (D) população celular transgênica L22_293-FT_GFP_M10 em que 97,4% das células expressam GFP.

Foi interessante observar que a população celular transduzida com baixa carga viral é mais heterogênea quanto o nível de expressão de GFP mesmo após a seleção com puromicina, quando comparada a população celular que recebeu maior carga viral. A análise por citometria de fluxo permitiu identificar que a linhagem celular L22_293-FT_GFP_M1 apresenta três subpopulações distintas fenotipicamente, com relação ao nível de expressão do transgene. Conforme mostra a figura 15 (A e B), a subpopulação mais abundante nomeada por P1 (cerca de 50% da população total) expressa níveis mais elevados de GFP, porém há pelo menos duas outras subpopulações celulares que podem ser detectadas por citometria de

fluxo com menores níveis de GFP. Essas duas subpopulações nomeadas por P2 e P3 estão presentes nas proporções 7,1% e 4,6%, respectivamente.

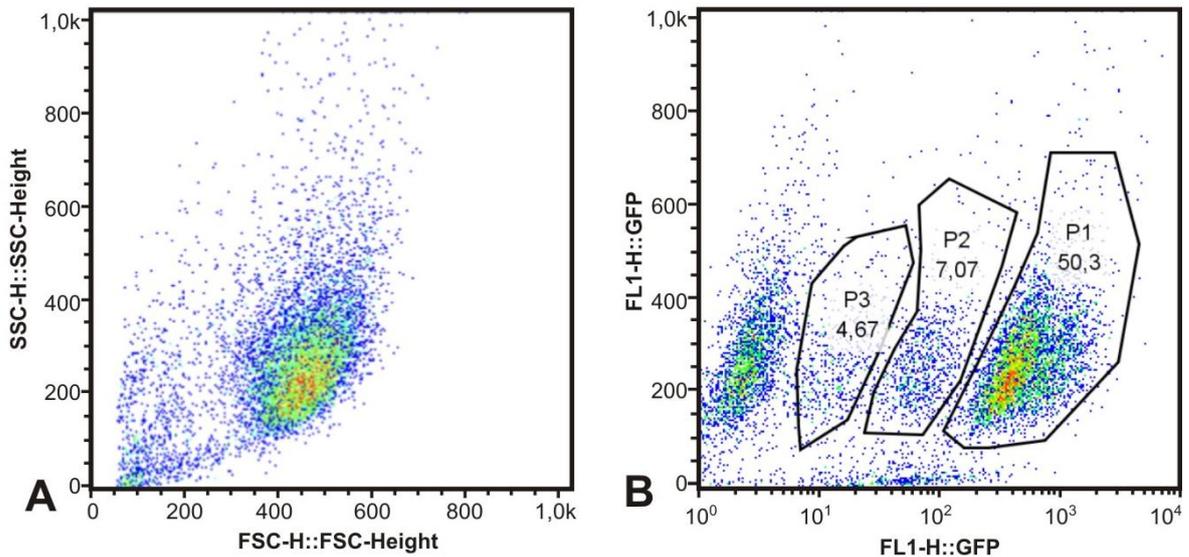


Figura 15. Heterogeneidade da população celular transgênica L22_293-FT_GFP_M1. Análise das subpopulações obtidas após a seleção com puromicina. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular L22_293-FT_GFP_M1 de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulosidade e complexidade) (B) gráfico *dotplot* demonstrando as 3 subpopulações P1, P2 e P3 que expressam diferentes níveis de GFP.

Por outro lado, a população transgênica L22_293-FT_GFP_M10 é mais homogênea em relação ao nível de expressão de GFP. Conforme mostra a figura 16, a análise por citometria de fluxo permitiu identificar duas subpopulações distintas fenotipicamente, com relação ao nível de expressão do transgene: a subpopulação P1 presente na proporção de 86% e expressa elevados níveis de GFP e a subpopulação P2 presente na proporção de 2% e expressa níveis intermediários de GFP.

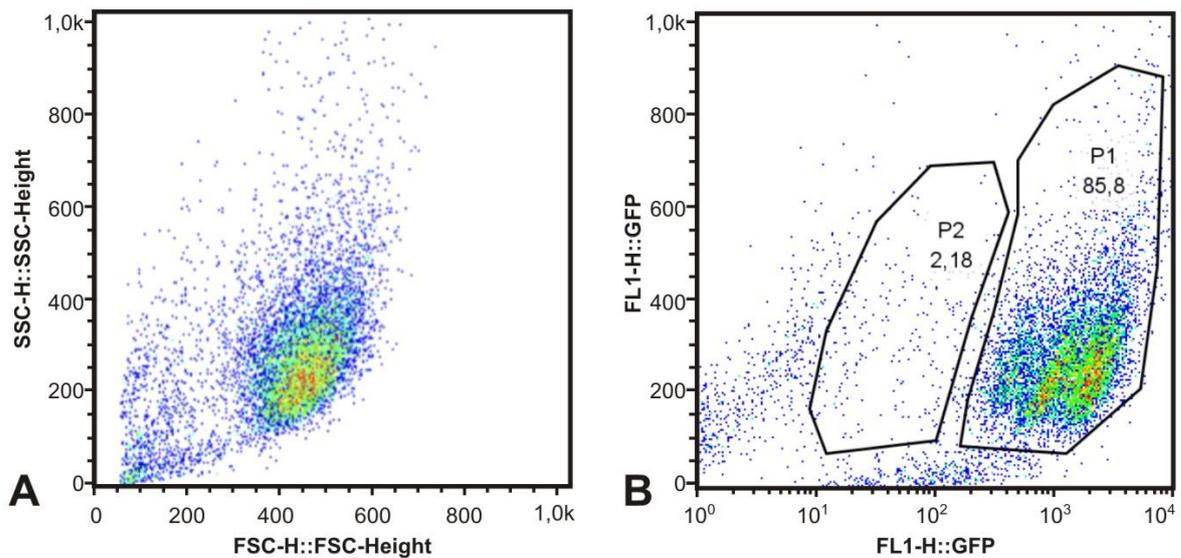


Figura 16. Menor heterogeneidade da população celular transgênica L22_293-FT_GFP_M10. Análise da população celular com produção permanente de GFP por citometria de fluxo. (A) gráfico *dotplot* para identificação da população celular L22_293-FT_GFP_M1 de acordo com os parâmetros de dispersão frontal (FSC, tamanho e forma celular) e dispersão lateral (SSC, granulicidade e complexidade) (B) gráfico *dotplot* demonstrando que 90% da população celular expressa elevados níveis de GFP.

Esses dados sugerem que a modificação gênica de linhagens celulares humanas com maior carga viral favorece a obtenção de populações transgênicas mais homogêneas. Com base nesses dados, prosseguiu-se o estudo para a geração de uma terceira população celular transgênica com MOI igual a 15.

5.3. Geração de uma população celular humana com produção permanente do transgene GBA_Mut-1.

O primeiro passo foi determinar o título viral, nesse caso, por PCR em tempo real. Para tanto, a linhagem celular 293FT foi transduzida com três diferentes concentrações virais. Após 48 h, as células foram coletadas, o DNA genômico isolado e avaliada a integração do DNA proviral por meio da amplificação da sequência LTR. Como controle endógeno foi selecionado o gene da β -actina.

Conforme mostra a tabela 5, quanto maior a carga viral, maior o título viral. Para determinação do título viral foi considerado a média dos três ensaios experimentais indicando um título viral da ordem de $4,3 \times 10^7$ TU/ml.

Tabela 5. Título do sobrenadante viral utilizando diferentes concentrações virais

Amostras	Título Viral (UT/mL)
293-FT/ 2 µL Concentrado Viral (LV_GBA_Mut-1)	1 x 10 ⁷
293-FT/ 5 µL Concentrado Viral (LV_GBA_Mut-1)	4 x 10 ⁷
293-FT/ 10 µL Concentrado Viral (LV_GBA_Mut-1)	8 x 10 ⁷
Média	4,3 x 10⁷

O próximo passo foi gerar uma população celular com produção estável da enzima lisossomal GBA-Mut-1. Para tanto, a linhagem celular 293-FT foi transduzida com o vetor LV_GBA_mut-1 utilizando MOI de 15. Cerca de 48-72 h após a transdução, as células foram submetidas ao tratamento com puromicina durante 10 dias. Após a recuperação desse tratamento, a população celular L20_293-FT/GBA_Mut-1 foi caracterizada quanto o nível de produção da enzima lisossomal recombinante secretada e intracelular.

Para estabelecer o nível de produção de GBA_mut-1 em monocamada na ausência de 10% SFB, a linhagem celular L20_293-FT/GBA_mut-1 foi cultivada em placas de 6 poços até a obtenção de 50% de confluência. A partir desse momento, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 1,8 mL de meio de cultura fresco sem SFB. Após 48 h, o meio de cultura foi coletado e mantido a -80C até a avaliação da atividade biológica. O cultivo da linhagem celular virgem foi realizado sob as mesmas condições e a atividade biológica foi avaliada simultaneamente. Conforme mostra a figura 17, após 48 h a célula virgem secreta níveis de GBA da ordem de $4,35 \pm 0,78$ U/mL, enquanto a população celular L20_293-FT/GBA_Mut-1 produz níveis de GBA da ordem de $34,19 \pm 4,74$ U/mL, cerca de 7,85 vezes maior que a célula virgem. Essa diferença é significativa (t-test *two sample*, $p = 0,0071$ com teste de *Welch* assumindo as variâncias desiguais).

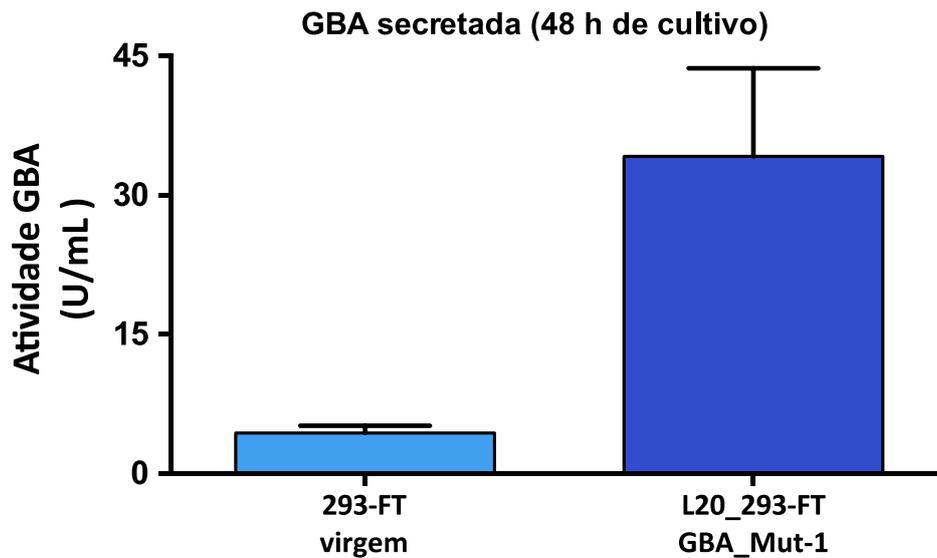


Figura 17. Produção da enzima lisossomal GBA na ausência de SFB, pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1, após 48 h de cultivo estático em monocamada. O número de unidades de GBA biologicamente ativa foi determinado pelo ensaio fluorimétrico. A linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 produz 7,85 vezes mais GBA que a linhagem celular virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,0071$).

As medidas de atividade biológica de GBA foram determinadas pelo número de células presentes em cada cultura celular. Assim, após a coleta do sobrenadante, as células foram coletadas e quantificadas após o cultivo sem SFB. A partir desses valores pôde-se obter a produtividade da linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1 em cultivo em monocamada. Conforme mostra a figura 18, a produtividade dessa linhagem celular em meio sem SFB foi da ordem de $38,74 \pm 4,8 \text{ U/ } 10^6$ células, enquanto a produtividade da célula virgem é da ordem de $3,8 \pm 0,6 \text{ U/ } 10^6$ células. Isso indica um aumento de produtividade de 10,14 vezes. Essa diferença é significativa (t-test *two sample*, $p = 0,0049$ com teste de *Welch* assumindo as variâncias desiguais).

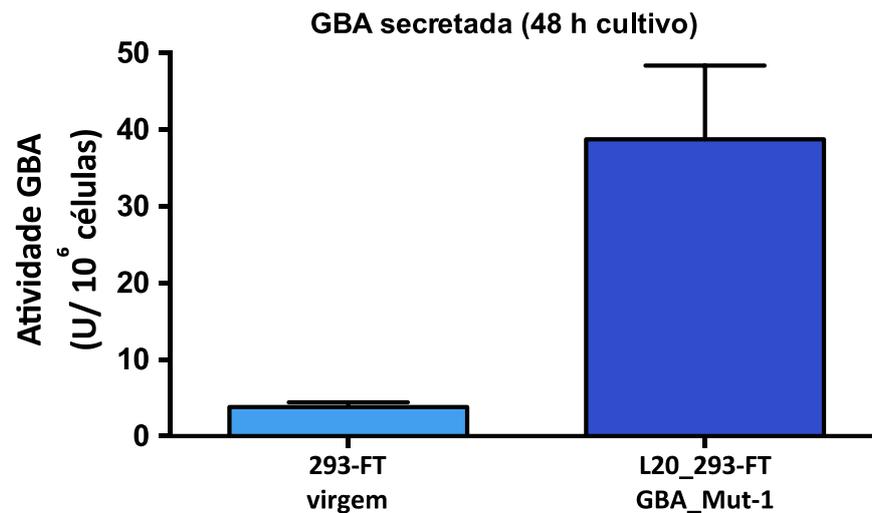


Figura 18. Produtividade da população celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 na ausência de SFB, após 48 h de cultivo estático em monocamada. O número de unidades de GBA biologicamente ativa foi determinado pelo ensaio fluorimétrico. A produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 é cerca de 10,14 vezes maior comparado com a linhagem celular virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,0049$).

O ensaio de produtividade é importante considerando que se pôde observar que o crescimento da célula virgem foi cerca de 1,29 vezes maior que a população celular com produção permanente de GBA_Mut-1 conforme mostra a tabela 6. Essa diferença é significativa ($p = 0,036$).

Tabela 6. Atividade biológica da molécula GBA_Mut-1 secretada pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 obtida após a modificação gênica utilizando o sistema lentiviral. Como controle foi avaliada a atividade biológica de GBA da célula virgem.

Culturas independentes	Número de células	Atividade Biológica (U/mL)	Produtividade (U/10 ⁶ células)
293-FT Controle (1)	1.550.000	5,229	5,06
293-FT Controle (2)	1.650.000	2,964	2,694
293-FT Controle (3)	1.700.000	3,093	2,729
293-FT Controle (4)	1.950.000	6,134	4,719
L20_293_FT_GBA_Mut-1 (1)	1.200.000	20,718	25,897
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (2)	1.150.000	37,624	49,074
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (3)	1.300.000	35,577	41,051
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (4)	1.650.000	42,849	38,953

Foi também avaliada a atividade enzimática específica da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 que foi da ordem de $231,8 \pm 51,62$ U/mg de proteína total (Figura 19). A atividade específica da linhagem celular virgem (293-FT) foi de $51,32 \pm 9,22$ U/mg de

proteína total (Figura 19). Observou-se portanto, que a atividade específica da enzima recombinante é cerca de 4,5 vezes comparada com a enzima produzida pela célula virgem. Essa diferença é significativa (t-test *two sample*, $p = 0,037$ com teste de *Welch* assumindo as variâncias desiguais).

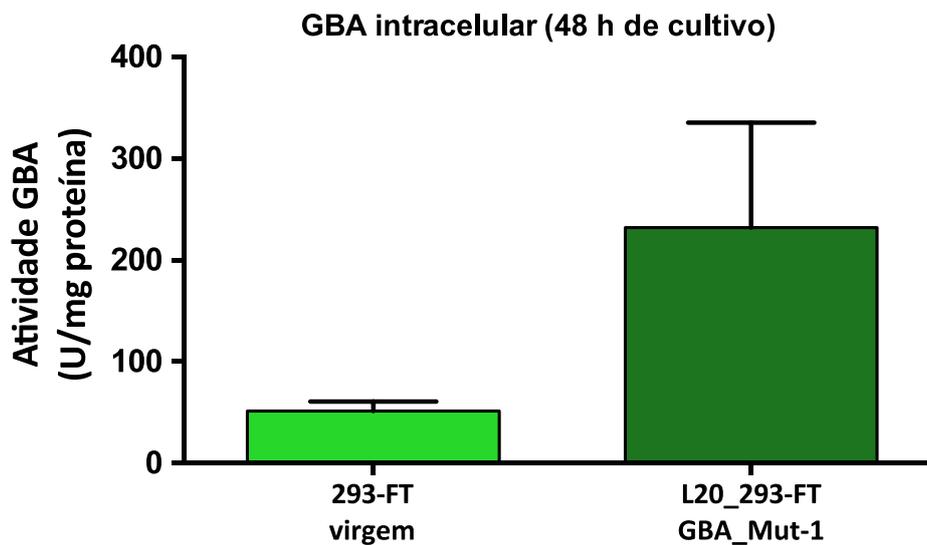


Figura 19. Atividade específica da enzima recombinante GBA produzida pela linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1. Foram utilizados 40-60 μg do extrato proteico total obtido após a coleta das células em cultura, seguida da lise celular por sonicação. A reação foi realizada a 37C por 2 horas utilizando o substrato sintético 4MUG. Os valores da atividade específica da enzima GBA lisossomal foram determinados pelo ensaio fluorimétrico e apresentam níveis 4,51 vezes maiores que a linhagem 293-FT virgem. Valores estatisticamente significativos ($p = 0,037$).

As medidas de atividade biológica de GBA intracelular foram determinadas pelo número de células presentes em cada cultura celular. Assim, antes da obtenção do extrato proteico total, as células foram lavadas em PBS, coletadas e quantificado o número total de células/cultura celular. A partir desses valores pôde-se obter a produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 em cultivo em monocamada por 48 h em meio com SFB. Conforme mostra a figura 20, os níveis de produção de GBA por essa linhagem celular foram $119,1 \pm 34,71$ U GBA/ 10^6 células, comparado com a célula virgem que mostrou níveis de produção de GBA intracelular da ordem de $25,62 \pm 6,55$ U GBA/ 10^6 células. Isso indica um aumento de produtividade de 4,64 vezes, porém estatisticamente os valores não foram significativos (t-test *two sample*, $p = 0,07$ com teste de *Welch* assumindo as variâncias desiguais).

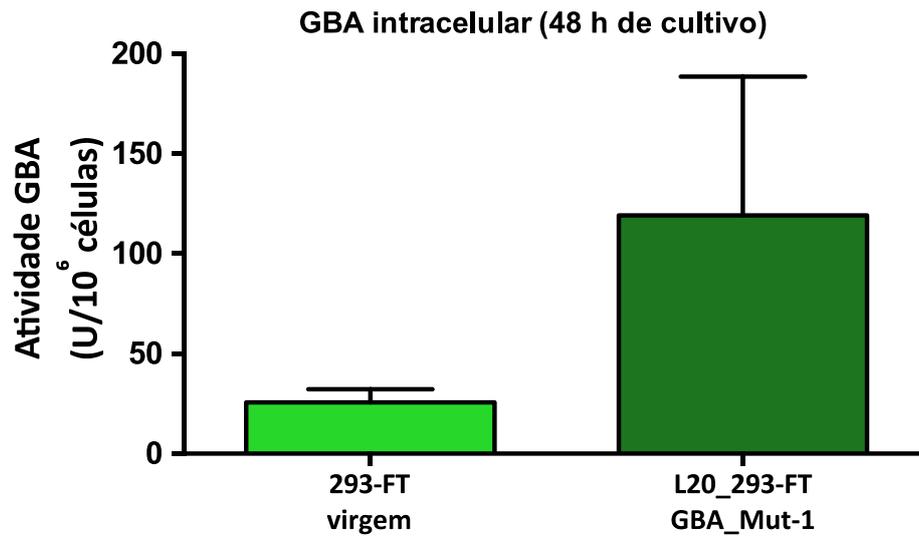


Figura 20. Produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem celular controle (293-FT virgem). O número de unidades de GBA biologicamente ativa foi determinado pelo ensaio fluorimétrico. A produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 é cerca de 4,64 vezes maior comparado com a linhagem celular virgem. Valores não significativos ($p = 0,07$).

O ensaio de produtividade é importante considerando que se pôde observar que o crescimento da célula virgem foi cerca de 1,63 vezes maior que a população celular com produção permanente de GBA_Mut-1 conforme mostra a tabela 7. Essa diferença é significativa ($p = 0,0083$).

Tabela 7. Atividade biológica da molécula GBA_Mut-1 produzida pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 obtida após a modificação gênica utilizando o sistema lentiviral. Como controle foi avaliada a atividade biológica de GBA da célula virgem.

Culturas independentes	Número de células	Atividade Específica (U/mg)	Produtividade (U/ 10 ⁶ células)
293-FT Controle 1	1.800.000	70,634	41,069
293-FT Controle 2	2.500.000	26,214	10,899
293-FT Controle 3	2.450.000	55,495	19,762
293-FT Controle 4	2.000.000	53,495	30,754
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (1)	1.600.000	296,413	163,259
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (2)	1.400.000	109,950	70,904
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (3)	1.300.000	335,834	192,377
L20_293-FT_GBA_Mut-1 (4)	2.050.000	185,154	49,730

A análise comparativa do nível da enzima lisossomal GBA recombinante secretada e intracelular/10⁶, na qual as células foram cultivadas por 48 h em monocamada, pode ser

observada na figura 21. Como controle, foi utilizada a linhagem celular 293-FT virgem. Essa análise mostra que o nível da enzima GBA intracelular é $119,1 \pm 34,71$ U GBA/ 10^6 células L20_293-FT_GBA_Mut-1, cerca de três vezes maior que da enzima GBA secretada no sobrenadante por essa mesma linhagem ($38,74 \pm 4,86$ / 10^6 células L20_293-FT_GBA_Mut-1). Na linhagem controle, o nível da enzima lisossomal GBA intracelular é $25,62 \pm 2,09$ / 10^6 células 293-FT, enquanto que o nível da enzima lisossomal GBA secretada é da ordem de $3,8 \pm 0,63$ / 10^6 células 293-FT.

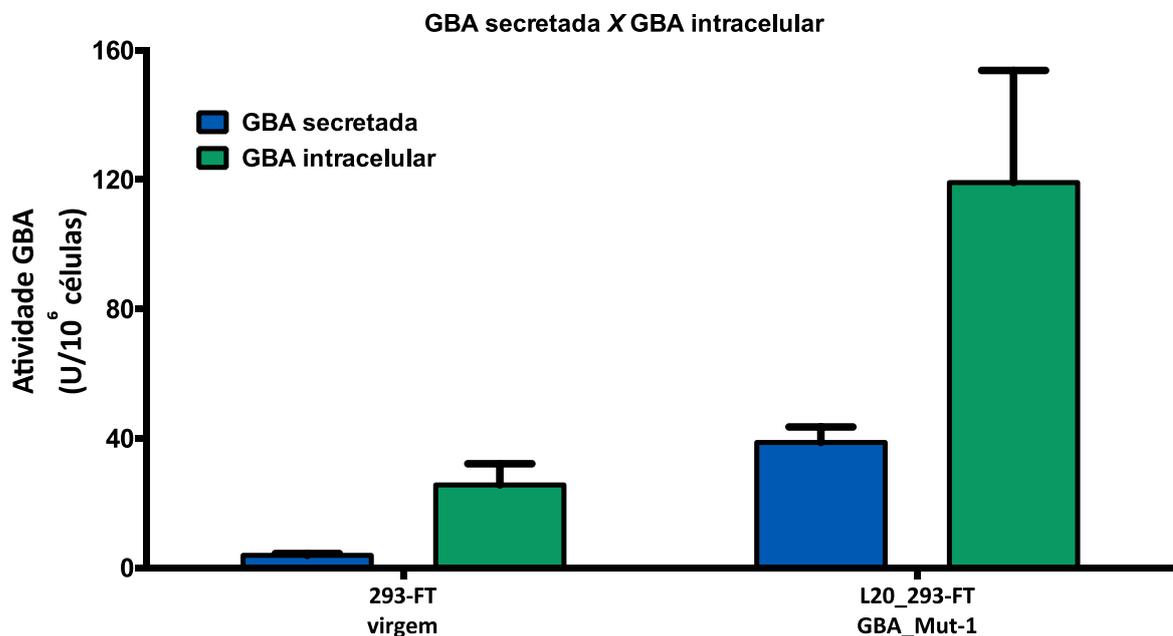


Figura 21. Análise comparativa do nível da enzima lisossomal GBA secretada e intracelular/ 10^6 células L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem controle após 48 h de cultivo estático em monocamada.

Por fim, para melhor avaliar o grau de relação entre as duas variáveis (GBA secretada x GBA intracelular) foi realizada a análise de correlação aplicando o teste de Spearman. A figura 22 mostra a ocorrência de correlação entre as duas variáveis com um valor estatístico significativo ($p = 0,0072$) e um coeficiente de associação de $rho = 0,88$. Esses dados sugerem que as amostras celulares que produzem maior quantidade de GBA intracelular secretam maior quantidade de GBA no sobrenadante. A análise mostra também uma maior variação dos níveis da enzima GBA secretada e intracelular na linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1 (símbolo +) comparada com a linhagem celular virgem (símbolo *).

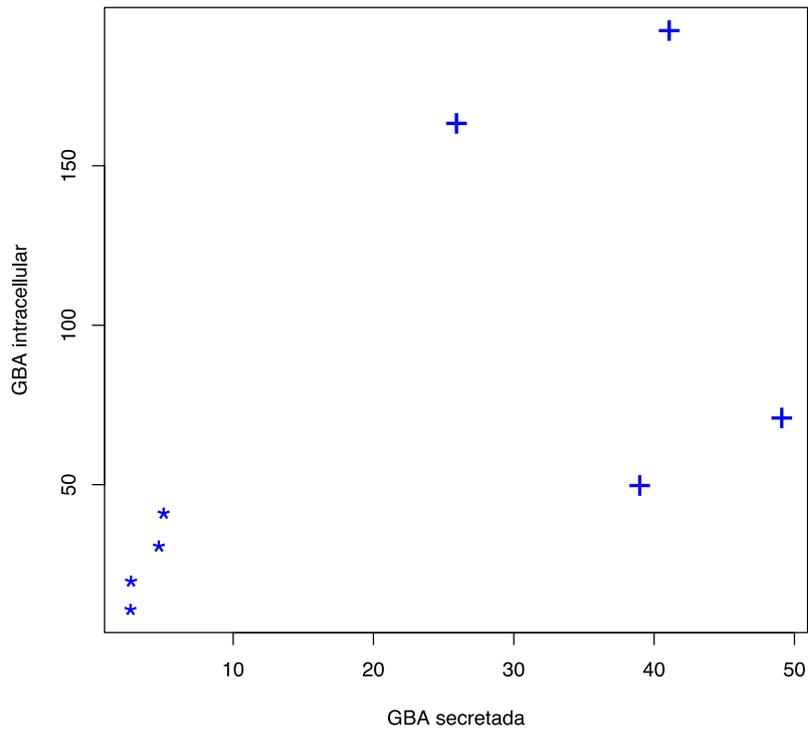


Figura 22. Associação entre o nível da enzima GBA secretada e o nível da enzima GBA intracelular produzida pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem controle após 48 h de cultivo estático em monocamada. O coeficiente de correlação de Spearman $\rho = 0,88$ e valor de $p = 0,0072$ indicando que existem fortes indícios que maiores níveis de GBA intracelular implicam em maiores níveis de GBA secretada no sobrenadante da cultura celular.

6. DISCUSSÃO

Geração de duas linhagens celulares com produção estável de GFP:

No presente trabalho foram desenvolvidas inicialmente, duas linhagens celulares humanas modificadas geneticamente com o gene repórter GFP por meio do sistema lentiviral, utilizando dois MOIs diferentes (1 e 10). Para isso, ambas linhagens celulares foram submetidas à análise por citometria de fluxo e realizada a comparação entre elas. A linhagem celular L22_293-FT_GFP_M1, transduzida com um único ciclo e MOI igual a 1 obteve cerca de 67% de células positivas e a linhagem celular L22_293-FT_GFP_M10, transduzida com 3 ciclos e MOI igual a 10, obteve cerca de 97,4% de células positivas para infecção com GFP. Foi observada uma diferença de cerca de 30% de células positivas para GFP entre elas, sugerindo que há uma correlação entre a quantidade de vírus inoculada nas células e a eficiência de modificação gênica das células.

No estudo de Picanço e colaboradores (2007) foi utilizado um vetor lentiviral portador do cDNA relativo ao fator VIII da coagulação e do cDNA relativo a GFP e a mesma linhagem celular (293-T) foi transduzida com um único ciclo e utilizando MOI de 5,0. Os autores demonstraram a presença de cerca de 55% de células positivas para GFP. Os autores observaram ainda que a eficiência de transdução está associada com o tipo celular em estudo. Por exemplo, utilizando as mesmas condições de transdução a porcentagem de células positivas para GFP variou entre 20 e 74% conforme o tipo celular (Picanço et al., 2007).

No presente estudo, a eficiência da transdução foi avaliada não conforme o tipo celular, mas em relação a carga viral. Foi observada uma porcentagem de 97,4% de células positivas para GFP utilizando um MOI igual a 10 demonstrando a variedade de parâmetros que podem influenciar a eficiência da transdução viral.

Geração de uma linhagem celular com produção estável da enzima lisossomal β -glicosilceramidase recombinante e mutante nomeada por GBA_Mut-1 sob controle do promotor HeF1 α :

Os dados obtidos das linhagens celulares com produção estável de GFP sugeriram que modificações gênicas em linhagens celulares humanas com maior carga viral, favoreceram a obtenção de populações transgênicas mais homogêneas. A partir de tais resultados uma linhagem celular humana com produção permanente de GBA por meio do sistema lentiviral foi produzida, utilizando um MOI igual a 15.

Desta forma, no presente trabalho foi gerada uma linhagem celular humana portadora do cDNA relativo à enzima glicosilceramidase com mutações *missense* (GBA_Mut-1), que

mostrou produção estável e apresentou níveis de secreção da proteína no sobrenadante da linhagem celular 293T-FT e também elevados níveis da proteína intracelular quando realizada análise comparativa com a linhagem controle 293-FT não transduzida. A análise da atividade biológica da enzima GBA secretada no sobrenadante celular mostrou que a linhagem controle obteve média de 4,35 U GBA/ mL de sobrenadante e uma produção de 3,8 U GBA/ 10⁶ células, enquanto que, a linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1, obteve uma atividade enzimática de 34,19 U/ mL de sobrenadante e uma produção de 3,74 U/ 10⁶ células. Tais resultados demonstram que a linhagem mutante gerada com o vetor lentiviral produziu 7,85 e 10,14 vezes mais do que a linhagem controle por mL de sobrenadante e por milhão de células, respectivamente. KIM e colaboradores (2004) utilizaram um MOI entre 10 e 50 para transdução das linhagens celulares humanas (HeLa, SH-SY5Y e HEK293) e também obtiveram no sobrenadante celular níveis mais elevados da enzima GBA secretada: Média igual a 189 U GBA/mL nas células transduzidas e uma média igual a 80 U GBA/mL nas linhagens controle, ou seja, no sobrenadante das células transduzidas com o vetor lentiviral foi observado uma secreção de 2,4 vezes mais GBA do que nas células controle. Entretanto, convém destacar que nesse trabalho o cálculo do título viral foi realizado por ELISA, com base na positividade para o antígeno p24 e foi avaliada a produção transiente, isto é, 5 dias após a transdução viral, o que pode explicar, em parte, as diferenças observadas. Em um trabalho anterior em nosso laboratório, demonstramos que, 48 h após a transfecção plasmidial portadora do cDNA relativo a GBA-Mut-1 foi possível obter uma linhagem celular humana com produção transiente da molécula Mut-GBA-1 e o nível da mesma secretada no sobrenadante foi 241 U GBA/mL sobrenadante (Gomes e Fontes, com. pessoal). Esses dados, sugerem que as diferenças de expressão entre o sistema de produção transiente e produção estável pode ser explicada por características intrínsecas do sistema uma vez que o nível de produção estável da proteína recombinante está diretamente associada ao protocolo de transdução viral e ao sítio de inserção do gene de interesse no genoma do hospedeiro, entre outros.

A atividade específica da enzima lisossomal GBA intracelular da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 obtida também foi avaliada e comparada com a linhagem controle 293-FT. Esta análise demonstrou que a linhagem controle 293-FT obteve média de 51,32 U GBA/ mg de proteína e de 25,62 U GBA/ mg de proteína por milhão de células, enquanto que a linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1, obteve uma atividade enzimática de 231,8 U GBA/ mg de proteína e por milhão de células de 119,1 U GBA/ mg de proteína, revelando que a

linhagem transduzida com o vetor lentiviral produziu 4,5 e 4,64 vezes mais do que a linhagem controle pelo número total de células e por milhão de células, respectivamente. KIM e colaboradores (2004) também mostraram uma atividade enzimática intracelular 2,1 vezes maiores nas linhagens transduzidas (média igual a 233 U GBA/mg de proteína) do que nas linhagens utilizadas como controle (média igual a 113 U GBA/mg de proteína).

Correlação entre os níveis da enzima lisossomal GBA secretada e intracelular:

A análise comparativa do nível da enzima GBA secretada e intracelular/ 10^6 células cultivadas por 48 h mostra que o nível de GBA intracelular é $119,1 \pm 34,71$ U GBA/ 10^6 células L20_293-FT_GBA_Mut-1 L, cerca de três vezes maior que da GBA secretada que é da ordem de $38,74 \pm 4,86$ / 10^6 células L20_293-FT_GBA_Mut-1. Já na linhagem controle, observamos uma diferença de 6,74 vezes entre os níveis de GBA, onde o nível de GBA intracelular é $25,62 \pm 2,09$ / 10^6 células, enquanto que o nível da GBA secretada é da ordem de $3,8 \pm 0,63$ / 10^6 células. Observando a análise de correlação (teste de Spearman), onde se obteve um coeficiente de associação de $\rho = 0,88$, e um valor p significativo igual a 0,0072, os dados sugerem que as linhagens celulares que produzem maior quantidade de GBA intracelular, também secretam maior quantidade da enzima no sobrenadante celular. Além disso, a análise mostra uma maior variação dos níveis de produção na linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1, quando comparada com a variação na linhagem controle. Esses dados podem ser explicados devido a linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1 ser uma população heterogênea, também denominada população celular mista, isto é, antes da clonagem celular. A ocorrência de subpopulações celulares heterogêneas antes da clonagem celular também pôde ser observada para as outras duas linhagens celulares geradas nesse estudo denominadas L22_293-FT_GFP_M1 e L22_293-FT_GFP_M10, em que foi possível identificar, por meio da citometria de fluxo, subpopulações celulares com diferentes níveis de expressão do gene GFP.

Tratamento com o agente seletivo puromicina

Uma etapa importante no processo da obtenção da linhagem celular mutante é a do tratamento com um agente seletivo para seleção apenas das células que apresentam o gene de interesse. No presente estudo, o vetor pLV_HeF1 α _Mut-_UbC_Puro contém o cDNA relativo ao gene que confere resistência a puromicina, e por isso esse antibiótico foi utilizado como agente de seleção na concentração igual a 2 μ g/mL. A dose foi selecionada com base em testes prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, em que diferentes concentrações foram utilizadas, 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μ g/mL, e foi observado que a dose IC₉₀ de sensibilidade

das células virgens é de 2 µg/mL. Outros sistemas de seleção já foram utilizados para a geração de uma linhagem celular com produção permanente da enzima lisossomal GBA recombinante. Por exemplo, no estudo de Novo e colaboradores (2012), os autores modificaram a linhagem celular CHO-DXB11 utilizando um vetor plasmidial portador do cDNA relativo a GBA e o gene marcador de seleção dihidrofolato redutase (DHFR) que confere resistência a metotrexato. Por meio desse sistema de seleção, os autores mostraram que a produtividade dos diferentes clones celulares variou de 1,84 a 3,22 pg GBA/célula CHO-DXB11_GBA⁺/dia (Novo et al., 2012).

Padronização e Título Viral:

São considerados pontos chaves do processo a adequação e padronização dos protocolos para a entrega do transgene, para a produção de vírus e para o sistema de transfecção e transdução utilizados (Naldini, 2011). A produção de vetores lentivirais para a produção de proteínas de interesse, consiste em etapas moleculares complexas, as quais devem ser bem planejadas e executadas, pois envolvem pontos críticos, detalhes que devem ser seguidos para que se tenha sucesso. Após a padronização dos procedimentos de biologia celular, molecular, transfecção e concentração viral para obtenção do vírus, os esforços foram voltados para a padronização da titulação das partículas obtidas. A padronização das técnicas utilizadas no presente estudo, em conjunto com a contribuição de outros pesquisadores e colaboradores, levou a elaboração de protocolos de transfecção para produção lentiviral, titulação viral e de geração de linhagem com produção permanente de enzimas de interesse do Laboratório de Doenças Metabólicas Hereditárias.

As titulações obtidas nesse estudo, foram realizadas por meio da citometria de fluxo e por q-PCR em tempo real. A titulação por q-PCR em tempo real é um dos métodos de mais alta precisão para se obter o título viral (Barczak et al., 2015). Pôde-se observar que foi possível a padronização por essa metodologia, como foi demonstrado pelas curvas de eficiência de amplificação, as quais apresentaram um R² igual a 0,99, *slope* de -3,227 e -3,293 e eficiência de amplificação de 104 e 101% para o gene LTR e gene endógeno β-actina respectivamente. Esses dados estão de acordo com as recomendações para o estabelecimento de uma quantificação por q-PCR (Nolan et., 2006). Ambos os valores dos títulos virais obtidos 7,9x10⁶ TU/mL e 4,3 x 10⁷ TU/mL para os genes GFP e o gene GBA_mut-1 respectivamente, estão de acordo com os valores típicos para lentivírus encontrado na literatura que vão de 10⁶ até 10⁷ TU/mL (Kurtner et al., 2009).

De forma sucinta, os vetores lentivirais produzidos no presente estudo, podem ser utilizados tanto em pesquisa básica, quanto para produção de proteínas de interesse terapêutico e também, em ensaios de terapia gênica por meio da expressão direcionada da variante gênica da GBA analisada nesse estudo. Trata-se de um sistema promissor para produção de um produto terapêutico, além disso, pode servir de modelo para estudos *in vitro* de outras moléculas recombinantes de interesse terapêutico e testes pré-clínicos, visando analisar aspectos como integração genômica, produção e atividade biológica da enzima de interesse *in vivo* e manifestações clínicas após o tratamento. Além disso, como a molécula apresenta potencial para produção em larga escala, pode refletir em custos menores para a sociedade brasileira.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O sistema lentiviral foi efetivo e permitiu a integração do gene heterólogo GFP no DNA genômico da célula hospedeira 293-FT gerando as linhagens celulares L22_293-FT_GFP_M1 e L22_293-FT_GFP_M10 transduzidas com MOIs de 1 e 10, respectivamente;
- ✓ Houve diferença do nível de expressão de GFP conforme o MOI utilizado. A linhagem celular L22_293-FT_GFP_M1 transduzida com MOI de 1 e um ciclo de transdução mostrou que 67% das células expressam GFP, enquanto que a linhagem celular L22_293-FT_GFP_M10 transduzida com MOI de 10 e três ciclos de transdução mostrou que 94% das células expressam GFP;
- ✓ O sistema lentiviral foi efetivo e permitiu a integração de um segundo gene heterólogo GBA_Mut-1 (β -glicosilceramidase_Mut-1) no DNA genômico da célula hospedeira 293-FT gerando a linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1;
- ✓ A linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 apresentou uma produção de $34,19 \pm 4,74$ U GBA/mL no sobrenadante da cultura, cerca de 7,85 vezes maior que a célula virgem (cerca de $4,35 \pm 0,78$ U GBA/mL) no cultivo por 48 h em monocamada sem SFB ($p < 0,05$);
- ✓ A atividade específica da enzima recombinante produzida pela linhagem celular da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 foi da ordem de $231,8 \pm 51,62$ U GBA/mg de proteína total cerca de 4,5 vezes maior que a célula virgem ($51,32 \pm 9,22$ U GBA/mg de proteína total) ($p < 0,05$);
- ✓ A produtividade da linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 quanto o nível da enzima lisossomal GBA secretada é $38,74 \pm 4,8$ U/ 10^6 células, cerca de 10,14 vezes maior da célula 293-FT virgem ($3,8 \pm 0,6$ U GBA/ 10^6 células) quando cultivadas por 48 h em monocamada em meio de cultura sem SFB. Essa diferença é significativa ($p < 0,05$).
- ✓ Porém, a produtividade da linhagem L20_293-FT_GBA_Mut-1 quanto o nível de GBA intracelular é $119,1 \pm 34,71$ U GBA/ 10^6 células, cerca de 4,64 vezes maior que os níveis da enzima lisossomal intracelular da célula virgem ($25,62 \pm 6,55$ U GBA/

10^6 células). Essa diferença não é significativa ($p > 0,05$), o que pode ser explicado pela modificação gênica com apenas um ciclo de transdução, utilizando MOI de 15.

- ✓ A análise da associação entre o nível da enzima lisossomal secretada e da enzima lisossomal intracelular produzida pela linhagem celular L20_293-FT_GBA_Mut-1 e linhagem controle após 48 h de cultivo estático em monocamada mostrou coeficiente de correlação de Spearman $\rho = 0,88$ e valor de $p = 0,0072$ indicando que existem fortes indícios que maiores níveis de GBA intracelular implicam em maiores níveis de GBA secretada no sobrenadante da cultura celular
- ✓ As linhagens celulares geradas L22_293-FT_GFP_M1, L22_293-FT_GFP_M10 e L20_293-FT_GBA_Mut-1 podem ser consideradas como potencialmente adequadas para futuros estudos que visam realizar a clonagem celular das respectivas populações celulares, caracterizar a enzima recombinante por espectrometria de massa e investigar características específicas do sistema para o aumento da produção das respectivas proteínas recombinantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFLAKI, E.; BORGER, D.K.; MOAVEN, N.; STUBBLEFIELD, B.K.; ROGERS, S.A.; PATNAIK, S.; SCHOENEN, F.J.; WESTBROEK, W.; ZHENG, W.; SULLIVAN, P.; FUJIWARA, H.; SIDHU, R.; KHALIQ, Z.M.; LOPEZ, G.J.; GOLDSTEIN, D.S.; ORY, D.S.; MARUGAN, J.; SIDRANSKY, E. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α -Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. **The Journal of Neuroscience**, v.28, n.36, p.7441–7452, 2016.
- AGHION, E. La maladie de Gaucher dans l'enfance. **Thèse, Faculté de Médecine**. Paris, France. 1934.
- ANDERSON, W. A case of angiokeratoma. **Brazilian Journal of Dermatology**, v.10, p.113, 1898.
- APPELMANS, F.; WATTIAUX, R.; DE DUVE, C. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. **Biochemistry Journal**, v.59, p.438-445, 1955.
- BALICKI, D.; BEUTLER, E. Gaucher disease. **Medicine (Baltimore)**, v.74, p.305-323, 1995.
- BANK, A.; DORAZIO, R.; LÉBOULCH, P. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia. **Annals of New York Academic Science**, v.1054, p.308-316, 2005.
- BARNEVELD, R.A.; KEIJZER, W.; TEGELAERS, F.P.; GINNS, E.I.; GEURTS VAN KESSEL, A.; BRADY, R.O.; BARRANGER, J.A.; TAGER, J.M.; GALJAARD, H.; WESTERVELD, A.; REUSER A.J. Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21–q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. **Human Genetics**. v.64, p.227–231, 1983.
- BEADLE, G.W.; EPHRUSSI, B. The Differentiation of Eye Pigments in *Drosophila* as Studied by Transplantation. **Genetics**. v.21, p.225-247, 1936.
- BEADLE, G.W.; TATUM, E.L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**. v.27. p.499–506, 1941.
- BARCZAK, W.; SUCHORSKA, W.; RUBIS, B.; KULCENTY, K.; Universal Real-Time PCR-Based Assay for Lentiviral Titration. **Molecular Biotechnology**, v.57, p.195-200, 2015.
- BENITO, J.M.; FERNANDEZ, J.M.G.; MELLET, C.O. Pharmacological chaperone therapy for Gaucher disease: a patent review. **Expert Opinion**. v.21, p.885-903, 2011.
- BEUTLER, E. Gaucher disease. **Blood Reviews**, Edinburgh. v.2, n.1, p.59-70, 1988.
- BLAESE, R.M.; CULVER, K.W.; MILLER, A.D.; CARTER, C.S.; FLEISHER, T.; CLERICI, M.; SHEARER, G.; CHANG, L.; CHIANG, Y.; TOLSTOSHEV, P.; GREENBLATT, J.J.; ROSENBERG, S.A.; KLEIN, H.; BERGER, M.; MULLEN, C.A.; RAMSEY, W.J.; MUUL, L.; MORGAN, R.A.; ANDERSON, W.F. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. **Science**. v.270, p.475-480, 1995.
- BRADY, R.O., KANFER, J.N., SHAPIRO, D. Metabolism of glucocerebrosides. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.18, p.221–225, 1965.
- BRADY, R.O. The Sphingolipidoses. **The New England Journal of Medicine**. v.275, p.312-318, 1966.

BURROW, T.A.; GRABOWSKI, G.A. Velaglucerase alfa in the treatment of Gaucher disease type 1. **National Institute of Health Public Access**. v.1, p. 285-293. 2011.

BUTTERS, T.D.; DWEK, R.A.; PLATT, F.M. Therapeutic applications of imino sugars in lysosomal storage disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.3, p.561–574, 2003.

CAMELO JR, J.S. Da Triagem Neonatal Expandida à era pós-genômica. **Sociedade de Pediatria de São Paulo**. 2017.

CASELLA, E.B.; KIM, C.A.; ALBANO, L.M.J.; BERTOLA, D.R. Capítulo 29: Erros Inatos do Metabolismo. **Imunogenética na Prática Pediátrica**, p.473-502, 2010.

CAVAZZANA-CALVO, M.; HACEIN-BEY, S.; DE SAINT BASILE, G.; GROSS, F.; YVON, E.; NUSBAUM, P.; SELZ, F.; HUE, C.; CERTAIN, S.; CASANOVA, J.L.; BOUSSO, P.; DEIST, F.L.; FISCHER, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. **Science**. v.288, p.669-672, 2000.

CHARROW, J.; ANDERSSON, H.C.; KAPLAN, P.; KOLODNY, E.H.; MISTRY, P.; PASTORES, G.; ROSENBLUM, B.E.; SCOTT, C.R.; WAPPNER, R.S.; WEINREB, N.J.; ZIMRAN, A. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. **Archives of Internal Medicine**, v.160, p.2835-2843, 2000.

CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Conitec**. 2014.

COX, T.M.; AMATO, D.; HOLLAK, C.E.; LUZY, C.; SILKEY, M.; GIORGINO, R.; STEINER, R.D. Miglustat Maintenance Study. Evaluation of miglustat as maintenance therapy after enzyme therapy in adults with stable type 1 Gaucher disease: a prospective, open-label non-inferiority study. **Orphanet Journal of Rare Disease**, v.7, p.102, 2012.

DANIEL, P.F., HEARTLEIN M.W. High mannose proteins and methods of making high mannose proteins. **US7138262B1**. 2011.

DVIR, H.; HAREL, M.; MCCARTHY, A.A.; TOKER, L.; SILMAN, I.; FUTERMAN, A.H.; SUSSMAN, J.L. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. **EMBO Reports, Oxford**. v. 4, n. 7, p.704-709, 2003.

ERICKSON, A. H.; GINNS, E. I.; BARRANGER, J. A. Biosynthesis of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore. v. 260, n. 26, p. 14319-14324, 1985.

FABRY, J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). **Archives of Dermatological Research**, v.43, p.187, 1898.

FANTACINI, D.M.C.; FONTES, A.M.; DE ABREU NETO, M.S.; COVAS, D.T.; PICANÇO-CASTRO, V. The F309S mutation increases factor VIII secretion in human cell line. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.38, p.135-140, 2016.

FERNANDES, A.C., FONTES, A.M.; ROSA, N.G.; SWIECH, K.; PICANÇO-CASTRO, V.; FAÇA, S.; COVAS, D.T. Stable and high-level production of recombinant Factor IX in human hepatic cell line. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v.58, p.243-249, 2011.

- FÖLLING, A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität". **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie.** v.227, p.169-181, 1934.
- FONTES, A.M.; DAVIS, B.M.; ENCELL, L.P.; LINGAS, K.; COVAS, D.T.; ZAGO, M.A.; LOEB, L.A.; PEGG, A.E.; GERSON, S.L. Differential competitive resistance to methylating versus chloroethylating agents among five O6-alkylguanine DNA alkyltransferases in human hematopoietic cells. **Molecular Cancer Therapy**, v. 5, p.121-128, 2006.
- FONTES, A.M.; MELO, F.U.; GREENE, L.J.; FACA, V.M.; LIN, Y.; GERSON, S.L.; COVAS, D.T. Production of human factor VIII-FL in 293T cells using the bicistronic MGMT(P140K)-retroviral vector. **Genetics Molecular Research**, v.11, p.775-789, 2012.
- GARROD, A. E. The Incidence of Alkaptonuria: A Study in Chemical Individuality. **Lancet.** v.2, p. 1616-1620, 1902
- GARROD, A. E. Inborn errors of metabolism. **Frowde, Lodon (Reprint 1963 Oxford University Press, London).** 1923.
- GAUCHER, P.C.E. De l'épithélioma primitif de la rate. **MD Thèse.** Faculté de Médecine de Paris. 1882.
- GECHELE, E.; MERLIN, M.; BROZZETTI, A.; FALOMI, A.; PEZZOTTI, M.; AVESANI, L. A comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect cells and Plant Systems. **Journal of Visualized Experiments.** v.97, e52459, 2015.
- GIACCA, M. Gene Therapy. Chapter 3 - **Methods for Gene Delivery**, p.47-137, 2010.
- GOOZNER, M. The \$800 Million Pill: The Truth behind the Cost of New Drugs. **University of California Press.** Cap. 2, p. 39-60, 2004.
- GUYE, P., Y. LI, L. WROBLEWSKA, X. DUPORTET, AND R. WEISS. Rapid, modular and reliable construction of complex mammalian gene circuits. **Nucleic Acids Res.** 41:e156, 2013.
- HALDANE, J.B.S. The Biochemistry of Genetics. **London**, 1954.
- HILL, C.W.L.; SCHILLING, M.A.; JONES, G.R. Strategic Management: Theory and Cases: Na Integrated Approach. Case 24 – **Genzyme's Focus On Orphan Drugs.** Ed. 12. p. 195-200, 2015.
- HIRTH, B.H.; SIEGEL, C. Synthesis of UDP-glucose: N-acylsphingosine glucosyltransferase inhibitors. **US6855830 B2.** 2002.
- HOROWITZ, M.; WILDER, S; HOROWITZ, Z. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. **Genomics.** v.4, p.87-96, 1989.
- HRUSKA, K.; LAMARCA, M.E.; SCOTT, R.; SIDRANSKY, E. Gaucher Disease: Mutation and Polymorphism Spectrum in the Glucocerebrosidase Gene (GBA). **Human Mutation.** v.29, p. 567-583, 2008.
- HUNTER, C. A Rare Disease in Two Brothers. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v.10, p.104-116, 1917.
- HURLER, G. Ueber einen Typ multiplier Abartungen Vorwiegend am Skelettsystem. **Z Kinderheilk.** v.24, p. 220, 1919.

IMREN, S.; FABRY, M.E.; WESTERMAN, K.A.; PAWLIUK, R.; TANG, P.; ROSTEN, P.M.; NAGEL, R.L.; LEBOULCH, P. EAVES, C.J.; HUMPHRIES, R.K. High-level beta-globin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, p.953-962, 2004.

KIM, E. Y.; HONG, Y. Bin; LAI, Z.; KIM, H. J.; CHO, Y. H.; BRADY, R. O.; JUNG, S. C. Expression and secretion of human glucocerebrosidase mediated by recombinant lentivirus vectors in vitro and in vivo: Implications for gene therapy of Gaucher disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318, n. 2, p. 381–390, 2004.

KIM, S.; KIM, G.J.; MIYOSHI, H.; MOON, S.H.; AHN, S.E.; LEE, J.H.; LEE, H.J. Efficiency of the Elongation Factor-1 α Promoter in Mammalian Embryonic Stem Cells Using Lentiviral Gene Delivery Systems. **Stem Cells and Development**, v.16, p. 537-545, 2007.

KUHN, A. Grundriss der Veterinärlehre. **Quelle and Meyer, Heidelberg**. 1961.

KUTNER, R. H.; ZHANG, X. Y.; REISER, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. **Nature Protocols**, v. 4, n. 4, p. 495–505, 2009.

LALONDE, M.E.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, Elsevier, v.251, p.128-140, 2017.

LI, Y.; SCOTT, C.R.; CHAMOLES, N.A.; GHAVAMI, A.; PINTO, B.M.; TURECEK, F.; GELB, M.H. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. **Clinical Chemistry**, v.50, p.1785-1796, 2004.

LIEB, H. Cerebroside Speicherung bei Splenomegalie (typus Gaucher). **Zeitschrift für Physiologische Chemie**. v.140, p.305–313, 1924.

LISTED], N.A. Gaucher disease. Current issues in diagnosis and treatment. NIH Technology Assessment Panel on Gaucher Disease. **JAMA**. v.275, p.548-553, 1996.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Readings**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: <http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf>.

MAEGAWA, G.H.; TROPAK, M.B.; BUTTNER, J.D.; RIGAT, B.A, FULLER, M.; PANDIT, D. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. **Journal Biology Chemistry**. v.284, p. 23502-16, 2009.

MARSHALL, J.; SUN, Y.; BANGARI, D.S.; BUDMAN, E.; PARK, H.; NIETUPSKI, J.B.; ALLAIRE, A.; CROMWELL, M.A.; WANG, B.; GRABOWSKI, G.A.; LEONARD, J.P.; CHENG, S.H. CNS – accessible Inhibitor of Glucosylceramide Synthase for Substrate Reduction Therapy of Neuronopathic Gaucher Disease. **Molecular Therapy**. v.24, n.6, p. 1019-1029, 2016.

MERTEN, O.W.; HEBBEN, M.; BOVOLENTA,C. Production of lentiviral vectors. Review article. **Nature – Molecular Therapy**. 2016.

MIGDALSKA-RICHARDS, A.; SCHAPIRA, A.H. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. **Journal of Neurochemistry**, v.1, p.77-90, 2016.

MILLER, D.G.; ADAM, M.A.; MILLER, A.D. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. **Molecular Cellular Biology**. v.10, p.4239-4242, 1990.

MONTINI, E.; CESANA, D.; SCHMIDT, M.; SANVITO, F.; BARTHOLOMAE, C.C.; RANZANI, M.; BENEDICENTI, F.; SERGI, L.S.; AMBROSI, A.; PONZONI, M.; DOGLIONI, C.; DI SERIO, C.; VON KALLE, C.; NALDINI, L. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. **Journal of Clinical Investigation**, v.119, p.964-975, 2009.

MULLER, K.B.; RODRIGUES, M.D.; PEREIRA, V.G.; MARTINS, A.M.; D'ALMEIDA, V. Reference values for lysosomal enzymes activities using dried blood spots samples - a Brazilian experience. **Diagnostic Pathology**, v.5, p.65, 2010.

NALDINI, L.; BLOMER, U.; GAGE, F. H.; TRONO, D.; VERMA, I. M. 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 of the USA**, v.93, p.11382–11388, 1996.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F.H.; VERMA, I.M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science**, v.272, p.263-267, 1996.

NARITA, A.; SHIRAI, K.; ITAMURA, S.; MATSUDA, A.; ISHIHARA, A.; MATSUSHITA, K.; FUKUDA, C.; KUBOTA, N.; TAKAYAMA, R.; SHIGEMATSU, H.; HAYASHI, A.; KUMADA, T.; YUGE, K.; WATANABE, Y.; KOSUGI, S.; NISHIDA, H.; KIMURA, Y.; ENDO, Y.; HIGAKI, K.; NANBA, E.; NISHIMURA, Y.; TAMASAKI, A.; TOGAWA, M.; SAITO, Y.; MAEGAKI, Y.; OHNO, K.; SUZUKI, Y. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v.3, p.200-215, 2016.

NEGRE, O.; EGGIMANN, A.V.; BEUZARD, Y.; RIBEIL, J.A.; BOURGET, P.; BORWORNPIYO, S.; HONGENG, S; HACEIN-BEY, S.; CAVAZZANA, M.; LEBOULCH, P.; PAYEN, E. Gene Therapy of the beta-Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the beta(A(T87Q))-Globin Gene. **Human Gene Therapy**, v.27, p.148-165, 2016.

NIEMANN, A. Ein unbekanntes Krankheitsbild. **Jahrb Kinderheilkd**, v.79, p.1, 1914.

NOLAN, T., HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols.*, v.1,p.409-414,2006.

NOVO, J. B.; MORGANTI, L.; MORO, A. M.; PAES LEME, A. F.; SERRANO, S. M. DE T.; RAW, I.; HO, P. L. Generation of a Chinese Hamster Ovary Cell Line Producing Recombinant Human Glucocerebrosidase. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 875383, 2012

OOI, A.; WONG, A.; ESAU, L.; LEMTIRI-CHLIEH, F.; GEHRING, C. A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization. **Frontiers in Physiology**, v.7, p.300, 2016.

O'REGAN, G.; DESOUZA, D.M.; BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A.H. Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease. **Journal of Parkinsons Disease**, v.7, p.411-422, 2017.

PALADE, G.E. A small particulate component of the cytoplasm. **Journal of Biophysics Biochemistry and Cytology**, v.1, p.59-68, 1955.

PARENTI, G.; ANDRIA, G.; VALENZANO, K.J. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. **Molecular Therapy**. 2015.

PAWLIUK, R.; WESTERMAN, K.A.; FABRY, M.E.; PAYEN, E.; TIGHE, R.; BOUHASSIRA, E.E.; ACHARYA, S.A.; ELLIS, J.; LONDON, I.M.; EAVES, C.J.; HUMPHRIES, R.K.; BEUZARD, Y.; NAGEL, R.L.; LEBOULCH, P. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. **Science**, v.294, p.2368-2371, 2001.

PAYEN, E.; COLOMB, C.; NEGRE, O.; CAVAZZANA-CALVO, M.; BEY-ABINA, S.H.; BEUZARD, Y.; LEBOULCH, P. Chapter 10: Gene Therapy of the Beta-Hemoglobinopathies, **inn Advanced Textbook on Gene Transfer, Gene Therapy and Genetic Pharmacology by D. Scherman**, p.361-389, 2014.

PENTCHEV, P.G.; BRADY, R.O.; HIBBERT, S.R.; GAL, A.E.; SHAPIRO, D. Isolation and Characterization of Glucocerebrosidase from Human Placental Tissue. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.5230-5261, 1973.

PERKINS, A.S.; KIRSCHMEIER, P.T.; GATTONI-CELLI, S.; WEINSTEIN, I.B. Design of a retrovirus-derived vector for expression and transduction of exogenous genes in mammalian cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, p.1123-1132, 1983.

PETERS, S.P.; COYLE, P.; GLEW, R.H. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 175, p.569-582, 1976.

PICANCO, V., S. HEINZ, D. BOTT, M. BEHRMANN, D.T. COVAS, E. SEIFRIED, AND T. TONN. Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. **Cytotherapy** 9:785-794, 2007.

PICANCO-CASTRO, V.; FONTES, A.M.; HEINZ, S.; TONN, T.; COVAS, D.T. The chimeric cytokine Hyper-IL-6 enhances the efficiency of lentiviral gene transfer in hepatocytes both in vitro and in vivo. **Biotechnology Letter**, v.30, p.215-220, 2008.

PICANÇO-CASTRO, V.; FONTES, A.M.; RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S.; COVAS, D.T. Lentiviral-mediated gene transfer – a patent review. **Expert Opinion on Therapy Patents**, v.18, p.525-539, 2008.

PICK, L. Über die lipoidzellige Splenohepatomegalie typus Niemann-Pick als Stoffwechselekrankung. **Med. Klin.** v.23, p.1483, 1927.

PLATT, F.M.; NEISES, G.R.; DWEK, R.A.; BUTTERS, T.D. N-butyldeoxynojirimycin a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.8362-65, 1994.

POESCHLA, E.; CORBEAU, P.; WONG-STAAAL, F. Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. **Proceedings of the National Academic of Science**, v.93, p.11395-11399, 1996.

POMPE, J.C. Hypertrophie idiopathique du Coeur. **Annals of Anatomy and Pathology**, v.10, p.23, 1933.

RASMUSSEN, J.; BARSOMIAN, G.; BERGH, M. Enzymatically Active Recombinant Glucocerebrosidase. **WO/1990/007573**. 1990.

RCSB PROTEIN DATABANK. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>.

RODRIGUES, E.S.; PICANCO-CASTRO, V.; ESPANHOL, M.R.; DE ANDRADE, L.A.; PALMA, P.V.; KASHIMA, S.; FONTES, A.M.; COVAS, D.T. Quantitative correlation between transcriptional

levels of ER chaperone, peroximal protein and FVIII productivity in human Hek-293 cell line. **Springerplus**. v.2, p.328, 2013.

ROSENBERG, S.A.; AEBERSOLD, P.; CORNETTA, K.; KASID, A.; MORGAN, R.A.; MOEN, R.; KARSON, E.M.; LOTZE, M.T.; YANG, J.C.; M.D., TOPALIAN, S.L.; MERINO, M.J.; CULVER, K.; MILLER, A.D.; BLAESE, R.M.; ANDERSON, W.F. Gene transfer into humans immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **New England Journal of Medicine**, v.323, p.570-578, 1990.

ROSENBERG, S.A.; PACKARD, B.S.; AEBERSOLD, P.M.; SOLOMON, D.; TOPALIAN, S.L.; TOY, S.T.; SIMON, P.; LOTZE, M.T.; YANG, J.C.; SEIPP, C.A.; SIMPSON, C.; CARTER, C.; BOCK, S.; SCHWARTZENTRUBER, D.; WEI, J.P.; WHITE, D.E. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p.1676-1680, 1988.

SACHS, B. On arrested cerebral development with special reference to its pathology. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v.14, p.541, 1887.

SARTORE-BIANCHI, A.; AMATU, A.; BONAZZINA, E.; STABILE, S.; GIANNETTA, L.; CERE, G.; SCHIAVETTO, I.; BENCARDINO, K.; FUNAIOLI, C.; RICOTTA, R.; CIPANI, T.; SCHIRRU, M.; GAMBI, V.; PALMERI, L.; CARLO-STELLA, G.; RUSCONI, F.; DI BELLA, S.; BURRAFATO, G.; CASSINGENA, A.; VALTORTA, E.; LAURICELLA, C.; PAZZI, F.; GAMBARO, A.; GHEZZI, S.; MARRAPESE, G.; TARENZI, E.; VERONESE, S.; TRUINI, M.; VANZULLI, A.; SIENA, S. Pooled Analysis of Clinical Outcome of Patients with Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer Treated within Phase I/II Clinical Studies Based on Individual Biomarkers of Susceptibility: A Single-Institution Experience. **Target Oncology**, v.12, p.525-533, 2017.

SAUDUBRAY, J.M.; OGIER, H.; BONNEFONT, J.P.; MUNNICH, A.; LOMBES, A.; HERVÉ, F.; MITCHEL, G.; POLL THÉ, B.; SPECOLA, N.; PARVY, P.; BARDET, J.; RABIER, D.; COUDÉ, M.; CHARPENTIER, C.; FRÉZAL, J. Clinical approach to inherited metabolic diseases in the neonatal period: a 20-year survey. **Studies in Inherited Metabolic Disease**, v.1, p.25-41, 1989.

SHAALTIEL, Y., D. BARTFELD, S. HASHMUELI, G. BAUM, E. BRILL-ALMON, G. GALILI, O. DYM, S.A. BOLDIN-ADAMSKY, I. SILMAN, J.L. SUSSMAN, A.H. FUTERMAN, AND D. AVIEZER. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. **Plant Biotechnol J**. 5:579-590, 2007.

SLOAN, A.E.; FUNG, H.; REESE, J.; ROGERS, L.R.; MURPHY, C.; LAZRUS, H.; DROPULIC, B.; GERSON, S.L. 141 Phase I Trial of Genetically Modified Hematopoietic Progenitor Cells Facilitate Bone Marrow Chemoprotection and Enabling TMZ/O6BG Dose Escalation Resulting in Improved Survival. **Neurosurgery**. 63 Suppl v.1, p.157, 2016.

SOBREIRA, E.; PIRES, R.F.; CIZMARIK, M.; GRABOWSKI, G.A. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world. **Molecular Genetics and Metabolism**. v.90, p.81-86, 2007.

SORGE, J., WEST, C., WESTWOOD, B., BEUTLER, E. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.82, p.7289-7293, 1985.

STIRNEMANN, J.; BELMATOUG, N.; CAMOU, F.; SERRATRICE, C.; FROISSART, R.; CAILLAUD, C.; LEVADE, T.; ASTUDILLO, L.; SERRATRICE, J.; BRASSIER, A.; ROSE, C.; BILLETTE DE VILLEMEUR, T.; BERGER, M.G.; A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, p.18, 2017.

TAY, W. Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant. *Trans Ophthalmol Soc UK*, v.1, p.1155, 1881.

TSUJI, S.; CHOUDARY, P.V.; MARTIN, B.M.; WINFIELD, S.; BARRANGER, J.A.; GINNS, E. I. Nucleotide Sequence of cDNA Containing the Complete Coding Sequence for Human Lysosomal Glucocerebrosidase. *Journal of Biological Chemistry*. v.261, p.50-53, 1985.

TURNPENNY, P.; ELLARD, S. Emery's Elements of Medical Genetics. Chapter 11: **Biochemical Genetics**, p.167-184, 2012.

VANNUCCI, L.; LAI, M.; CHIUPPESI, F.; CECCHERINI-NELLI, L.; PISTELLO, M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiology*, v.36, p.1-22, 2013.

VUNNAM, R.R.; RADIN, N.S. Analogs of ceramide that inhibit glucocerebrosidase synthetase in mouse brain. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.26, p.265-278, 1980.

WANG, H.; RICHTER, M.; PSATHA, N.; LI, C.; KIM, J.; LIU, J.; EHRHARDT, A.; NILSSON, S.K.; CAO, B.; PALMER, D.; NG, P.; IZSVAK, Z.; HAWORTH, K.G.; KIEM, H.P.; PAPAYANNOPOULOU, T.; LIEBER, A. A Combined In Vivo HSC Transduction/Selection Approach Results in Efficient and Stable Gene Expression in Peripheral Blood Cells in Mice. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, v.8, p.52-64, 2018.

WHITFIELD, P.D.; NELSON, P.; SHARP, P.C.; BINDLOSS, C.A.; DEAN, C.; RAVENSCROFT, E.M.; FONG, B.A.; FIETZ, M.J.; HOPWOOD, J.J.; MEIKLE, P.J. Correlation among genotype, phenotype, and biochemical markers in Gaucher disease: implications for the prediction of disease severity. *Molecular Genetics and Metabolism*, v.75, p.46-55, 2002.

ANEXO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezada Dr^a Marcia Guimarães Villanova,

Eu, Jéssica Luana Souza Cardoso, pesquisadora responsável pelo estudo "Geração de uma linhagem celular com produção permanente da enzima lisossomal β -glucocerebrosidase recombinante por meio do sistema lentiviral", solicito a dispensa da apresentação do TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido para esse projeto, tendo em vista que o mesmo utilizará leucócitos obtidos por meio de coleta de sangue, apenas como valor de referência no método fluorimétrico, na análise da atividade biológica de proteínas. Logo, eu mesma me prontifiquei para a coleta de sangue, não sendo necessária, portanto, a coleta de pacientes ou de outros indivíduos. Assim, os leucócitos a serem utilizados serão obtidos da própria pesquisadora responsável, e serão utilizados apenas como valores de referência na metodologia. Assim acredito que não seja necessário a solicitação do TCLE. Somente para esclarecimento adicional, a proteína que será analisada no presente projeto, foi obtida por meio de cultivo da linhagem celular comercial 293-FT (Invitrogen). Assim, assumo a total responsabilidade pelas informações apresentadas.



Jéssica Luana Souza Cardoso

Jéssica Luana Souza Cardoso
Mestranda em Genética
Departamento de Genética
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto,

15 de março de 2018

Não há necessidade de submissão ao
Comitê de Ética em Pesquisa:

Marcia Guimarães Villanova

Dr^a Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/UNESP-RP

19/03/2018