

**Ana Rúbia Alcantara Peloso**

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA PARA PRODUÇÃO DE VETORES VIRAIS AMPLICONS DERIVADOS DO HSV-1 VIA RECOMBINAÇÃO GÊNICA SÍTIO-ESPECÍFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez

Coorientadoras: Dra. Lídia Maria R. B. Arantes

Dra. Viviane Aline O. Silva

Barretos, SP

2022

**Ana Rúbia Alcantara Peloso**

**AVALIAÇÃO DE SISTEMA PARA PRODUÇÃO DE VETORES VIRAIS AMPLICONS DERIVADOS DO HSV-1 VIA RECOMBINAÇÃO GÊNICA SÍTIO-ESPECÍFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez

Coorientadoras: Dra. Lídia Maria R. B. Arantes

Dra. Viviane Aline O. Silva

Barretos, SP

2022

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio do Hospital de Câncer de Barretos através de Bolsa de Mestrado (EDITAL N.03/2020-IEP/HCB).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do Hospital de Câncer de Barretos.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

*Dedico este trabalho ao meu **Pai**, que sempre esteve ao meu lado me dando forças, me inspirando e me apoiando.*

## Agradecimentos

**Ao Prof. Dr. Matias**, que desde o começo confiou no meu trabalho, esteve ao meu lado como orientador e amigo, me ajudando, ensinando e principalmente orientando, ou desorientando? Brincadeiras à parte... Por todas as mensagens sempre respondidas mesmo aos finais de semanas, e não poderia deixar de mencionar meus sinceros obrigada, por acreditar em mim e continuar comigo em uma nova jornada agora no doutorado. Obrigada por ter vindo de Curitiba até Barretos para me mostrar uma placa de lise. Obrigada por todos os conselhos profissionais. Espero poder escrever outros agradecimentos com você em primeiro lugar, papito. Obrigada por tudo, nos vemos na Cidade Maravilhosa!

**À Profa. Dra. Lidia** Arantes ou Rebolho? Brincadeiras à parte. Muito obrigada por tudo Lídia, por estar ao meu lado em journal ou seminário, por toda conversa na sua sala e por todo o apoio. Obrigada por me acolher e por todo esforço para me ajudar, mesmo tendo pegado o “bonde andando”, nos acompanhou perfeitamente. Você é uma pesquisadora e uma mulher incrível! Obrigada pela co-orientação! Jaja chega o formulário para ser co novamente.

**À Profa. Dra Viviane Aline Saito**, muito obrigada por todas as reuniões, todas as mensagens que mesmo ocasionais, sempre me proporcionavam calma e confiança, obrigada por sua gentileza. Obrigada pela co-orientação!

**Ao meu pai...** Principalmente a ele, que sempre esteve ao meu lado, sempre entendeu minha ausência e sempre me apoiou. Que me incentiva em todas as minhas escolhas e nunca me deixou desamparada. Obrigada pai, que mesmo com toda a distância, sempre esteve presente. Agradeço imensamente esse homem incrível que eu tenho o prazer de ter na minha vida e poder chamar de Pai. Que sorte a minha hein, Pellosinho?

**Aos amigos** que fiz durante esse período em Barretos, como Bruna Sorroche (Brubru), Laura (Laulinha...), Patrik Vital, Katiane Totes, Nathalia Rodrigues, Renan Teixeira, Lucas Perina, Tauana Dias... Que sempre estiveram comigo, seja tomando um cafezinho as 6AM ou um copo de cerveja as 6PM. Por todas as conversas, todos os conselhos e todos os momentos que foram incríveis. Minha eterna gratidão de ter conhecido vocês. Espero poder vê-los em breve.

**Ao grupo de pesquisa da Prof. Dra. Edenir**, por todos os reagentes “emprestados” e toda a ajuda em diversos protocolos.

**À minha banca de acompanhamento, Profa. Dra. Leticia Ferro Leal e ao Prof. Dr. Bryan Eric Strauss**, por todo conhecimento, todas as correções e críticas que foram preciosas para a finalização desta dissertação.

**Ao Prof Dr. Marcelo Alves Soares**, por aceitar ser assessor externo na banca da defesa desta dissertação.

**À todas as biólogistas do Hospital de Amor** por toda ajuda nos experimentos e todo o apoio.

**Ao Hospital de Amor** por toda a ajuda financeira e estrutura.

*“If I die here frozen and alone...  
Tell them I did it for science”*

**Hermit, Riot.**

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Terapia gênica</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Vetores virais para terapia gênica</b>	<b>2</b>
1.2.1 Vetores derivados de Adenovírus	3
1.2.2 Vetores derivados de Retrovírus	4
1.2.3 Vetores derivados da Herpes simplex tipo 1	4
<b>1.2.3.1 Herpes simplex humana do tipo 1</b>	<b>5</b>
1.2.3.2 Organização do genoma da HSV-1	6
1.2.3.3 Modo de replicação do DNA viral da HSV-1	7
<b>1.3 HSV-1 como vetor viral</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1 Vetores amplicons</b>	<b>8</b>
1.3.1.1 Sistemas atuais de produção de amplicons	9
1.3.1.2 Vetores amplicons para terapia gênica	13
<b>1.4 Recombinação sítio específica</b>	<b>13</b>
<b>1.4.1 Recombinação Cre/lox</b>	<b>13</b>
<b>1.4.2 Recombinação Flpe/FRT</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Genes modificados do HSV-1 neste projeto</b>	<b>14</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>18</b>

<b>4.1</b>	<b>Linhagens celulares</b>	18
<b>4.2</b>	<b>Vetores utilizados neste projeto</b>	18
4.2.1	Plasmídeo pGK.FRT mCherry	18
<b>4.2.2</b>	<b>Plasmídeo pBS246.OPNE</b>	19
<b>4.2.3</b>	<b>Plasmídeo pBS.185</b>	20
4.2.4	Plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP	21
4.2.5	Plasmídeo pCAGGS-flpE-puro	22
<b>4.2.6</b>	<b>Vírus L.OPNE.L.ΔJ</b>	23
<b>4.3</b>	<b>Prova de conceito da transgenia</b>	24
<b>4.3.1</b>	<b>Recuperação de partículas viral</b>	26
<b>4.3.2</b>	<b>Titulação viral</b>	26
4.4	Sequenciamento Sanger das regiões FRT na presença de Flipase	27
4.4	Avaliação funcional da recombinação sítio específica mediada por Flpe	31
<b>4.5</b>	<b>Produção de partículas mini-amplicons</b>	31
4.5.1	Recombinação mediada por Cre	33
4.5.2	Análise por microscopia de fluorescência	33
<b>5. RESULTADOS</b>		34
<b>5.1.</b>	<b>Produção e amplificação viral</b>	34
<b>5.1.1</b>	<b>Quantificação viral</b>	36
5.1.3	Prova de conceito de vírus defectivo	36
<b>5.2</b>	<b>Prova de conceito de clonagem de gene de interesse por recombinação sítio específica Flpe/FRT</b>	37
5.2.1	Análise das regiões FRT a partir do sequenciamento de Sanger	38
<b>5.3</b>	<b>Prova de conceito de transgenia</b>	40
<b>5.4</b>	<b>Produção de vetor amplicon</b>	41

<b>5.4.1</b>	<b>Transdução de vetor amplicon em linhagem celular</b>	<b>43</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Titulação de vetor amplicon e vírus helper</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Estrutura do vírus Herpes simplex virus tipo 1	5
<b>Figura 2 –</b>	Organização do genoma do vírus Herpes simplex virus tipo 1	6
<b>Figura 3 –</b>	Representação dos sistemas existentes para produção de vetor viral tipo amplicon	11
<b>Figura 4 –</b>	Construção e funcionamento do sistema de produção de vetores virais amplicon utilizando o vírus auxiliar L.OPNE.L.ΔJ.	12
<b>Figura 5 –</b>	Sistema de recombinação sítio específica Cre/lox	13
<b>Figura 6 –</b>	Sistema de recombinação sítio específica Flpe/FRT	14
<b>Figura 7 –</b>	Estrutura do plasmídeo pGK.FRT mCherry	19
<b>Figura 8 –</b>	Estrutura do plasmídeo pBS246.OPNE	20
<b>Figura 9 –</b>	Estrutura do plasmídeo pBS.185	21
<b>Figura 10</b>	Estrutura do plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP	22
<b>Figura 11 –</b>	Estrutura do plasmídeo pCAGGS-flpE-puro	23
<b>Figura 12 –</b>	Estrutura do vírus L.OPNE.L.ΔJ	24
<b>Figura 13 –</b>	Mecanismo de inserção de transgenes no genoma do vírus L.OPNE.L.ΔJ	25
<b>Figura 14 –</b>	Diluição para titulação viral de L.OPNE.L.ΔJ	27

<b>Figura 15 –</b>	Esquema de amplificação do plasmídeo pGK.FRT mCherry na presença de flipase com primer 1 e 2	29
<b>Figura 16 –</b>	Esquema de amplificação do plasmídeo pBS246.OPNE na presença de flipase com primer 3 e 4	30
<b>Figura 17 –</b>	Mecanismo de recombinação sítio específica com o plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP	31
<b>Figura 18 –</b>	Mecanismo de produção de vetores virais mini-amplicon	32
<b>Figura 19 –</b>	Evolução do processo de infecção do vírus L.OPNE.L.ΔJ em células 7b	35
<b>Figura 20 –</b>	Exemplo de esquema de titulação viral, 96 horas pós-infecção	36
<b>Figura 21 –</b>	Ensaio de análise de replicação defectiva do vírus L.OPNE.L.ΔJ na linhagem Vero e 7b	37
<b>Figura 22 –</b>	Co-transfecção com plasmídeo pCAGGS-flpE-puro e pCMV:DsRed(FRT)GFP em célula Vero	38
<b>Figura 23 –</b>	Sequenciamento com os primers 1 e 2 no plasmídeo pGK.FRT mCherry na presença de flipase	39
<b>Figura 24 –</b>	Sequenciamento com os primers 3 e 4 no plasmídeo pBS246.OPNE na presença de flipase	40
<b>Figura 25 –</b>	Placa de lise mCherry positiva do vírus L.OPCE.L.ΔJ.	41
<b>Figura 26 –</b>	Análise qualitativa em microscópio de fluorescência de vetor amplicon em 7b transfectada (10x)	42

<b>Figura 27 –</b>	Análise qualitativa em microscópio de fluorescência da produção de vetor amplicon em 7b transfectada (40x)	42
<b>Figura 28 –</b>	Análise qualitativa em microscópio de fluorescência da transdução de vetor amplicon em linhagem Vero	43
<b>Figura 29 –</b>	Análise qualitativa em microscópio de fluorescência da transdução de vetor amplicon na linhagem A172	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Características gerais de vetores virais derivados de Retrovírus, Herpesvírus e Adenovírus	3
<b>Tabela 2 -</b>	Linhagens celulares utilizadas	18
<b>Tabela 3 -</b>	Primers para sequenciamento das regiões FRT	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

AmpR	Resistência a ampicilina
BAC	Cromossomo artificial bacteriano
bp	Pares de base
CCL	Linhagem de célula comercial
Cre	Cre recombinase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Cedo
Flpe	Flipase
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
GFP	Proteína verde fluorescente
gH	Glicoproteína H
gI	Glicoproteína I
gL	Glicoproteína L
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV-1	Herpes-simples tipo 1
ICP27	Polipeptídio de infecção 27
ICP4	Polipeptídio de infecção 4
ICP47	Polipeptídio de infecção 47
IE	Cedo imediato

Kbp	Mil pares de base
kDa	Kilodalton
L	Tardio
LoxP	Sítio loxP
MOI	Multiplicidade de infecção
Neor	Resistência a neomicina
oriL	Origem de replicação longa
oriS	Origem de replicação curta
Pac	Sinal de empacotamento
Pfu	Unidade formadora de placa
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
sDNA	Ácido desoxirribonucleico com fita dupla
TK	Timina kinase
UL	Única longa
UL30	Única longa 30
UL42	Única longa 42
US	Única curta
VP19C	Proteína do capsídeo 19C
VP23	Proteína do capsídeo 23
VP26	Proteína do capsídeo 26

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$^{\circ}C$	Graus celsius
$\Delta$	Delta
$\gamma$ -	Gama
-	Menos
%	Porcentagem

## RESUMO

Pelloso, ARA. *Avaliação de sistema para produção de vetores virais amplicons derivados do HSV-1 via recombinação gênica sítio-específica*. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos, 2022.

**JUSTIFICATIVA:** Os vetores virais defectivos de tipo amplicon, derivados do vírus HSV-1, são altamente versáteis, podendo transduzir até 150 kbp em células eucariotas humanas e de diferentes mamíferos. Os sistemas atuais para produção de vetores virais do tipo amplicon possuem limitações que impedem o uso de amplicons em protocolos de terapia gênica. A principal limitação dos sistemas atuais de produção de vetores amplicons é a existência de contaminação por partículas virais *helper* e a presença de DNA de origem bacteriana no genoma do vetor amplicon, proveniente do plasmídeo amplicon. **OBJETIVO:** Avaliar um sistema de produção de vetores amplicons baseado em recombinação Cre/lox e Flpe/FRT sítio-específica. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi utilizado um módulo amplicon floxeado, contendo as sequências pac e oriS, um transgene (com sequências FRT adjacentes) e um gene repórter EGFP, clonado no locus do gene UL44 (entre o seu promotor e a fase codificante) de um genoma HSV-1 defectivo ( $\Delta$ ICP4). A produção de vetores foi realizada em célula transcomplementar expressando o gene ICP4, transfectada com plasmídeo de expressão da recombinase Cre. A inserção do transgene de interesse foi realizada através de recombinação mediada por flipase utilizando os sítios FRT adjacentes e um plasmídeo codificante da proteína fluorescente mCherry flanqueada por sítios FRT. **RESULTADOS:** Comprovamos que o vírus recombinante manteve sua característica de segurança de replicação defectiva, conseguindo apenas se replicar em células ICP4<sup>+</sup>. Além disso, embora em baixo título de  $2 \times 10^3$  TU/mL, na presença da recombinase Cre, o sistema produz vetores amplicons. Finalmente, o sistema também foi capaz de receber um transgene de interesse por recombinação sítio-específica flpe/FRT. **CONCLUSÃO:** O vírus recombinante L.OPCE.L. $\Delta$ J foi capaz de aceitar o transgene clonado por recombinação flpe/FRT e de produzir vetores amplicons através de recombinação Cre/lox.

**PALAVRAS-CHAVE:** Vetor viral; Herpes simplex vírus tipo 1; HSV-1; Amplicon; Terapia gênica; Cre-Lox; Flpe/FRT.

## ABSTRACT

Pelloso, ARA. *Evaluation of a system to produce viral vectors amplicons delivered from HSV-1 with site-specific genetic recombination*. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2022.

**BACKGROUND:** Defective amplicon viral vectors, derived from the HSV-1 virus, are highly versatile platforms, being able to transduce up to 150 kbp in human and in different mammalian cells. Current systems for amplicon vector production have limitations that prevent its use in gene therapy protocols. The main limitations being the existence of contamination by helper viral particles and the presence of bacterial origin sequences in the genome of the amplicon vector, belonging to the amplicon plasmid. **AIM:** To evaluate an amplicon vector production system based on site-specific Cre/lox and flpe/FRT recombination. **MATERIALS AND METHODS:** A floxed amplicon module was used, containing the pac (packaging sequence) and oriS (origin of replication) sequences, a transgene (with adjacent FRT sequences) and an EGFP reporter gene, cloned at the UL44 gene locus (between its promoter and its open reading frame) of a defective HSV-1 genome ( $\Delta$ ICP4). The production of vectors was carried out in a transcomplementary cell expressing the ICP4 gene, transfected with a Cre recombinase expression plasmid. Insertion of the transgene of interest was performed by f19lipase-mediated recombination using adjacent FRT sites and a plasmid encoding the fluorescent protein mCherry flanked by two parallel FRT sites. **RESULTS:** We proved that the recombinant virus maintains its safety feature of defective replication, being able to replicate only in ICP4<sup>+</sup> cells. Furthermore, although at a low titer of  $2 \times 10^3$  TU/mL, in the presence of the Cre recombinase, the system produces amplicon. Finally, the system was also able to receive a transgene of interest by flpe/FRT site-specific recombination. **CONCLUSIONS:** The recombinant virus L.OPCE.L. $\Delta$ J was able to accept the cloned transgene by Flpe/FRT recombination and to produce amplicon vectors through Cre/lox recombination.

**KEYWORDS:** Viral vector; Herpes Simples 1; HSV-1; Amplicon; Gene therapy; Cre-Lox; Flpe

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Terapia gênica

O termo terapia gênica compreende procedimentos de transferência gênica que visam alterar ou adicionar genes para corrigir uma patologia através de alterações moleculares<sup>1</sup>. Esta alteração pode ocorrer visando a substituição ou inativação de um gene causador de uma patologia por um gene saudável, a partir da introdução de um gene modificado ou não para ajudar no tratamento de uma doença<sup>2</sup>. Há diversos tipos de metodologia de transferência, utilizando vetores virais e não virais. Os vetores não virais são originados de plasmídeos e/ou nanopartículas e apresentam como vantagens a injeção local, administração repetida e baixa concentração na sua aplicação<sup>3</sup>. Os vetores virais são produzidos através de modificações *in vitro* de um vírus, podendo ser derivados de Adenovírus, Retrovírus ou Herpes vírus<sup>4</sup> e apresentam como vantagens uma maior capacidade de carregar genes de interesse, maior capacidade de transdução e tropismos específicos<sup>1</sup>.

Técnicas de manipulações gênicas são conhecidas e utilizadas desde 1928<sup>5</sup> quando Frederick Griffith descreveu a transformação de uma bactéria não infecciosa a um tipo infeccioso<sup>6</sup>. Após inúmeros estudos, Lederberg e colaboradores, descobriram um tipo de bactéria que poderia transferir seu material genético por compatibilidade, o que descreve a técnica que conhecemos nos dias de hoje como conjugação bacteriana<sup>6</sup>. Uma década após descobrirem que era possível a transferência gênica de uma bactéria para outra<sup>6</sup>, Tatum e colaboradores<sup>7</sup>, publicaram um estudo que apontava a eficácia dos vírus também em técnicas de transferência gênica em células somáticas, onde ficou claro a necessidade de retirar os genes de virulência e substituí-los por gene terapêutico. Posteriormente, Rogers e colaboradores demonstram uma prova de conceito inicial para transferência gênica utilizando vetor viral modificado<sup>8</sup>. Porém, somente em dezembro de 1988 o *Recombinant DNA Advisory Comitê (RAC)* aprovou um estudo clínico com genes transduzidos através de vetor viral em seres humanos. Neste primeiro estudo clínico, Rosenberg e colaboradores, extraíram os linfócitos infiltrantes tumorais de pacientes com melanoma metastático e realizaram a transferência de genes, através de vetor derivado de retrovírus<sup>9</sup> para introduzir um marcador para estas células antes de devolver ao paciente e assim demonstraram que o tratamento com interleucina-2 e linfócitos infiltrantes de tumor levam a regressão de melanoma em alguns pacientes<sup>10</sup>. Após o tratamento, quando os locais de aplicação foram ressecados

cirurgicamente, não houve evidência de células tumorais em pacientes com até 3 semanas de aplicação. Muitos dos estudos iniciais não apresentaram os resultados esperados, porém só crescia o interesse por pesquisa de transferência gênica nesta época.

Atualmente estudos na oncologia são predominantes e abrangem cerca de 60% dos ensaios clínicos de terapia gênica em andamento no mundo, seguido de doenças monogênicas e cardiovasculares<sup>11</sup>. Em 2003, pesquisadores Chineses conseguiram a primeira aprovação de um medicamento para uso clínico, o *Gendicine*, no qual é utilizado um vetor derivado de adenovírus e o gene *E1* é substituído pelo gene *TP53* humano<sup>6</sup>. Este medicamento foi aprovado para o tratamento de células de câncer de cabeça e pescoço. Posteriormente, em 2005 outro medicamento chinês foi aprovado, denominado de *Oncorine*, o fármaco é derivado de adenovírus replicativos e é utilizado em combinação com quimioterapia em tratamento de câncer de nasofaringe avançado<sup>10</sup>.

Desde então faz-se a necessidade de continuar os estudos para uso da terapia gênica no desenvolvimento de novas técnicas para manipular vetores virais e sua administração segura e eficiente.

## **1.2. Vetores virais para terapia gênica**

Os vetores virais são produzidos a partir de um vírus de RNA ou DNA que utilizam a maquinaria celular para expressar seus genes e produzir sua progênie<sup>12</sup>. Para um vetor viral ser adequado para sua utilização ele deve apresentar baixa toxicidade, estabilidade, atingir as células alvo de maneira eficiente, ser de fácil produção em larga escala e ter baixo custo de produção<sup>13</sup>. Cada vetor apresenta vantagens e limitações (**Tabela 1**) próprias e sua utilização depende especificamente do objetivo que pretende ser alcançado na terapia.

**Tabela 1. Características gerais de vetores virais derivados de Retrovírus, Herpesvírus e Adenovírus.**

Vírus	Material genético	Vantagens	Limitações
Retrovírus	RNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integra-se ao genoma da célula hospedeira;</li> <li>• Expressão gênica estável;</li> <li>• Fácil manipulação;</li> <li>• Baixa resposta imune.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamanho do inserto limitado a 8 kb;</li> <li>• Transduz somente células em replicação;</li> <li>• Alto risco de mutagênese insercional.</li> </ul>
Herpesvírus	dsDNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande capacidade de transgenia (150 Kb);</li> <li>• Forte tropismo por neurônios.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reação inflamatória;</li> <li>• Difícil manipulação;</li> <li>• Possibilidade de toxicidade residual.</li> </ul>
Adenovírus	dsDNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transduz células proliferativas e não proliferativas;</li> <li>• Alta eficiência de transdução <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i>;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forte resposta imune;</li> <li>• Tamanho de inserto limitado a 8 Kb;</li> <li>• Não integra ao genoma da célula alvo;</li> <li>• Expressão gênica pouco estável.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Vannucci et al, 2012<sup>14</sup>

### 1.2.1. Vetores derivados de Adenovírus

Adenovírus são vírus não envelopados, com formato icosaédrico, alto tropismo pelo epitélio das vias aéreas, dupla fita de DNA e apresentam capacidade de infectar seres vertebrados, humanos ou não<sup>15</sup>. Descoberto em 1953, este vírus começou a ser utilizado em pesquisas em 1980<sup>16</sup>, sendo o material genético dos adenovírus o pioneiro em técnicas de replicação viral *in vitro*<sup>17</sup>.

O vetor viral derivado de Adenovírus não se integra ao genoma da célula alvo, não sendo replicado durante a divisão celular, gerando uma limitação na utilização em pesquisa básica.

O vírus selvagem sempre esteve em contato com os seres humanos e seu contato leva a sintomas respiratórios aos quais não apresentam riscos graves quando o paciente não apresenta comorbidade<sup>17</sup>. Devido a isto os humanos normalmente já apresentam anticorpos

neutralizantes para a família dos Adenovírus, prejudicando uma terapia gênica que utilize esse vetor, pois estes anticorpos neutralizam este vetor antes que ele atinja a célula-alvo. Por este motivo, há estudos recentes que utilizam adenovírus derivados de animais como transportadores de genes terapêuticos, como por exemplo, a vacina desenvolvida pela Oxford AstraZeneca COVID, onde se utiliza um adenovírus de chimpanzé<sup>18</sup>.

### **1.2.2. Vetores derivados de Retrovírus**

Os retrovírus compreendem uma classe viral com RNA que utiliza a transcriptase reversa para produzir DNA que pode ser incorporado ao genoma do hospedeiro. Dentro desta classe, há dois gêneros predominantes para a produção de vetores: os gammaretrovírus e os lentivírus<sup>19</sup>. A principal diferença entre eles é a capacidade dos lentivírus de infectar células quiescentes ou em divisão, enquanto os gammaretrovírus somente infectam células em divisão<sup>1</sup>.

O tratamento para glioblastoma utilizando vetores retrovirais, foi o primeiro ensaio clínico aprovado para câncer. Neste tratamento, os vetores derivados de retrovírus somente conseguem transduzir células em divisão e tumorais. Esses vetores entregam o gene da timina quinase do vírus herpes simplex tipo 1 (HSTk), para as células alvo, tornando o gene responsável pelo bloqueio da síntese de DNA, ocasionando a morte celular<sup>20</sup>. Outra terapia utilizando vetor retroviral é o tratamento de deficiência de ADA. Esta doença é ocasionada pelo acúmulo de desoxiadenosina que é convertida em uma substancia toxica para as células T. E na terapia, é reintroduzido no paciente suas células T corrigidas e com reposição enzimática<sup>21</sup>.

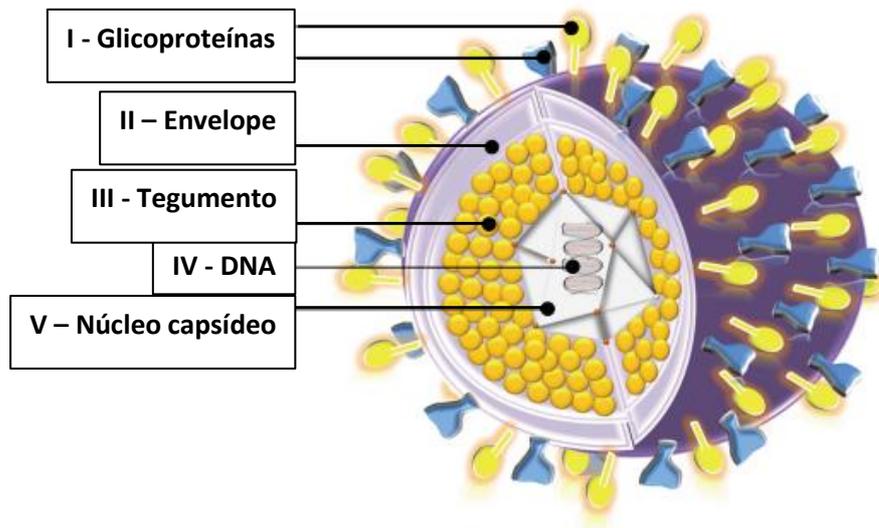
### **1.2.3. Vetores derivados da Herpes simplex tipo 1**

Os vetores derivados da Herpes simplex tipo 1 possuem uma grande quantidade de células hospedeiras, devido a presença de receptores celulares presentes em vários tipos celulares, possui capacidade de se replicar em células em divisão ou quiescentes<sup>22</sup>. Além disso, o HSV-1 infecta eficientemente células de diferentes mamíferos, permitindo ensaios pré-clínicos *in vivo*. Este vírus é altamente infeccioso e possui uma grande capacidade de

transgene, permitindo entregar múltiplos ou grandes transgenes (aproximadamente 40% dos seus genes não são essenciais para a replicação em cultura, podendo ser eliminados e substituídos por genes exógenos de interesse).<sup>23-25</sup>

### 1.2.3.1 Herpes simplex humana do tipo 1

O vírus herpes simplex humano de tipo 1 (HSV-1) pertence à família da Herpesviridae; subfamília: Alphaherpesvirinidae; gênero: Simplexvirus<sup>26</sup>. Os membros da família Herpesviridae apresentam sua classificação organizada pela forma do vírion formado por uma fita linear dupla de DNA (sDNA), capsídeo icosaédrico, tegumento amorfo e um envelope, onde estão situadas as glicoproteínas da sua superfície<sup>27</sup> (**Figura 1**).



**Fonte:** Adaptado de Elbadawy *et al*<sup>28</sup>.

Figura 1. Estrutura do Herpes-Vírus tipo 1. Representação esquemática da estrutura do vírion do vírus HSV-1.

- I. As glicoproteínas apresentam tamanhos, espessura e espaçamento variável, entre elas, estão as que realizam a adesão viral (gB, gC, gD, gE e gI), proteínas de fusão (gB, gH e gL), proteínas de função estruturais e evasão imune (gC, gE e gI)<sup>29</sup>.
- II. Envelope constituído por camada lipídica trilaminar de lipídeos, proteínas e glicoproteínas, que envolve a camada proteica do tegumento<sup>30</sup>.

- III. Proteínas virais chamadas de tegumento de estrutura fibrilar. Existem no mínimo 20 proteínas virais identificadas no tegumento que apresentam diferentes funções, como um grupo de proteínas que participam na montagem da partícula viral, proteínas que participam no transporte do capsídeo durante a entrada e saída através de microtúbulos da célula alvo, as que regulam as respostas virais e que participam da regulação da expressão das respostas precoces imediatas<sup>32-33</sup>
- IV. Dupla fita de DNA linear apresentando cerca de 152.261 bp<sup>27</sup>.
- V. Um capsídeo icosaédrico que envolve o genoma do vírus, composto por quatro proteínas: VP5, VP26, VP23 e VP19C<sup>31</sup>.

### 1.2.3.2. Organização do genoma do HSV-1

O genoma do HSV-1 compreende um vírion esférico, envelopado com aproximadamente 152 Kbp, com repetições genéticas divididas em região única longa (*UL*) e única curta (*US*), com 126 e 26 Kbp, respectivamente (**Figura 2**). As *UL* e *US* são seguidas por sequências repetidas, chamadas de *b'a'*, *ac*, *c'a'* (ou Terminal Repetida longa, Interna Repetida Longa, Interna Repetida Pequena e Terminal Repetida Pequena)<sup>34</sup>.



**Fonte:** Benegas, 2017 (Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Genética) - Hospital de Câncer de Barretos, São Paulo.)

Figura 2. Organização do genoma do HSV-1. Representação do genoma do vírus HS-1: segmento único longo (*UL*), segmento único curto (*US*), cada um limitado por sequências de repetições invertidas (*c*, *a*, *b*, *b'*, *a'*, *c'*).

O genoma do HSV-1 compreende duas sequências não codificantes que são essenciais para a replicação viral: as origens de replicação do DNA viral (*oriL* e *oriS*) e os sinais de clivagem/empacotamento (localizados nas sequências “a”)<sup>30</sup>. O HSV-1 comporta três origens de replicação, onde duas estão localizadas no interior do segmento curto único (*oriS*) e uma no segmento longo único (*oriL*)<sup>35</sup>.

A maioria dos genes do HSV-1 não contêm introns, com exceção dos genes ICP0, ICP22, ICP47, UL15 e LAT. O genoma do HSV-1 codifica cerca de 84 polipeptídios e se dividem em essenciais e não essenciais para o crescimento viral em células em cultura<sup>30</sup>. Cerca de 47 polipeptídios são considerados não essenciais para o crescimento viral em cultura celular, podendo assim ser substituídos por genes exógenos permitindo o desenvolvimento de vetores baseados neste vírus para terapia genica<sup>4</sup>.

### 1.2.3.3. Modo de replicação do DNA viral da HSV-1

A replicação viral se inicia na adsorção da célula hospedeira por regiões que contêm grande quantidade de glicosaminoglicanos de heparan sulfato, que se localizam na célula alvo, com as glicoproteínas virais do envelope gB e gC<sup>36</sup>.

O ciclo pode ser dividido em três fases sequenciais, a primeira é chamada de fase  $\alpha$  (*Immediate early*), a segunda é a fase  $\beta$  (*early*) e a última fase  $\gamma$  (*Late*)<sup>37</sup>.

- I. Fase  $\alpha$ : consiste na formação do complexo de pré-iniciação viral, ocorre quando há ligação da proteína do tegumento viral,  $\alpha$ -TIF, ao TATA Box no genoma viral. Então inicia-se a produção das proteínas  $\alpha$  como ICP4, ICP27 e ICP47, encarregadas na regulação positiva das próximas fases. Esta fase compreende as codificações de proteínas responsáveis pela regulação gênica da próxima etapa de transcrição (expressão dos genes  $\beta$ )<sup>38</sup>.
- II. Fase  $\beta$ : síntese de enzimas que possibilitam a replicação do material genético, como TK, UL30 e UL42. Em aproximadamente 5-7 horas após a infecção é possível observar o pico da síntese dessas proteínas. Ao finalizar esta fase  $\beta$ , ocorre o início da expressão dos genes responsáveis pela síntese das proteínas estruturais do HSV-1. (genes da fase  $\gamma$ )<sup>37</sup>.
- III. Fase  $\gamma$ : produção de proteínas de função estrutural, com isto ocorre a armação do vírion e a montagem da partícula viral. As proteínas produzidas nesta fase serão as responsáveis pela formação e a montagem do capsídeo. A princípio, um pré capsídeo é montado por estas proteínas, contendo uma armação interna. Esta armação interna é perdida quando há a inserção do material genético viral e

posteriormente o vírus é encaminhado para a membrana celular, onde será envelopado<sup>36</sup>. Este processo completo de replicação tem média de 18-20 horas<sup>39</sup>.

### 1.3. HSV-1 como vetor viral

O HSV-1 apresenta genes que podem ser substituídos pois não são essenciais para crescimento em cultura, fazendo com que haja um interesse particular no seu uso em terapias gênicas. Esses genes não essenciais podem ser deletados, criando um espaço de 30 a 150 Kbp para a inserção de genes de interesse terapêutico dependendo de qual vetor será utilizado<sup>40</sup>.

Atualmente existem três tipos distintos de vetores derivados do vírus HSV-1<sup>12</sup>:

- I. Vetores atenuados replicativos: possuem a capacidade de se replicarem em células específicas e são utilizados na sua maioria em terapia gênica oncolítica. Nesses vetores, os genes que codificam as proteínas não essenciais são removidos e substituídos por genes terapêuticos<sup>22</sup>.
- II. Vetores recombinantes defectivos: neste vetor um ou mais genes necessários para replicação (genes essenciais) são removidos, com isso, é necessário que este vetor seja replicado em células trans-complementares, que expressem a proteína ausente no genoma viral, para que ele consiga completar sua replicação<sup>41</sup>.
- III. Vetores *amplicon*: são vetores completamente defectivos, ou seja, todos os genes virais são deletados. Neste vetor, é requerido somente duas sequências não codificantes *cis* para a replicação do DNA do vetor viral amplicon (sequência *oriS*) e para o encapsulamento do genoma do vetor na partícula viral (sequência *pac*)<sup>42</sup>.

#### 1.3.1 Vetores amplicons

Os vetores amplicons são vetores defectivos derivados do vírus HSV-1 que não carregam nenhum gene herpético em seu genoma, sendo excelente ferramenta para transferência gênica<sup>24</sup>.

O genoma da partícula amplicon é representado por cópias em *tandem* do plasmídeo *amplicon*, cuja estrutura consiste em um gene de resistência a antibiótico e uma unidade de transcrição que apresenta um gene repórter e um local de clonagem múltipla para a introdução dos transgenes de interesse<sup>25</sup>.

O vetor amplicon tem a capacidade de transduzir numerosos tipos de células, uma vez empacotado em partículas virais, seu genoma será mantido em estado epissomal dentro do núcleo da célula transduzida. Devido à ausência de expressão gênica viral, o *amplicon* é completamente defectivo na replicação. Já que não integra no genoma da célula hospedeira, o amplicon convencional não leva à inserção mutagênese, aumentando assim seu perfil de segurança como vetor de terapia gênica<sup>30</sup>.

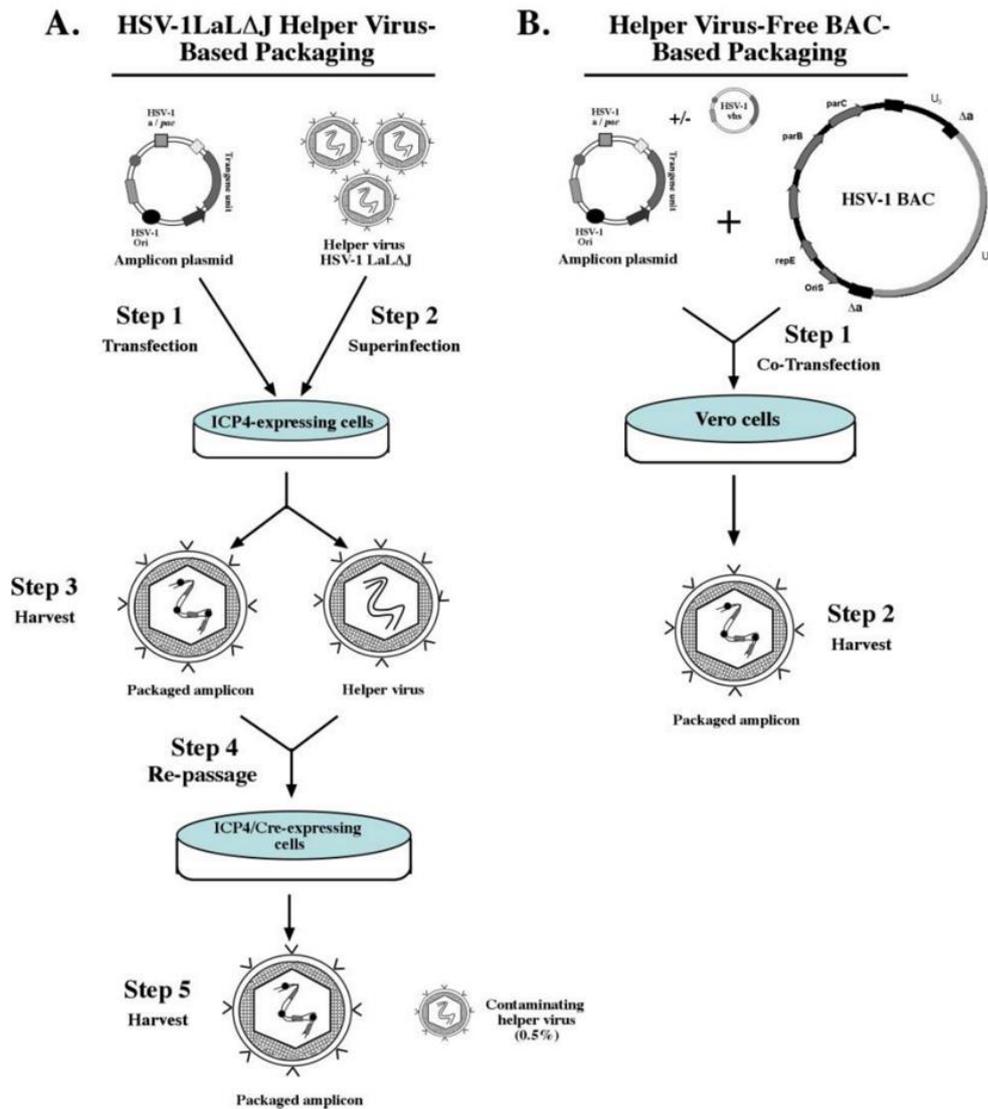
#### 1.3.1.1. Sistemas atuais de produção de amplicons

Atualmente, existem dois principais sistemas de produção de vetores amplicons; um que utiliza um vírus auxiliar ou *helper*<sup>43</sup>; e outro que utiliza um genoma auxiliar contido em um cromossomo artificial bacteriano (**Figura 3**)<sup>44</sup>.

O sistema de produção de vetores amplicons faz uso de um vírus auxiliar, ou seja, um vírus recombinante de replicação defectiva que transcomplementa os genes virais ausentes no genoma do vírus. Para produção dos vetores amplicons, inicialmente o plasmídeo amplicon é transfectado em células eucariontes (Vero – *CCL81*), que transcomplementam o gene viral deletado no vírus auxiliar. Nesse modelo de produção de vetores virais amplicon, o vírus auxiliar não possui ambas cópias do gene essencial ICP4<sup>43</sup>. A expressão dos genes virais do vírus auxiliar promove a replicação e empacotamento do plasmídeo amplicon dentro de partículas virais herpéticas. No entanto, esse sistema de produção de vetores virais amplicon possui contaminação de vírus auxiliares, paralelamente amplificados durante a produção dos vetores amplicons. Esta contaminação gera efeito citotóxico para as células e pode gerar respostas imunológicas como a ativação da resposta imune inata do hospedeiro<sup>42</sup>.

Para tentar corrigir este problema, *Logvinoff* e colaboradores propuseram um novo vírus auxiliar nomeado de *HSV-1 LaL* que utiliza uma sequência **pac** única floxada (com 2 sítios loxP adjacentes)<sup>28</sup>. Desta maneira a sequência **pac** deste vírus auxiliar pode ser clivada por recombinação sítio específica utilizando a enzima *Cre recombinase*, eliminando assim a

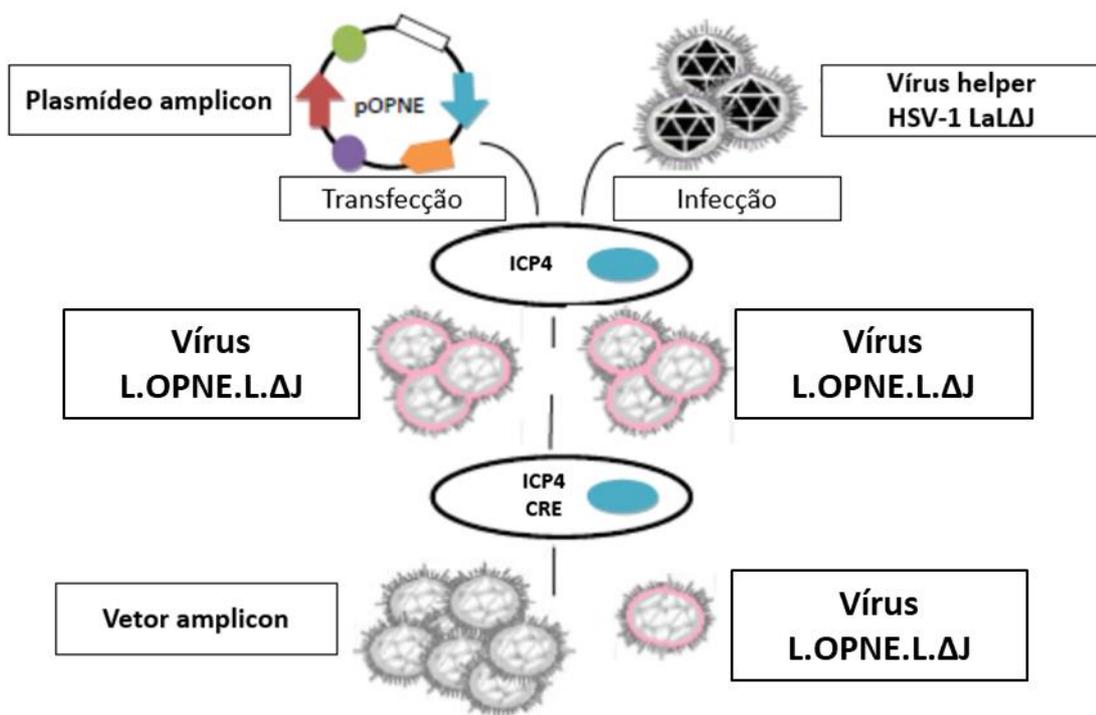
contaminação do vírus auxiliar na produção do estoque de *vetores amplicon* <sup>45</sup>. Este modo de produção apresentou uma quantidade de vetores *amplicons* de alto título porém a recombinação Cre/loxP apresentou falhas neste modelo pois há presença de reação reversa da recombinase Cre <sup>46</sup>. Posteriormente Zaupa e colaboradores modificaram o vírus *helper HSV-1 LaL* e removeram ambas cópias dos genes ICP34.5 e ICP4, localizados dentro das regiões de repetições invertidas, gerando o vírus auxiliar *HSV-1 LaLΔI* <sup>43</sup>.



Fonte: Burton, 2002<sup>23</sup>

Figura 3. Representação dos sistemas existentes para produção de vetor amplicon. (A) Técnica de empacotamento de amplicon utilizando o vírus auxiliar HSV-1 LaΔJ que apresenta a transfecção de um plasmídeo amplicon com o transgene de interesse em uma linhagem celular que complemente o ICP4 defectivo do helper. O estoque viral resultante, que contém partículas virais amplicon contaminadas com partículas virais auxiliares, é utilizado para infectar uma segunda linhagem celular que expressa os genes ICP4 e a enzima Cre recombinase. A recombinação Cre/loxP resulta na deleção da sequência pac do vírus helper, tornando seu genoma defectivo e reduzindo a quantidade de contaminação de partículas virais do helper. (B) Tecnologia de empacotamento baseada na co-transfecção do plasmídeo amplicon e do cromossomo bacteriano artificial (Bacterial Artificial Chromosome- BAC) contendo o genoma do vírus HSV-1 (deletado da sequência **pac**). O genoma de BAC-HSV-1-Δpac foi projetado para impedir o seu empacotamento em partículas virais, evitando assim a contaminação do estoque de vetores amplicon.

Para otimizar a técnica de produção de vetores amplicons através da utilização de vírus como auxiliar, Miño e colaboradores modificaram o vírus *helper* HSV1-LaLΔJ, substituindo o sinal de empacotamento (“a”) por um módulo amplicon floxeado (LoxP\_OriS-pac-FRT-EGFP\_LoxP) no locus gC (UL44), criando o vírus *helper* L.OPNE.L.ΔJ (**Figura 4**). Neste sistema há deleção da origem de replicação bacteriana e possibilidade de inserção de transgene através de recombinação sítio-específica.



**Fonte:** Benegas, 2017 (Monografia de Conclusão de Curso (Graduação em Genética) - Hospital de Câncer de Barretos, São Paulo)

Figura 4. Construção e funcionamento do sistema de produção de vetores amplicon utilizando o vírus auxiliar L.OPNE.L.ΔJ. O primeiro passo corresponde a infecção do vírus HSV-1 *LaLΔJ* seguido da transfecção do plasmídeo OPNE (LoxP\_OriS-pac-FRT-EGFP\_LoxP) na linhagem celular ICP4 (células Vero que expressa ICP4). Por último a produção de amplicons em células VCRe4 onde a recombinação sítio específica realiza a clivagem do genoma amplicon e a perda da capacidade de empacotamento do genoma *helper*.

### 1.3.1.2. Vetores amplicons para terapia gênica

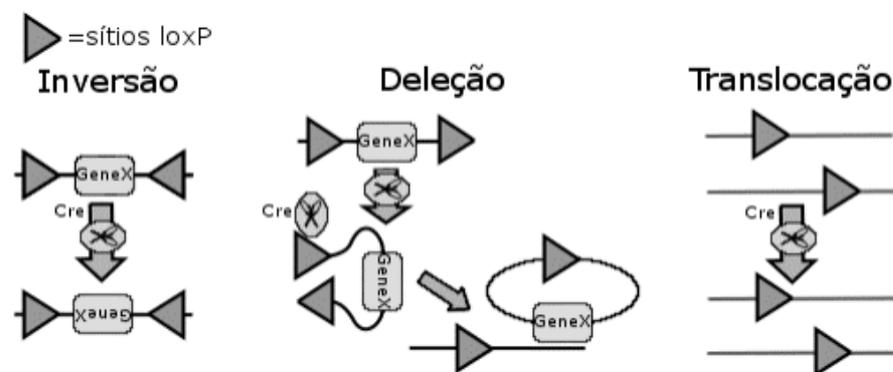
A capacidade de transgenese de até 150 kbp, juntamente com sua habilidade para transduzir diversos tipos de células de mamíferos, faz do *amplicon* um vetor de transferência de genes versátil. Já existem trabalhos em diversas áreas com o *amplicon*, como: mal de Parkinson<sup>47</sup>, terapia de câncer<sup>48</sup>, ataxia hereditária<sup>49</sup>, desenvolvimento de vacinas contra o câncer<sup>50</sup>, HIV<sup>51</sup> e doença de Alzheimer<sup>52</sup>.

## 1.4. Recombinação sítio específica

Recombinação genética é o nome dado para a troca de informação genética, responsável pela mistura de diversos genes assim como pela variabilidade genética. Algumas técnicas de biologia molecular nos permitem manipular genes específicos e fazer recombinações de interesse<sup>53</sup>.

### 1.4.1. Recombinação Cre/lox

Derivado do bacteriófago P1, o sistema de recombinação sítio específica mediado por Cre recombinase (**Figura 5**) tem amplo uso como ferramenta de manipulação gênica<sup>54</sup>. Nesta técnica a enzima Cre recombinase, pertencente à família das integrases de recombinação específica de local, reconhece seus sítios de ligação denominado de lox. Este sistema pode gerar deleção, inserção e translocação da região flanqueada pela sequência lox<sup>55</sup>.

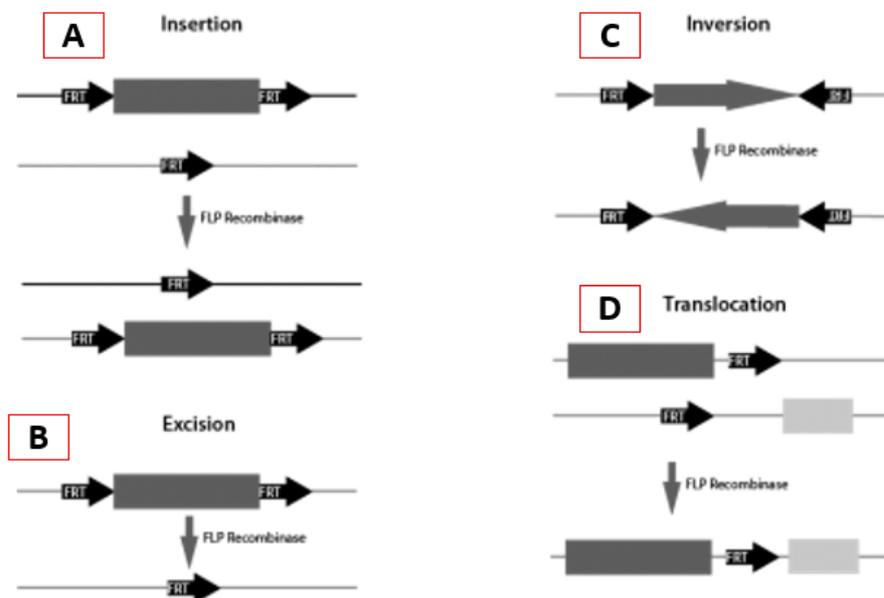


Fonte: Adaptado de Addgene (<https://www.addgene.org/collections/cre-lox/>).

Figura 5. Sistema de recombinação sítio específica Cre/lox. Método de inversão, deleção e translocação de uma sequência entre os sítios *lox*, mediada pela recombinase Cre.

#### 1.4.2. Recombinação Flpe/FRT

A recombinase Flipase (Flpe), derivada do *Saccharomyces cerevisiae*, reconhece a sequência FRT (do inglês, *flipase recognition target*) e gera a recombinação com outra região que possui FRT<sup>56,57</sup>. Essa recombinação pode gerar uma inserção, excisão, inversão ou translocação do gene de interesse que está localizado entre as sequências FRT<sup>57</sup> (Figura 6).



Fonte: Adaptado de Muratoglu, 2018 ([http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K2560271](http://parts.igem.org/Part:BBa_K2560271))

Figura 6. Sistema de recombinação sítio-específica Flpe/FRT. A) Inserção de um gene de interesse; B) Exclusão de uma sequência específica; C) Inversão de uma sequência; D) Tanslocação entre dois genes. Todo esse sistema é possível pela presença da enzima FRT e sua orientação em contato com a recombinase Flpe. (Adaptado de Muratoglu, 2018)<sup>58</sup>.

#### 1.5. Genes modificados do HSV-1 neste projeto

O genoma da HSV-1 é classificado em três grupos: *Immediate Early (IE)*, *Early (E)* e *Late (L)*. Estes genes codificam as proteínas de replicação, replicação proteica e proteínas

estruturais<sup>37</sup>. Apresentarei os genes que foram deletados ou modificados para a produção deste sistema de vetor:

O gene ICP4 (em inglês *Infected Cell Polypeptide 4*) codifica uma fosfoproteína de 350 kDa que regula positivamente e negativamente a RNA polimerase II<sup>59</sup>. Ela é uma das cinco proteínas de respostas imediatas sintetizadas durante a infecção viral. Ela é considerada um gene herpético essencial, sem o qual o vírus não consegue se replicar em cultura de células (por esse motivo, a ausência do gene precisa ser suplementada em linhagens celulares de expressão estável do gene ICP4)<sup>39</sup>. A ICP4 reprime a expressão dos genes imediatos iniciais e através da interação com fatores da RNA polimerase II ativa a expressão dos genes imediatos e tardios. O gene que codifica a proteína ICP4 está situado nas duas sequências invertidas, ou seja, o genoma da HSV-1 possui duas cópias do gene ICP4<sup>60</sup>.

O gene ICP34.5 codifica o fator de neuro virulência do vírus, tem um papel fundamental na replicação viral e na resposta vírus-hospedeiro. Esta proteína (não essencial) apresenta sinais nucleares de importação e exportação que direcionam o transporte de proteínas entre o citoplasma, o núcleo e o nucléolo<sup>61</sup>. Ela é codificada nas repetições invertidas (possuindo duas cópias do gene por genoma viral), e apresenta cerca de 264 aminoácidos. Esta proteína apresenta sinais nucleares de importação e exportação que direcionam o transporte de proteínas entre o citoplasma, o núcleo e o nucléolo<sup>62</sup>.

Os genes mencionados acima foram retirados do vírus parental utilizado na construção deste trabalho para gerar uma maior biossegurança na sua manipulação e tornar o vírus defectivo, fazendo com que consiga somente se replicar na linhagem celular que complemente o gene essencial removido, ICP4.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Os modelos atuais de produção de vetores virais amplicons ou apresentam contaminação pelo vetor helper levando a ativação de resposta imune-inata do hospedeiro ou são gerados em pequena quantidade. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de um novo sistema para obtenção deste vetor, o qual seja capaz de produzir uma grande quantidade de amplicons puros aptos para protocolos de transferência gênica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar o sistema de produção de vetores virais amplicons utilizando as recombinases Flpe e Cre.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Conferir a estrutura das sequências FRT dos vetores através de sequenciamento de Sanger;
- Inserir um transgene de interesse por recombinação sítio-específica Flpe/FRT no locus FRT do vírus HSV-1 recombinante L.OPNE.L.ΔJ;
- Produzir estoques de vetores *amplicons*, a partir da recombinação sítio-específica Cre/Lox;
- Analisar qualitativamente a produção de amplicon com microscopia de fluorescência.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas para execução deste estudo estão descritas na **Tabela 2**. A manutenção de todas as linhagens celulares foi realizada com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma)* suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina e incubadas em estufa à 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>. Todas as linhagens foram testadas quanto a presença de *Mycoplasma* spp. a cada 15 dias.

**Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas na realização deste projeto**

Linhagem	Origem
Vero (CCL-81)	Renais de macaco verde africano
7b*	Derivadas de Vero que expressam ICP4
A172 **(CRL-162)	Derivadas de glioblastoma humano

\* Cedidas por Alberto Epstein, UCBL1, Lyon, França;

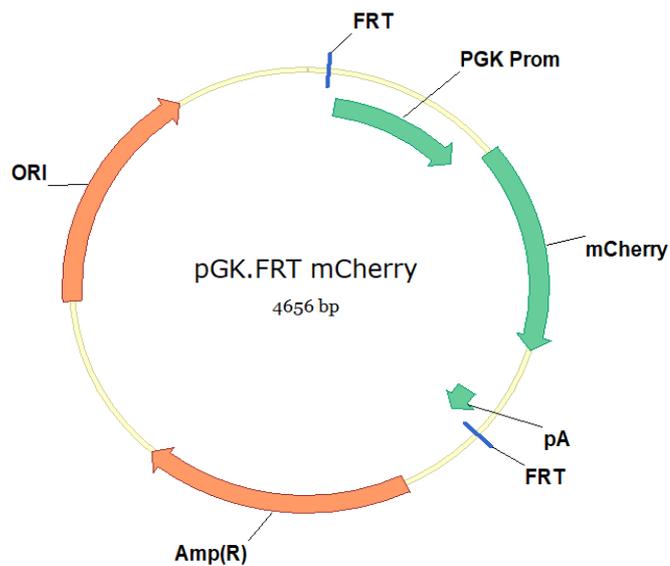
\*\*Cedidas por Rui Manuel Reis, HCB, Barretos, Brasil.

### 4.2. Vetores utilizados neste projeto

Os vetores necessários para a execução deste projeto foram preparados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e serão descritos a seguir.

#### 4.2.1. Plasmídeo pGK.FRT mCherry

O plasmídeo pGK.FRT mCherry (**Figura 7**) codifica para a proteína fluorescente vermelha (mCherry) flanqueada com duas sequências FRT paralelas. As sequências FRT deste plasmídeo foram sequenciadas por Sanger para confirmar sua estrutura. Este plasmídeo foi originado do plasmídeo comercial FRT-PGK-gb2-neo-FRT (*GeneBridges*) e foi utilizado como prova de conceito de transgenia através da recombinação mediada por flipase.

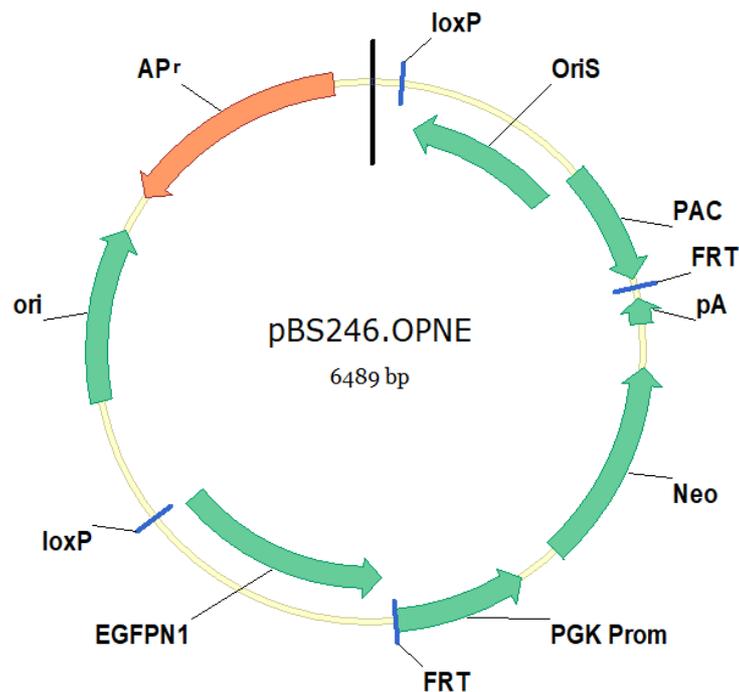


**Fonte:** Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 7: Estrutura do plasmídeo pGK.FRT mCherry. Representação do genoma do pGK.FRT mCherry onde há AmpR: Resistencia a ampicilina, ori: origem de replicação bacteriana, pA: ponto de poliadenilação, PGK Promoter: promotor de fosfoglicerato quinase murina que realiza a expressão do gene repórter permitindo a expressão estável, mCherry: gene de expressão de fluorescência vermelha e FRT: sequência FRT que irá interagir com a recombinase Flipase para recombinação sítio-específica.

#### 4.2.2. Plasmídeo pBS246.OPNE

O Plasmídeo pBS246.OPNE (**Figura 8**) foi derivado do plasmídeo comercial pBS246 (*Invitrogen*). As sequencias FRT deste plasmídeo foram sequenciadas por Sanger para confirmar sua composição. Para a criação deste plasmídeo foi clonado entre as sequências Loxp: um promotor, origem de replicação viral (**oriS**), sinal de empacotamento (**pac**), resistência a neomicina, proteína fluorescente verde (**EGFP**), resistência a ampicilina e duas sequencias FRT. Este plasmídeo foi utilizado na construção do vírus *helper* L.OPNE.L.ΔJ utilizado neste projeto.

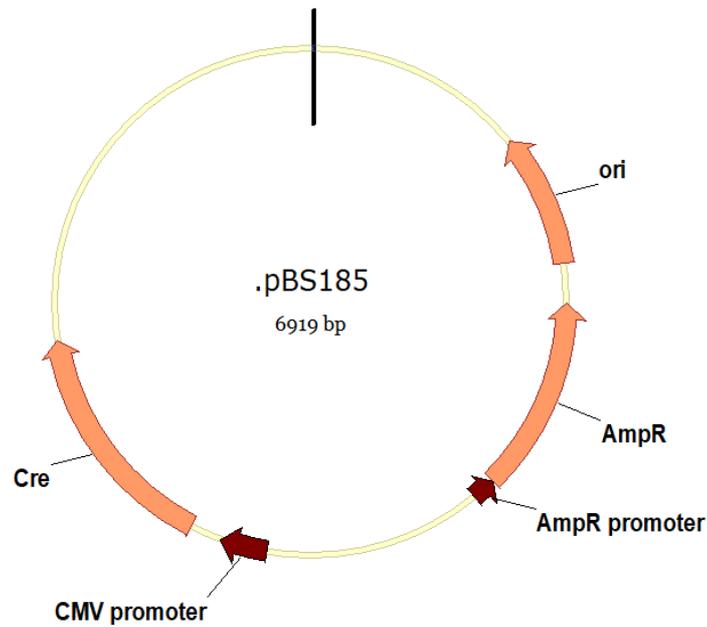


Fonte: Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 8. Estrutura do plasmídeo pBS246.OPNE. Representação do genoma do pBS246.OPNE onde há Ap: Resistência a ampicilina, Neo: resistência a neomicina, ori: origem de replicação bacteriana, pA: ponto de poliadenilação, PGK Promoter: promotor de fosfoglicerato quinase murina que realiza a expressão do gene repórter permitindo a expressão estável, Lox: sítio loxp, FRT: sítio de recombinação FRT, NeoR: gene de resistência à Neomicina; pac.: sequência de empacotamento do HSV-1 e oriS: origem de replicação do HSV-1.

#### 4.2.3. Plasmídeo pBS.185

Plasmídeo comercial (*Addgene Plasmid #11916*) (**Figura 9**) que apresenta a recombinase Cre. Esta recombinase interage com os sítios LoxP presente no vírus recombinante L.OPNE.L.ΔJ resultando na deleção do vetor *amplicon* e tornando o helper incapaz de se encapsular, devido à ausência da sequência pac.

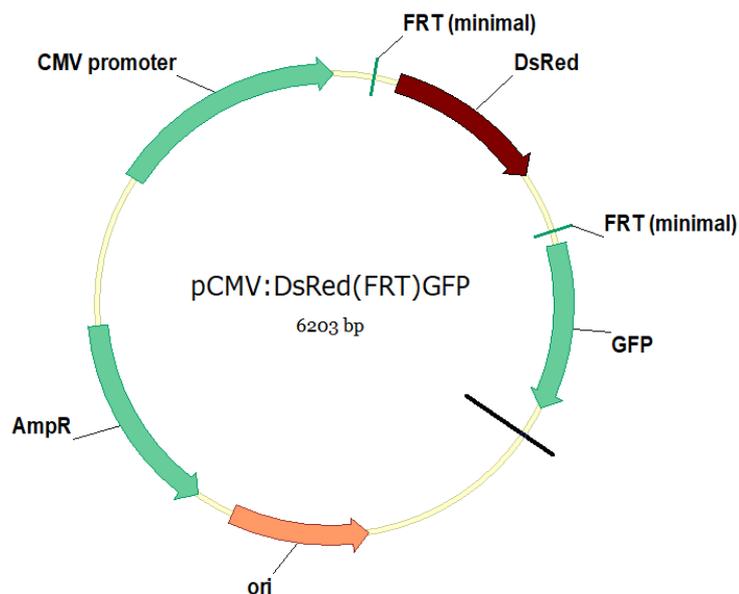


**Fonte:** Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 9. Estrutura do plasmídeo pBS.185. Representação do genoma do pBS.185 onde há AmpR: resistência a ampicilina, ori: origem de replicação bacteriana, Cre: enzima de recombinação sítio específica e CMV promoter: promotor de expressão transitória de transgenes.

#### 4.2.4. Plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP

Plasmídeo comercial (**Figura 10**) que apresenta a fluorescência vermelha (DsRed) na ausência de flipase e na presença de flipase apresenta fluorescência verde (GFP) devido a excisão causada pela flipase nos seus sítios FRT (*Addgene Plasmid #31128*). Foi utilizado em co-transfecção com Flpe para teste de expressão de Flipase em células Vero.

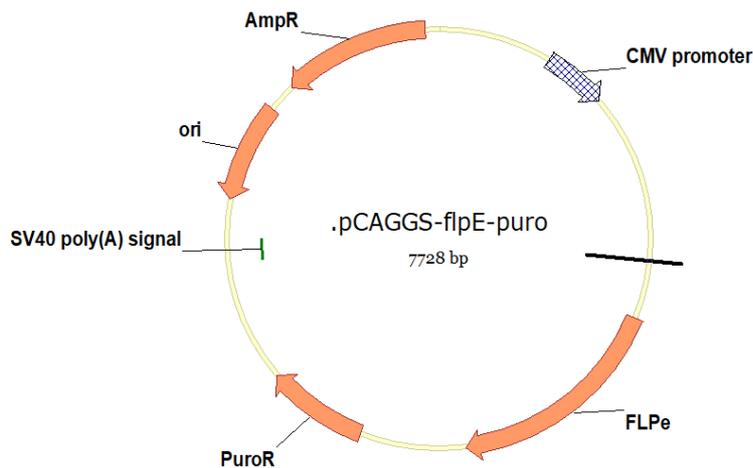


Fonte: Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 10. Estrutura do plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP. Representação do genoma do pCMV:DsRed(FRT)GFP onde há AmR: resistência a ampicilina, CMV promoter: promotor para expressão gênica, GFP: *green fluorescent protein* e duas regiões FRT.

#### 4.2.5. Plasmídeo pCAGGS-flpE-puro

Plasmídeo comercial (*Addgene Plasmid #20733*) (**Figura 11**) que apresenta a recombinase Flipase (Flpe) e resistência a puromicina e ampicilina. A recombinase Flipase é utilizada na recombinação sítio específica com FRT. Foi utilizada em co-transfecção com pGK.FRT mCherry e o vírus L.OPNE.L.ΔJ para substituir a resistência de neomicina do vírus por mCherry, como prova de conceito em transgenia do vírus.



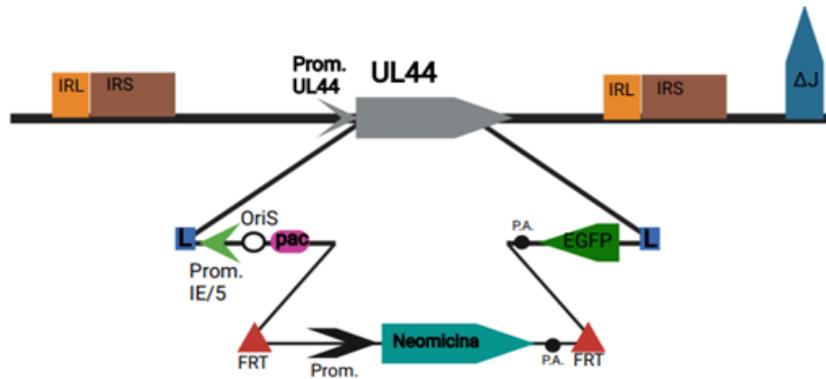
Fonte: Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 11. Estrutura do plasmídeo pCAGGS-flpE-puro. Representação do genoma do pCAGGS-flpE-puro onde há AmR: resistência a ampicilina, PuroR: resistência a puromicina, Flpe: recombinase flipase.

#### 4.2.6. Vírus L.OPNE.L.ΔJ

Vírus *helper* utilizado para criação do vetor proposto neste projeto. Este vírus é derivado do recombinante chamado de LaL.ΔJ, desenvolvido por Zaupa e colaboradores<sup>43</sup>. A sequência ΔJ representa a deleção das sequências repetidas ICP4 (essencial para sua replicação do vírus em cultura) e do gene ICP34.5 (gene da neuro virulência herpética). Com a ausência do gene ICP4 o vírus se torna defectivo e só poderá se replicar em célula que expresse e complemente esta ausência de ICP4.

Para a geração do vírus L.OPNE.L.ΔJ (**Figura 12**) foi clonado entre o promotor e o gene UL44 as regiões entre os *Loxp* do plasmídeo pBS246.OPNE.



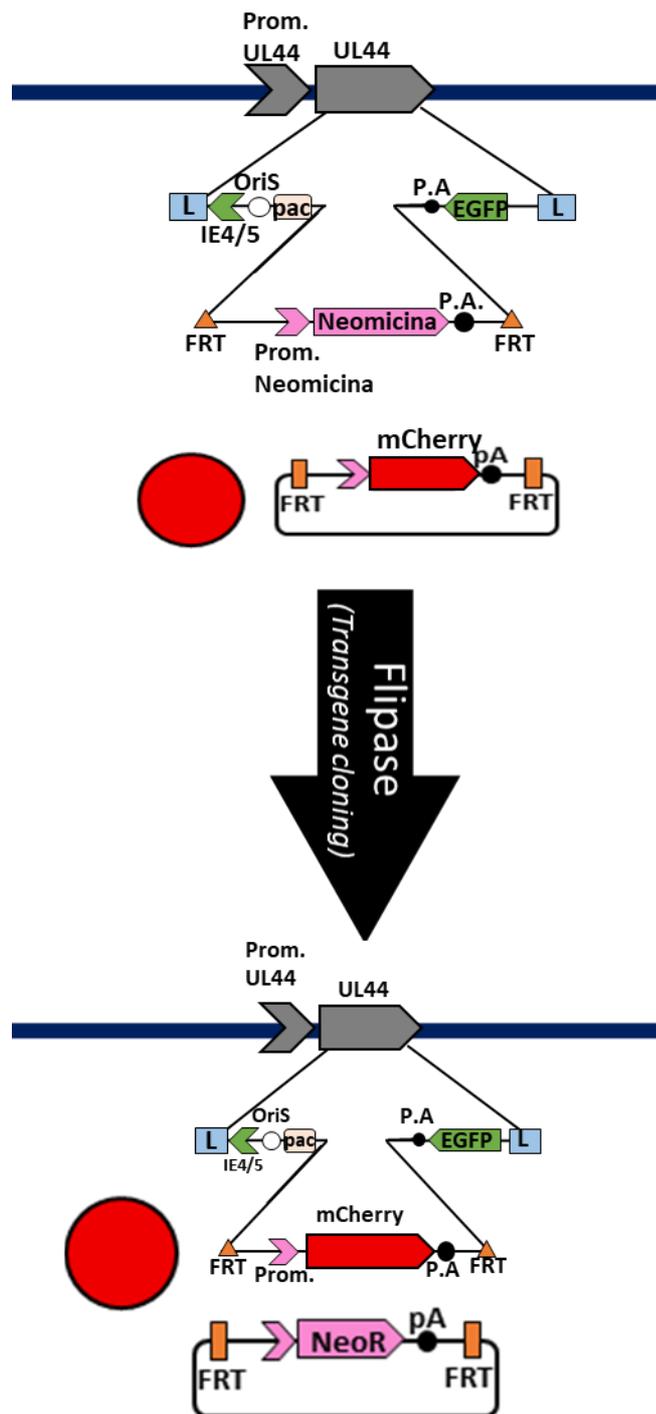
Fonte: Peloso, 2022 (BioRender)

Figura 12. Estrutura do vírus L.OPNE.L.ΔJ. Vírus *helper* L.OPNE.L.ΔJ formado por sequência repetida longa e repetida curta. Entre o gene UL44 e seu promotor apresenta as regiões entre os Loxp do plasmídeo pBS246.OPNE.

### 4.3. Prova de conceito da transgenia

Para a prova de conceito da transgenia, foi utilizado um vírus contendo o genoma HSV-1 recombinante L.OPNE.L.ΔJ (**Figura 12**). A amplificação e produção das partículas virais foi realizada utilizando  $6 \times 10^5$  células da linhagem 7b semeadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura M199 suplementado com 1% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Para extração de DNA viral, as células 7b foram cultivadas em garrafa T75 e ao atingir 100% de confluência foram infectadas com o vírus L.OPNE.L.ΔJ (MOI 1,0). Após 96 horas da infecção as partículas virais foram recuperadas através do protocolo descrito no item 4.3.1.

Para a recombinação mediada por Flipase,  $6 \times 10^5$  células da linhagem 7b foram semeadas em placas de 6 poços. Após a sua adesão, as células foram transfectadas com 2  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pGK.FRT mCherry e 2  $\mu\text{g}$  pCAGGS-flpE-puro e posteriormente infectada à MOI 1 com o vírus recombinante produzido anteriormente. Neste processo, ocorreu a recombinação mediada por Flpe/FRT, gerando a substituição da neomicina presente L.OPNE.L.ΔJ (**Figura 13**) pela proteína fluorescente mCherry, flanqueada por 2 sequências FRT do plasmídeo pGK.FRT mCherry. Após 72h de infecção obtivemos a placa de lise vermelha e recuperamos as partículas virais.



**Fonte:** Peloso, 2022 (PowerPoint)

Figura 13. Mecanismo de inserção de transgenes no genoma do vírus *L. OPNEL.ΔJ*. Através da recombinação Flpe/FRT, a mCherry irá substituir a neomicina do vírus, levando fluorescência vermelha no êxito da técnica; mCherry: proteína fluorescente mCherry (vermelha); *Lox*: sítio *loxP*; *pA*: sinais de poliadenilação; *FRT*: sítio de recombinação FRT; *NeoR*:

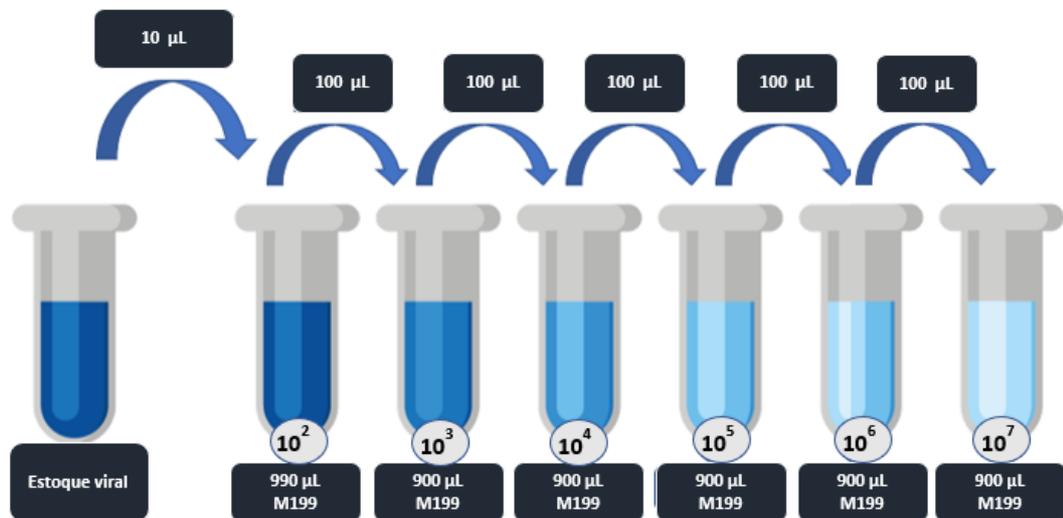
gene de resistência à Neomicina; *pac.*: sequência de empacotamento do HSV-1; *oriS*: origem de replicação do HSV-1; *UL44*: gene da glicoproteína C. Os retângulos com a letra “L” indicam os sítios loxp. Os círculos vermelhos indicam que a expressão da proteína fluorescente mCherry. Todos os promotores estão indicados com pontas de setas (< ou >).

#### 4.3.1. Recuperação de partículas viral

Para recuperação das partículas virais foi necessário anteriormente preparar uma garrafa T75 totalmente confluyente com a linhagem transcomplementar 7b e infectar com L.OPNE.L.ΔJ. á MOI 1,0. Após observar o efeito citopático, formação da placa de lise e aguardar 72 horas raspamos o fundo da garrafa e recuperamos todo o conteúdo para centrifugação. A centrifugação foi de 15 minutos, 448 x g e 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi recuperado e armazenado em um eppendorf e o *pellet* eliminado (pois continha somente *debris* celulares). O eppendorf contendo o sobrenadante foi congelado à -80 °C, descongelado e sonificado três vezes seguidas e logo após centrifugado à 4 °C por 20 minutos com 448 x g. A posteriori o sobrenadante foi recuperado e armazenado em um novo eppendorf, na qual foi utilizado para infecção e o restante armazenado à -80 °C para futuras utilizações.

#### 4.3.2. Titulação viral

Anterior a titulação viral, foi plaqueado  $3 \times 10^5$  células da linhagem 7b por poço na placa de 12 poços. A infecção viral foi realizada em duplicada utilizando 6 poços com diluição seriada do stock viral (**Figura 14**).



**Fonte:** Autoria própria (PowerPoint)

Figura 14. Diluição para titulação viral de L.OPNEL.ΔJ. Foi retirado 10 µL do estoque do vírus e adicionado em tubo com 990 µL de meio M199 e deste conteúdo, 100 µL foi transferido para outro tubo com 900 µL de M199 e assim por diante. Do conteúdo de cada tubo, foi utilizado 100 µL do total para infectar cada poço da placa com as células.

Após o tempo de infecção, realizamos a observação ao microscópio e o cálculo foi expresso em unidades formadoras de placas de lise com a seguinte fórmula:  $T = n f / i$ .

- ***n***: soma dos números de placas de lise somadas nos poços que apresentam número contável;
- ***f***: fator da menor diluição que contribuiu para o valor *n*;
- ***i***: somatória dos volumes (em mL) das partículas virais entregues nos poços em que se contaram placas de lise.

#### 4.4. Sequenciamento Sanger das regiões FRT na presença de Flipase

Para confirmar a interação das regiões FRT do pGK.FRT mCherry e do pBS246.OPNE com a recombinase Flipase, realizamos o sequenciamento das amostras na presença de flipase. Para isto, preparamos uma placa de 6 poços contendo  $6 \times 10^5$  células da linhagem Vero e transfectamos 2 µg pGK.FRT mCherry e 2 µg de pCAGGS-flpE-puro e após aguardar 48 horas

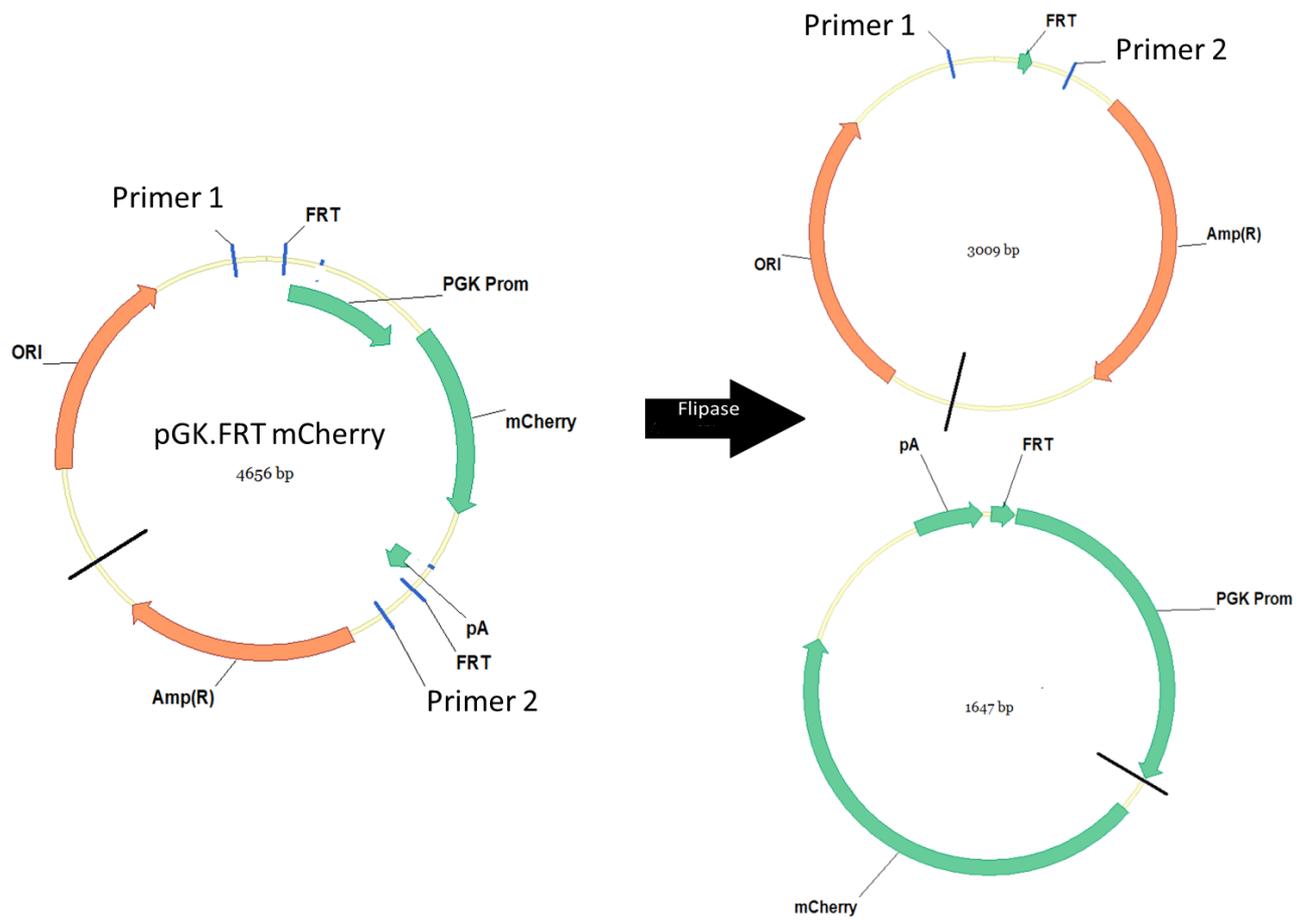
extraímos o DNA com *BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus*. Realizamos o mesmo teste com transfecção de 2 µg pBS246.OPNE e 2 µg de pCAGGS-flpE-puro em outro poço contendo a linhagem Vero. Para o protocolo de extração de DNA foi necessário raspar todo o fundo da placa transfectada, centrifugar à 252 x g em temperatura ambiente por 5 minutos e descartar o sobrenadante. Posteriormente adicionar 200 µL de PBS para ressuspender o *pellet* e seguir o protocolo do kit para extração de DNA genômico.

Quando há duas sequencias FRT flanqueadas entre um gene a flipase causa a excisão deste gene, dividindo em duas moléculas com apenas um FRT em cada. O sequenciamento proposto permitiu à amplificação e análise da recombinação mediada por flipase através do resultado da excisão das sequencias FRT em dois diferentes amplicons através dos primers descritos na **Tabela 3**.

**Tabela 3. Primers para sequenciamento das regiões FRT.**

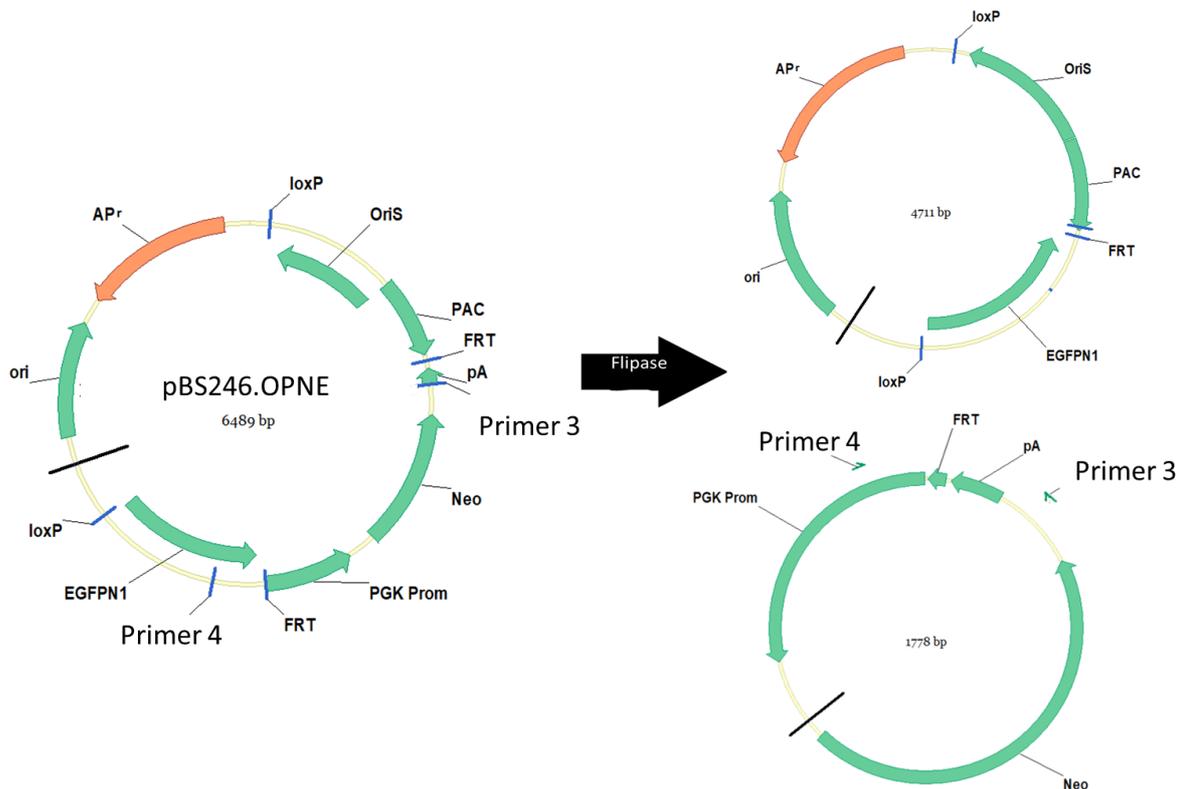
Nome do primer	Sequência (5' -> 3')
Primer 1 pGK_FRT_Upstream_F	CTTCCCCATCGGTGATGTCCG
Primer 2 pGK_FRT_Downstream_R	GTCAGGATGGCCTTCTGCTT
Primer 3 OPNE_FRT_Upstream_R	TGGAGTTCTTCGCCGTTTCC
Primer 4 OPNE_FRT_Downstream_R	GGATCACTCTCGGCATGGAC

Realizamos o sequenciamento do plasmídeo o pGK.FRT mCherry com os primers *Upstream forward* com o *Downstream reverse* (primer 1 e 2) (**Figura 15**). Para o sequenciamento do plasmídeo pBS246.OPNE utilizamos os primers *Upstream reverse* e *Downstream forward* (primers 3 e 4). (**Figura 16**).



**Fonte:** Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 15. Esquema de amplificação do plasmídeo pGK.FRT mCherry na presença de flipase com primer 1 e 2.



Fonte: Peloso, 2022 (VectorNTI)

Figura 16. Esquema de amplificação do plasmídeo pBS246.OPNE na presença de flipase com primer 3 e 4.

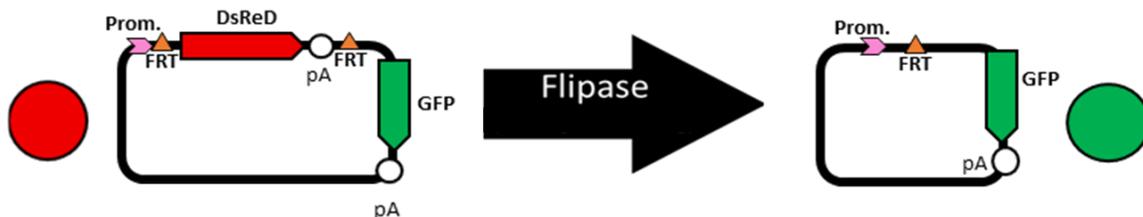
Inicialmente realizamos o PCR das sequências FRT com os primers descritos anteriormente e utilizamos a enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher). Para isso, a PCR foi preparada utilizando um volume final de 25  $\mu\text{L}$  divididos entre 11,8  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q®, 5,0  $\mu\text{L}$  de buffer CG, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (10 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  dos primers forward e 2,5  $\mu\text{L}$  do reverse ambos diluídos à 10 mM, 1,5  $\mu\text{L}$  de DMSO, 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima *Phusion* e 10 ng de DNA. Utilizamos a temperatura de 58 °C para o anelamento no equipamento *Veriti* (Thermo Scientific). Após o PCR confirmamos o tamanho das bandas através de gel de eletroforese 2% e seguimos com o sequenciamento de Sanger.

Para purificar o produto de PCR uma placa espelho com 5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR + 15  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q®, vedamos a placa e agitamos por 2 minutos. Posteriormente adicionamos 1,25  $\mu\text{L}$  de *ExoSap-IT* na placa e colocamos no gelo. A reação foi então colocada no termociclador por 30 minutos à 37 °C e 15 minutos à 80 °C. A reação do sequenciamento se iniciou com a diluição dos primers para 3,2  $\mu\text{M}$  e adição do mix com *BigDye* (0,3  $\mu\text{L}$  de *BigDye*,

2  $\mu\text{L}$  buffer e 1  $\mu\text{L}$  de primer) seguido de *spin*. Após adicionar 3,3  $\mu\text{L}$  do mix na placa com produto de PCR e dar o *spin*, foi necessário colocar no termociclador na programação que repetia 30 vezes o ciclo de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após a reação, configuramos o computador e iniciamos o sequenciamento através do sequenciador modelo 3500XL (*Applied Biosystems*).

#### 4.4.1. Avaliação funcional da recombinação sítio específica mediada por Flpe

Transfectamos na linhagem Vero, utilizando Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher), 2  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP que expressa fluorescência diferente na presença e ausência da flipase e 2  $\mu\text{g}$  do plasmídeo de expressão de Flpe (pCAGGS-flpE-puro). Na ausência de flipase o plasmídeo apresenta fluorescência vermelha, pois há apenas um promotor, expressando o DsRed (**Figura 17**). Na presença de flipase haverá fluorescência verde pois o DsRed será clivado fazendo com que o promotor expresse o GFP (em inglês, *green fluorescent protein*).



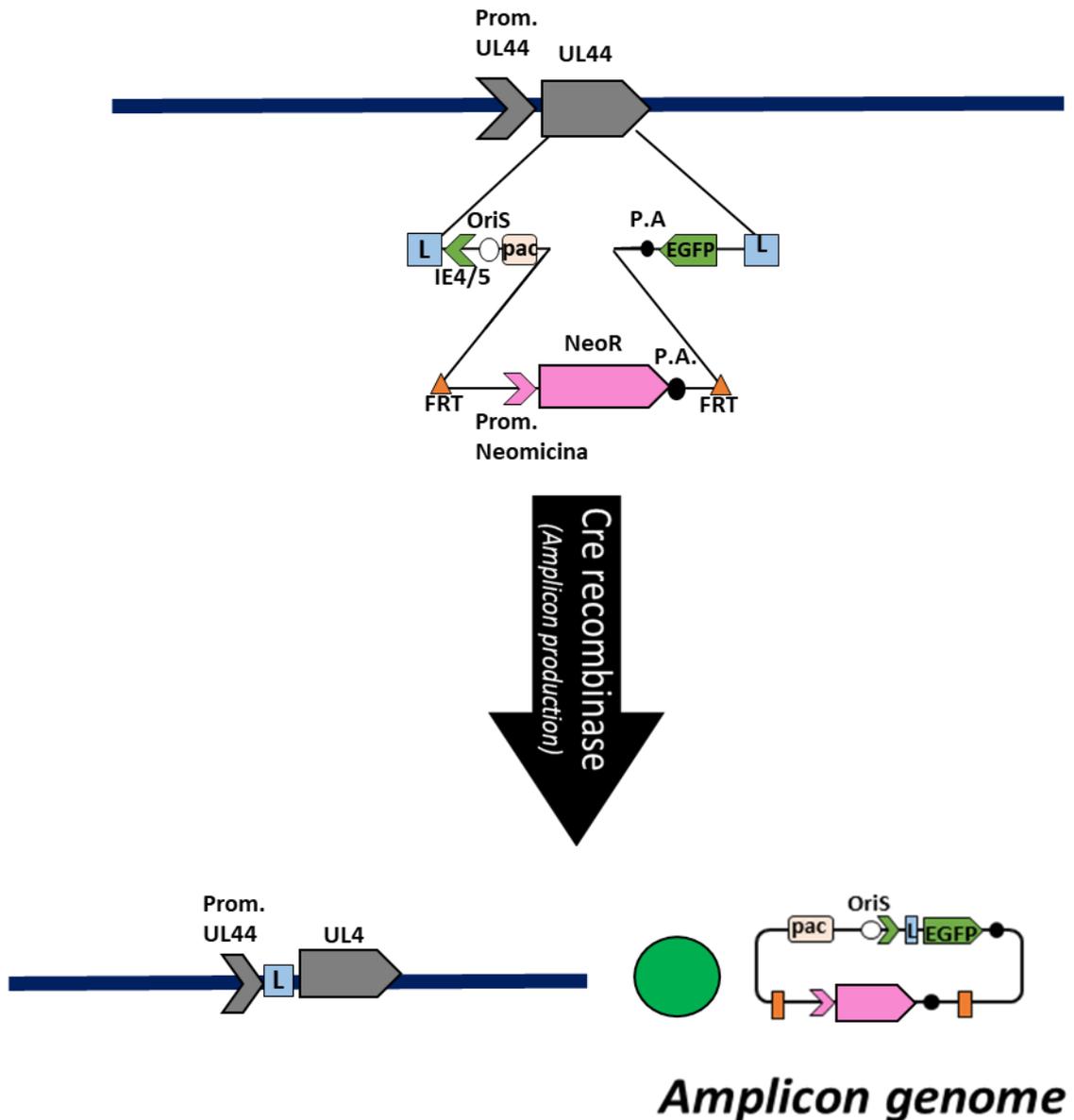
**Fonte:** Autoria própria (PowerPoint)

Figura 17. Mecanismo de recombinação sítio específica com o plasmídeo pCMV:DsRed(FRT)GFP. Através da recombinação Flpe/FRT, ocorrerá a deleção da sequência DsRed e o promotor irá expressar a GFP. Prom: promotor de expressão em células de mamíferos; DsRed: fluorescência vermelha; GFP: fluorescência verde; FRT: sítio de recombinação FRT. O círculo vermelho indica a expressão da proteína fluorescente DsRed. O círculo verde indica a expressão GFP. Todos os promotores estão indicados com pontas de setas (< ou >).

#### 4.5. Produção de partículas mini-amplicons

A produção das partículas amplicons depende diretamente da expressão da recombinase Cre presente no plasmídeo pBS.185. Então para a produção de partículas

*amplicons* preparamos uma placa de 6 poços com  $6 \times 10^5$  células da linhagem 7b e transfectamos o plasmídeo de expressão Cre e infectamos com o vírus HSV-1 L.ONE.L.ΔJ. Após a infecção a recombinase Cre interagiu com os sítios Lox presente no vírus e gerou a excisão do módulo amplicon, como esperado. Com a excisão observamos a fluorescência verde, consequência da aproximação do promotor IE4/5 na proteína fluorescente verde (EGFP) (Figura 18).



**Fonte:** Autoria própria (PowerPoint)

Figura 18. Mecanismo de produção de vetores virais mini-amplicon. Através da recombinação Cre/lox, a enzima Cre recombinase irá clivar sobre os sítios loxP, produzindo um vírus com funções Helper e um genoma Amplicon. Lox: sítio loxP; pA: sinais de poliadenilação; FRT: sítio de recombinação FRT; NeoR: gene de resistência à

Neomicina; pac.: sequência de empacotamento do HSV-1; oriS: origem de replicação do HSV-1; UL44: gene da glicoproteína C. Os retângulos com a letra “L” indicam os sítios loxP. O círculo verde indica a expressão da proteína fluorescente EGFP. Todos os promotores estão indicados com pontas de setas (< ou >).

Posteriormente recuperamos as partículas virais, conforme protocolo descrito no tópico 4.3.1. e transduzimos nas linhagens A172 e Vero. Este teste serviu como prova de conceito de replicação defectiva e comprovação que a fluorescência causada pela transdução de amplicons seguiu sendo expressa em linhagens com ausência de Cre e derivadas de mamíferos.

#### **4.5.1. Recombinação mediada por Cre**

Para gerar a recombinação mediada por Cre utilizamos o plasmídeo pBS.185 e o vírus recombinante L.OPNE.L.ΔJ. Iniciamos com a transfecção utilizando *Lipofectamina 3000 Reagent – Thermofisher*. Para isto, utilizamos 2 µg do plasmídeo pBS.185 com 7,5 µL de Lipofectamina 3000 e 5 µL de P300 e após misturar e aguardar 15 minutos, gotejamos delicadamente em um poço contendo  $6 \times 10^5$  células 7b em uma placa de 6 poços. Aguardamos 48 horas de transfecção, como sugere o protocolo do reagente, e infectamos com L.OPNE.L.ΔJ. á MOI 0,5. Após 72 horas passadas do início da infecção raspamos o fundo do poço e recuperamos as partículas virais, conforme descrito em 4.3.1., e utilizamos para transduzir as linhagens, Vero e A172.

#### **4.5.2. Análise por microscopia de fluorescência**

O estoque de vetores *amplicons* foi avaliado quanto à sua pureza e título. Para tal, titulamos as partículas virais “*helper*” em células 7b, por diluição seriada em placas de 12 poços. O número de placas de lise foi quantificado e o título do stock viral calculado. Simultaneamente, o número de vetores *amplicons* produzido foi quantificado em células A172 por microscopia de fluorescência.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Produção e amplificação viral

A linhagem 7b foi plaqueada e na confluência de 100% foi infectada pelo vírus L.OPNE.L.ΔJ (**Figura 19**) com baixa carga viral (*MOI* de 0,01). As imagens representadas na Figura 19 evidenciam a linhagem 7b infectada em menor (**Figura 19A, 19C, 19E**) e maior aumento (**Figura 19B, 19D, 19F**) em diferentes momentos de infecção. Nas imagens, A e B, é possível observar que as células estão aderidas, diferenciadas e de forma íntegra. Por outro lado, as imagens representadas nas letras, C e D, evidenciam células como efeito citopático inicial após 48 horas de infecção, em menor (4X) e maior aumento (10X), respectivamente. Com as imagens das letras E e F é possível observar o efeito citopático e a formação de placas de lise.

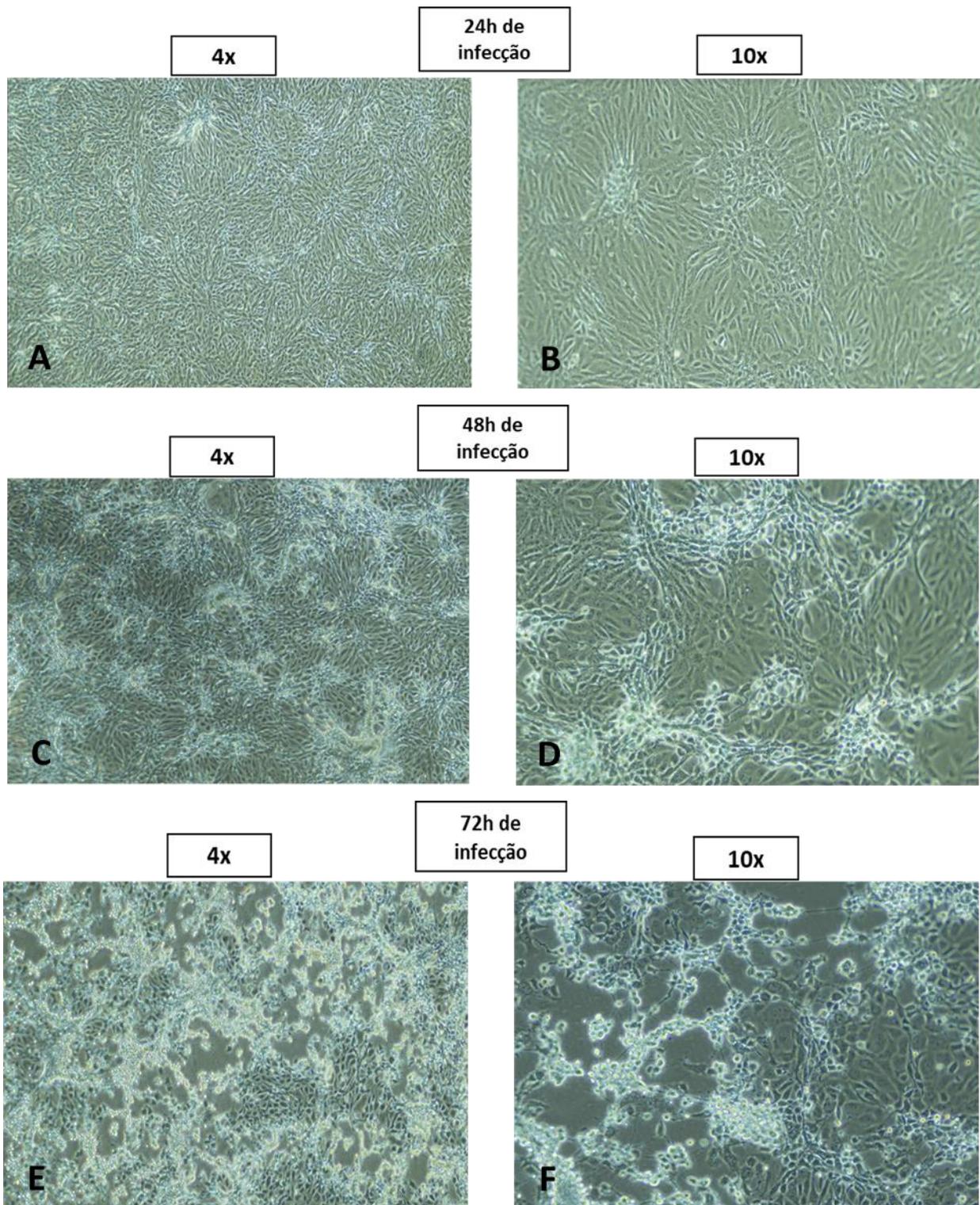


Figura 19. Evolução do processo de infecção do vírus L.OPNE.L.ΔJ em células 7b. A infecção com o vírus recombinante realizada em célula transcomplementar e captada com 24h (Figura 19A e 19B), 48h (Figura 19C e 19D) e 72h (Figura 19E e 19F) em aumento de 4x e 10x para evidenciar o surgimento o efeito citopático e a formação de placas de lise.

### 5.1.2. Quantificação viral

Após aguardar 96 horas de infecção para a titulação viral em placa de 12 poços (**Figura 20**) obtivemos a seguinte quantidade de placas de lise:

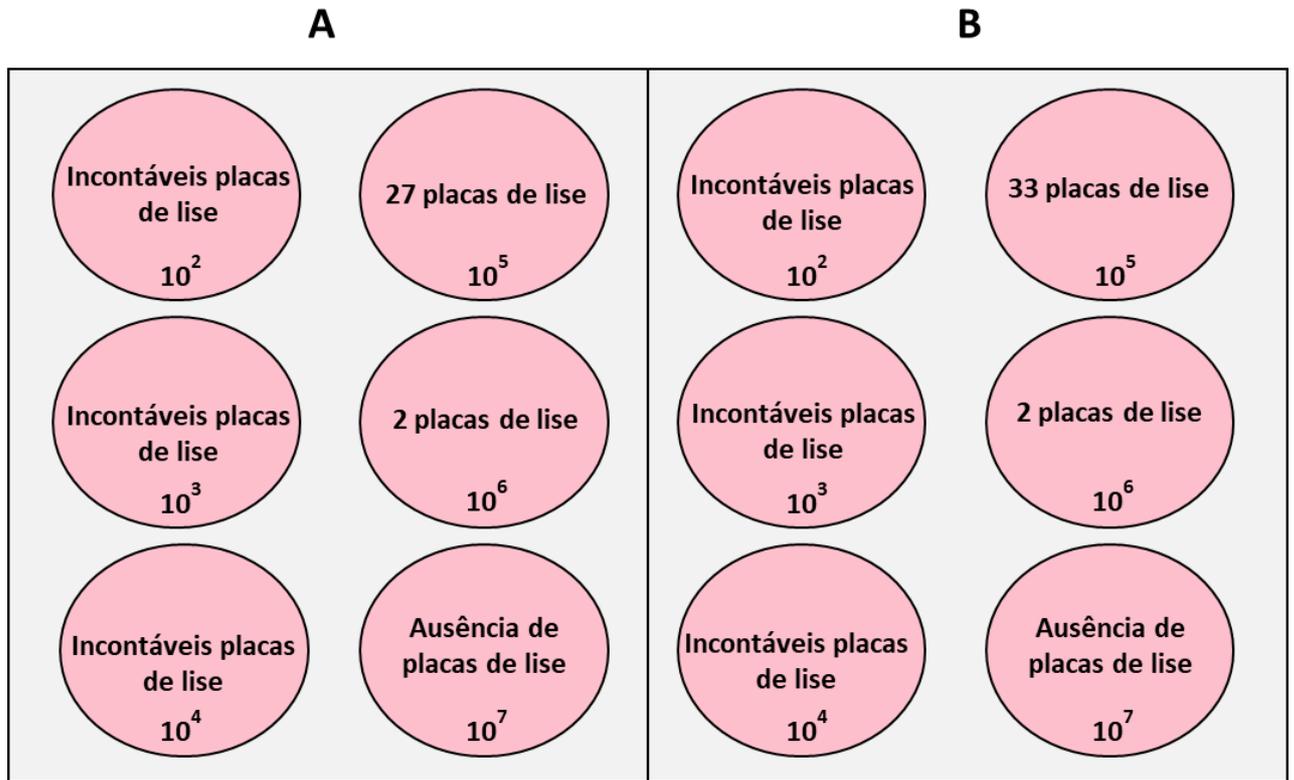


Figura 20. Exemplo de esquema de titulação viral, 96 horas pós-infecção. Nos primeiros três poços (titulação de  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$ ), de ambos os lados, apresentavam muitas placas de lise e não foi possível a sua contagem com exatidão. No quarto poço do lado A, a contagem foi de 27 placas de lise e no lado B foi de 33 placas. No quinto poço foi possível a contagem de 2 placas em cada lado.

O resultado da titulação viral foi de  $2,5 \times 10^7$  PFU/mL (unidade formadora de placa, em inglês *plaque forming units*).

### 5.1.3. Prova de conceito de vírus defectivo

As linhagens, Vero e 7b, foram plaqueada e na confluência de 100% foi infectada pelo vírus L.OPNE.L.ΔJ à MOI 0,5 (**Figura 21**). As primeiras três imagens mostram a linhagem Vero infectada pelo vírus e não há presença de células infectadas, efeito citopático e formação de

placas de lise em nenhum dos aumentos. Na linhagem 7b pode-se observar a infecção através da presença de placas de lise e efeito citopático em todos os aumentos.

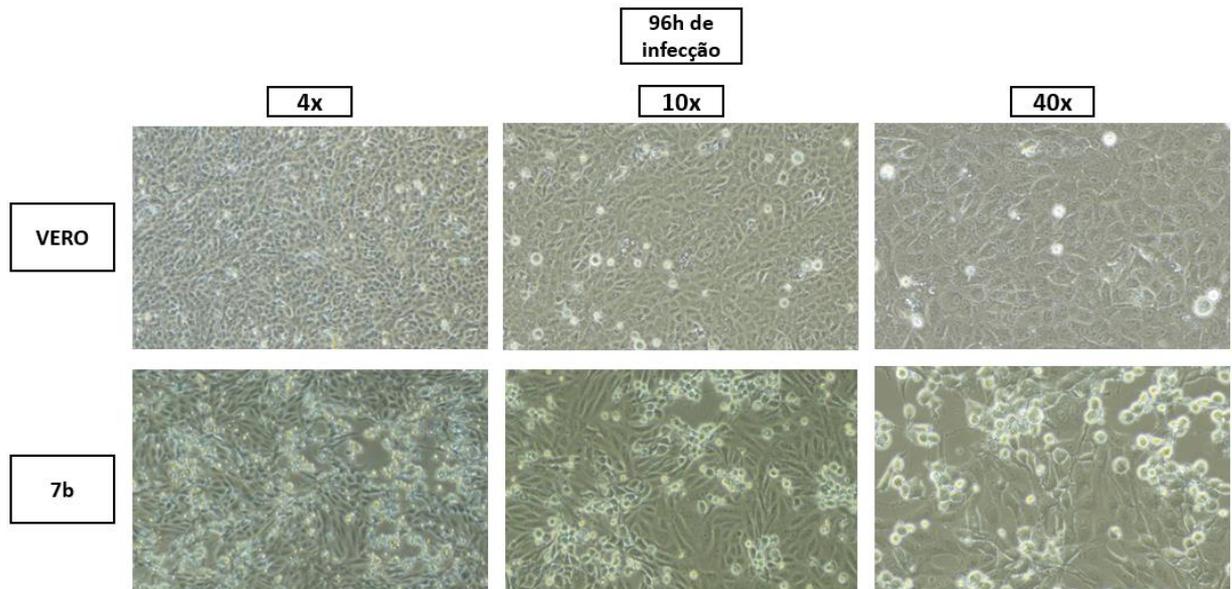


Figura 21. Ensaio de análise de replicação defectiva do vírus L.OPNE.L.ΔJ na linhagem Vero e 7b. Imagens obtidas em contraste de fase em aumento 4x, 10x e 40x após 96 horas de infecção na linhagem transcomplementar e na linhagem Vero.

## 5.2. Análise de funcionalidade de Flpe

A linhagem Vero foi plaqueada e após atingir 80% de confluência foi transfectada com pCMV:DsRED(FRT)GFP (**Figura 22A, 22C e 22E**). Concomitantemente também foi realizado a co-transfecção de pCAGGS-flpE-puro (**22B, 22D e 22F**). O resultado após 48 horas de transfecção é evidenciado na **Figura 22**. A taxa de transfecção obtida foi baixa, porém satisfatória para o teste proposto pois foi possível observar fluorescência verde somente na presença de flipase (**Figura 22F**), conforme esperado.

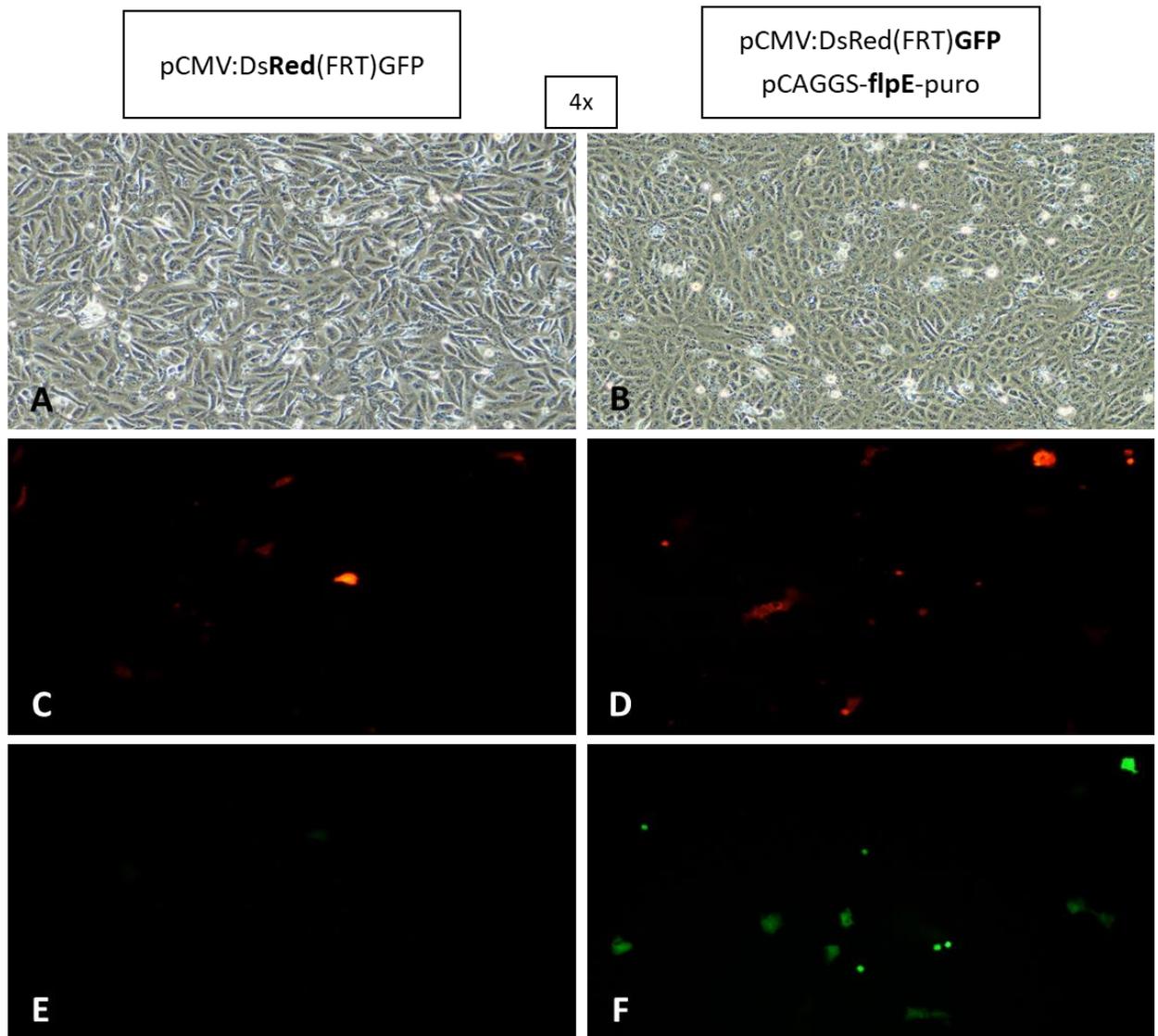


Figura 22. Co-transfecção com plasmídeo pCAGGS-flpE-puro e pCMV:DsRed(FRT)GFP em célula Vero. As figuras A e B apresentam o contraste de fase de ambas as linhagens. As figuras C e D foram obtidas através do filtro TRITC que permite a observação da fluorescência vermelha expressa pela presença de DsRed. As figuras E e F foram obtidas através do filtro FITC que permite a observação da fluorescência verde expressa pela presença de GFP.

### 5.2.1. Análise das regiões FRT a partir do sequenciamento de Sanger na presença de flipase

As análises das regiões FRT foram realizadas através do sequenciamento das regiões FRT formadas após recombinação sítio-específica mediada por Flipase e estão apresentadas com o eletroferograma, comparação da sequência esperada, sequenciamento da região com *primer forward* e *reverse* e as regiões FRT descritas por Gronostajskit e Sadowski<sup>57</sup> (Figura 23

e 24). Com os resultados a seguir é possível observar as regiões FRT que foram apresentadas na **Figura 15** e **Figura 16**, comprovando que a recombinação Flipase/FRT foi eficiente para gerar recombinação no nosso experimento.

As **Figuras 23A** e **23B** apresentam o eletroferograma do plasmídeo pGK.FRT mCherry com os *primers* 1 e 2, respectivamente. Posteriormente é apresentado a **Figura 23C** com a comparação entre a sequência ideal, bases descritas pelos sequenciamentos e a sequência FRT esperada.

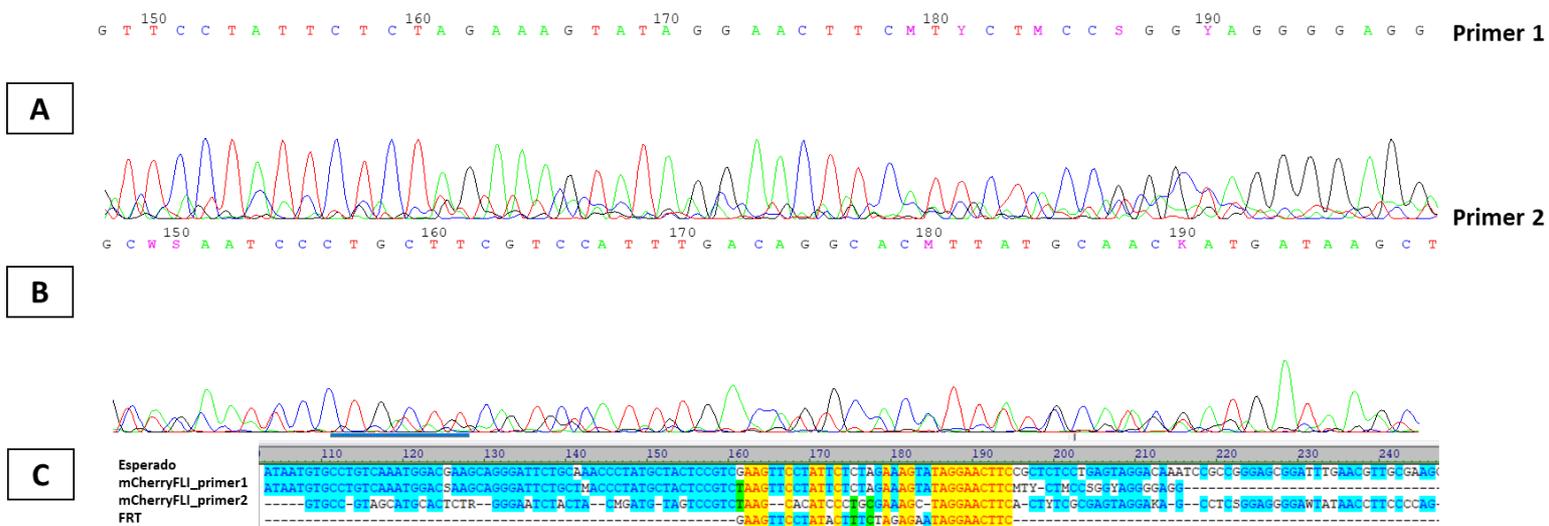
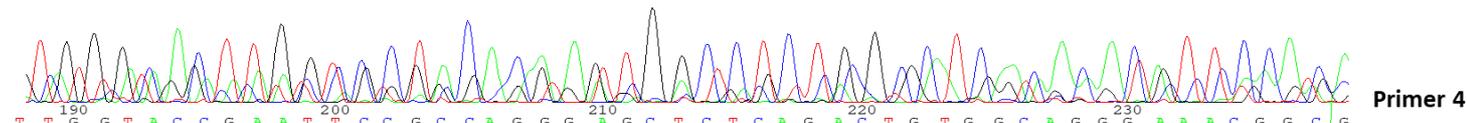


Figura 23. Sequenciamento com os *primers*, 1 e 2, no plasmídeo pGK.FRT mCherry na presença de Flpe. A Figura 23A apresenta o sequenciamento realizado com *primer* 1, a Figura 23B apresenta o sequenciamento com o *primer* 2 e Figura 23C foi obtida utilizando o *software* VectorNTI e evidencia a comparação das bases esperadas do sequenciamento, sequenciamento com primer 1, sequenciamento com primer 2 e região FRT.

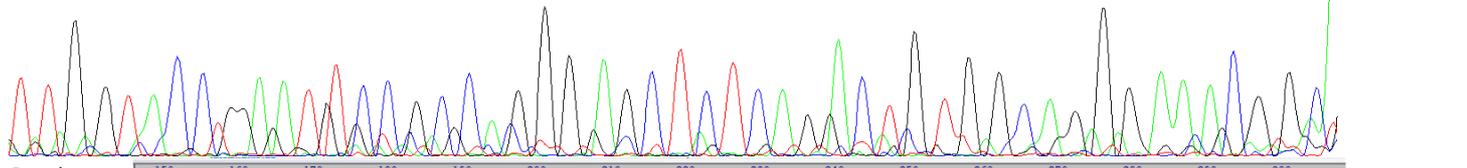
As **Figuras 24A** e **24B** apresentam os eletroferogramas do sequenciamento de Sanger com o plasmídeo pBS246.OPNE com os *primers*, 3 e 4, respectivamente. Posteriormente é apresentado a **Figura 24C** com a comparação entre a sequência ideal, bases descritas pelos sequenciamentos e a sequência FRT esperada.

C T G G G C A C T T G G T C C T A C A C A A G T G G C C T C T G G C T C A M A C A C R T T C C A C A Primer 3

**A**



**B**



**C**

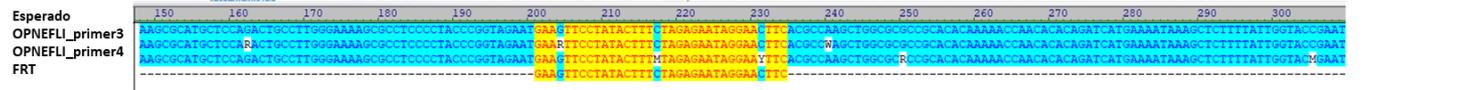


Figura 24. Sequenciamento com os *primers* 3 e 4 no plasmídeo pBS246.OPNE na presença de Flpe. A Figura 24A apresenta o sequenciamento realizado com *primer* 3, a Figura 24B apresenta o sequenciamento com o *primer* 4 e a Figura 24C foi obtida utilizando o *software* VectorNTI e mostra a comparação das bases esperada do sequenciamento, sequenciamento com *primer* 3, sequenciamento com *primer* 4 e região FRT.

### 5.3. Prova de conceito de clonagem de gene de interesse por recombinação sítio específica Flpe/FRT

A **Figura 25** evidencia o resultado da co-transfecção de pGK.FRT mCherry e pCAGGS-flpE na linhagem 7b infectada com L.OPNE.L.ΔJ após 96h de infecção à MOI 0,5. A placa de lise vermelha obtida confirma que o vírus recombinante L.OPNE.L.ΔJ. é capaz de integrar o transgene mCherry flanqueado por FRT através de recombinação mediada por flipase, representando, portanto, a prova de conceito de transgenia para o sistema.



Figura 25. Placa de lise mCherry positiva do vírus L.OPCE.L.ΔJ.. Esta placa de lise vermelha é resultado da recombinação Flp/FRT através da transfecção do plasmídeo pGK.FRT mCherry e do plasmídeo pCAGGS-flpE-puro na linhagem 7b infectada com L.OPNE.L.ΔJ. A imagem foi obtida utilizando microscopia de fluorescência para comprovar a prova de conceito da transgênia do vírus recombinante utilizado neste trabalho.

#### 5.4. Produção de vetor *amplicon*

A transfecção do plasmídeo pBS.185 na linhagem 7b infectada com L.OPNE.L.ΔJ. apresentou a formação de placas de lise e a expressão de EGFP (**Figura 26 e 27**). Observa-se ainda placas de lise uma vez que a taxa de sucesso da transfecção transiente não é 100%. No entanto, nas células que apresentaram a expressão de Cre houve a clivagem da sequência Lox presente no vírus L.OPNE.L.ΔJ fazendo com que expresse EGFP.

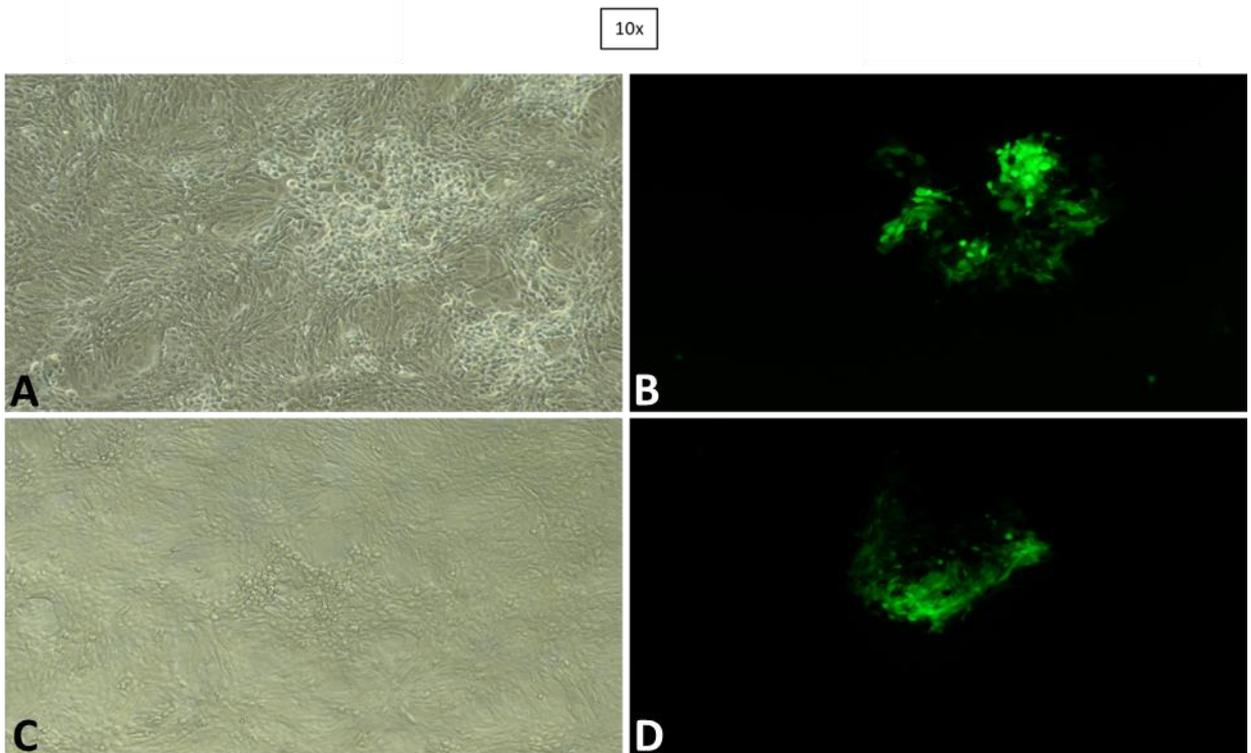


Figura 26. Análise qualitativa em microscópio de fluorescência de vetor *amplicon* na linhagem 7b transfectada (10x). Transfecção com pBS.185 na linhagem 7b infectadas com L.OPNE.L.ΔJ. As figuras 26A e 26C evidenciam as células em contraste de fase e as figuras 26B e 26D foram obtidas através do filtro FITC que permite a observação da fluorescência verde causada pela presença de EGFP. Aumento, 10X.

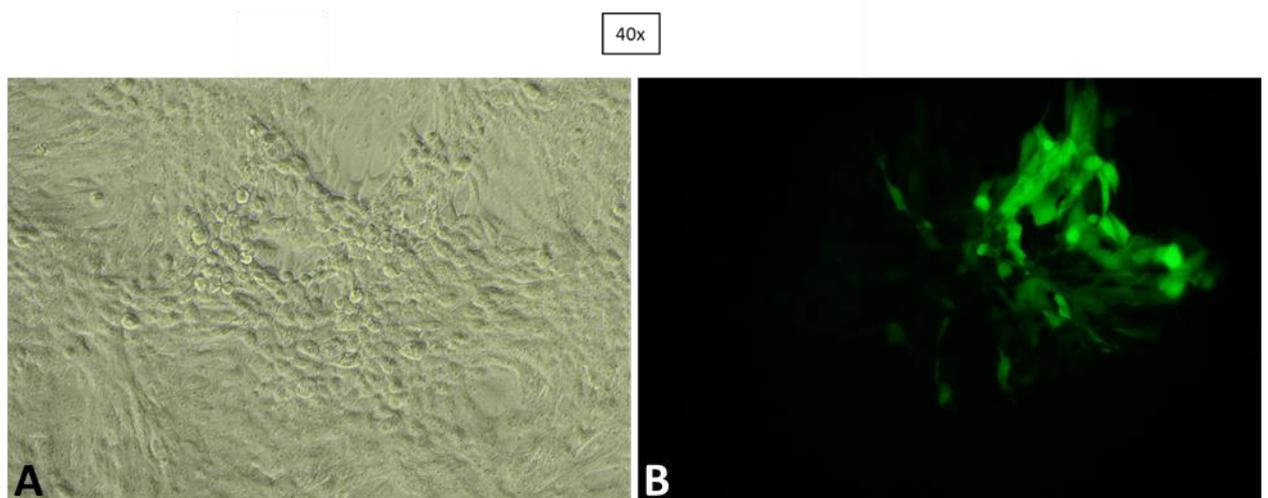


Figura 27. Análise qualitativa em microscópio de fluorescência da produção de vetor *amplicon* na linhagem 7b transfectada com pBS.185 e infectadas com L.OPNE.L.ΔJ. A figura 27A se encontra em contraste de fase e a figura 27B em FITC (fluorescência verde EGFP). Aumento, 40X.

#### 5.4.1. Transdução de vetor amplicon em linhagem celular

A **Figura 28** evidencia o resultado da transdução das partículas virais, recuperadas da linhagem 7b transfectada por Cre na linhagem Vero. Após 24 horas de transdução foi possível observar fluorescência verde nas figuras **28B** e **28D** (vetores *amplicons*) e ausência de efeito citopático nas figuras **28A** e **28C**.

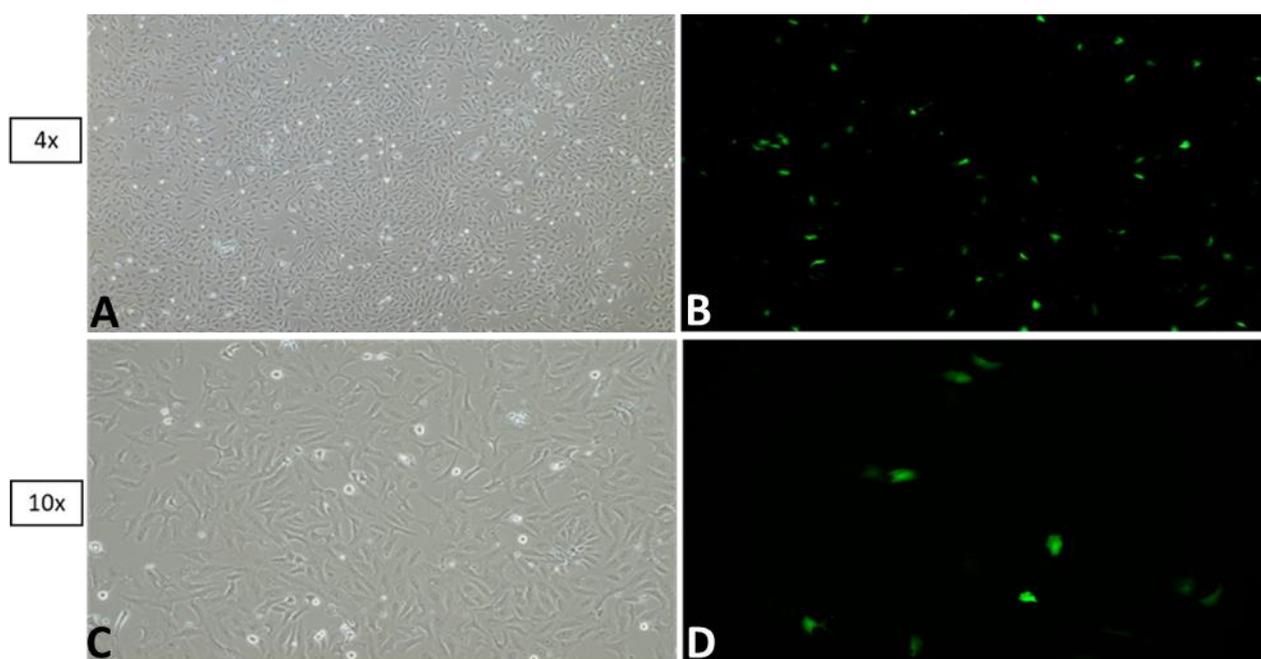


Figura 28. Análise qualitativa em microscópio de fluorescência da transdução de vetor *amplicon* na linhagem Vero. As figuras 28A e 28C evidenciam as células em contraste de fase nos aumentos de 4X e 10 X. As imagens 28B e 28D evidenciam as células visualizadas pelo filtro FITC que permite a observação da fluorescência verde causada pela presença de EGFP, presente nos vetores amplicons.

Também foi realizada a transdução dos vetores amplicons na linhagem tumoral A172 (**Figura 29**). As **Figuras 29A** e **29C** demonstraram a ausência de efeito citopático e células saudáveis em ambos os aumentos, 4x e 10x. A presença dos vetores amplicons são observados na **Figura 29B** e **29D**.

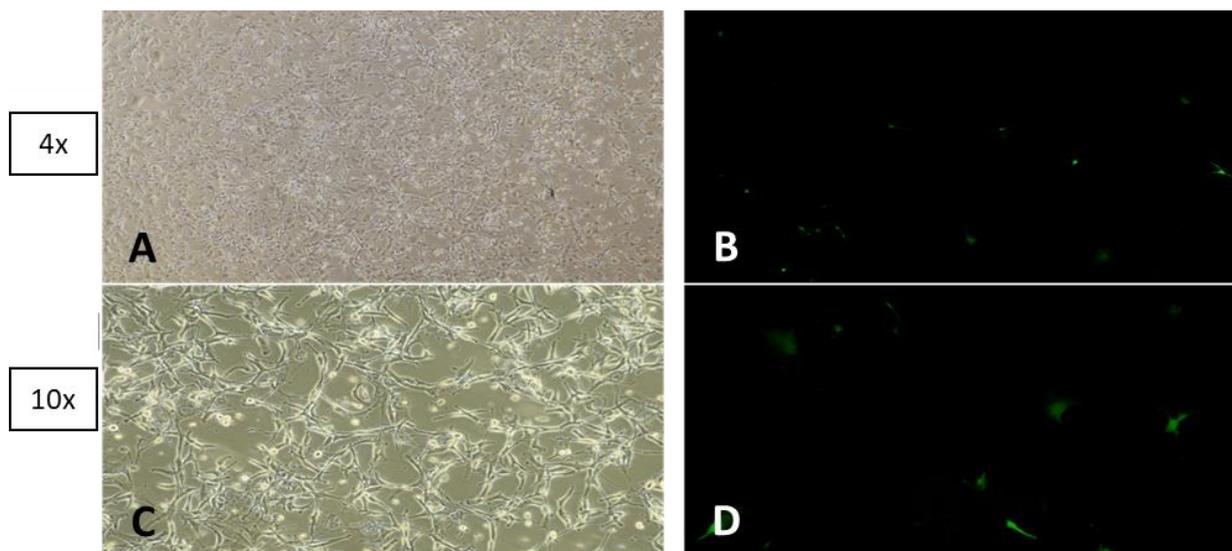


Figura 29. Análise qualitativa em microscópio de fluorescência da transdução de vetor *amplicon* na linhagem A172. As imagens, A e B evidenciam as células em contraste de fase e as imagens, B e D, foram visualizadas através do filtro FITC que permite a observação da fluorescência verde causada pela presença de amplicons.

#### 5.4.2. Titulação de vetor *amplicon* e vírus *helper*

Através da análise microscópica de fluorescência na placa de 12 poços transduzida anteriormente com o vetor *amplicon* obtivemos o resultado de  $2 \times 10^3$  TU/mL. As partículas *helper* apresentaram titulação de  $6,7 \times 10^4$  PFU/mL na linhagem 7b. Através deste resultado, temos a prova de conceito que o sistema proposto produz vetores *amplicons*, capazes de transduzir nas linhagens A172 e Vero, enquanto o vírus *helper* só é capaz infectar a linhagem transcomplementar 7b, que apresenta o gene ICP4.

## 6. DISCUSSÃO

Vetores amplicons são vetores virais defectivos, derivados do vírus HSV-1, que apresentam características únicas para serem utilizados em protocolos de transferência gênica. Dentre essas características podemos salientar: a alta capacidade de transgenia, podendo transportar até 150 kbp, habilidade de transduzir diversos tipos de linhagens celulares (podendo ser de mamíferos não humanos) e a flexibilidade de produção utilizando sistemas que derivam de vírus e BAC<sup>42, 63</sup>. Entretanto os sistemas atuais para sua produção necessitam de modificações para gerar uma grande quantidade de vetores que apresentem a ausência de contaminação do vírus *helper* ou auxiliar, necessário para sua produção e empacotamento<sup>64</sup>. Uma enorme quantidade de estudos abordam os vetores derivados do HSV-1 porém poucos investigam os vetores amplicons visando a melhoria do sistema, existindo atualmente dois principais sistemas de produção de vetores amplicon livres, ou virtualmente livres, de vírus *helper*<sup>65,44,66</sup>.

O estudo aqui proposto visa realizar a prova de conceito de produção de vetores mini-amplicon aptos para protocolos de transferência gênica utilizando recombinações sítio específicas Cre/lox e Flpe/FRT.

Neste projeto foram produzidos vetores mini-amplicons, que diferente dos vetores amplicons comuns, não contém origem de replicação bacteriana ou genes de resistência a antibióticos<sup>67</sup>. Os vetores mini-amplicons aqui desenvolvidos poderão apresentar uma capacidade de transgenia de até 40 kbp. Este valor é cerca de 25% da capacidade dos vetores amplicons clássicos (baseados em plasmídeos amplicon), porém continua sendo uma capacidade de transgenia importante em comparação à outros vetores virais, tais como os lentivírus ou adenovírus<sup>68,13</sup>.

A ausência de sequência bacteriana no plasmídeo amplicon confere ao vetor maior biossegurança e maior eficiência na expressão do transgene. Há estudos que demonstram que a ativação da resposta imune inata causada pela presença de material bacteriano promove o silenciamento do transgene<sup>68,69</sup>.

Os genes do vírus HSV-1 são divididos em genes essenciais e genes não essenciais<sup>39</sup>, podendo os genes não essenciais serem removidos uma vez que não irão afetar drasticamente sua capacidade de replicação em cultura celular<sup>22</sup>. A deleção de genes essenciais é utilizada

em protocolos de pesquisa para aumentar a biossegurança no manuseio deste vírus, tornando-o defeituoso e incapacitando a sua replicação. O vírus utilizado neste projeto possui replicação defeituosa, ou seja, somente possui capacidade de replicação em células trans-complementares (linhagem 7b) para o gene herpético essencial ICP4. Além da deleção do gene ICP4, o vírus HSV-1 helper usado neste projeto também possui deleção de ambas as cópias do gene ICP34.5, responsável pela neuro virulência presente no HSV-1 *wildtype*<sup>43</sup>.

A sistema de recombinação sítio específica Cre/lox, derivada do bacteriófago P1, que o nosso sistema utiliza é capaz de reconhecer e interagir com a sequência de 34 bp chamada de loxP<sup>54</sup>, localizadas adjacentes ao módulo amplicon no vírus L.OPNE.LΔJ. Dessa maneira, a enzima Cre recombinase se mostrou eficaz na clivagem do módulo amplicon após infecção em células 7b transfectadas com plasmídeo de expressão Cre. Esta clivagem pode ser observada por microscopia de fluorescência (células EGFP positivas) nas células empacotadoras 7b, e na subsequente reinfecção da produção de vetores mini-amplicon em células Vero e A172. Há diversos estudos utilizando Cre/lox na produção de vetores virais e o presente estudo corrobora com a literatura<sup>70-76</sup>.

Outra enzima de recombinação sítio-específica utilizada neste projeto é a flipase (Flp), que reconhece as sequências FRT da levedura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>77</sup>. Esta recombinação permite que a recombinase Flipase reconheça os sítios FRT e gere os produtos da recombinação sítio-específica<sup>56, 57</sup>. A forma selvagem da Flp é capaz de gerar uma eficiente recombinação em temperaturas abaixo de 30 °C<sup>78</sup> e neste trabalho utilizamos a Flpe, forma modificada onde é possível sua função estável em temperatura de 37 à 42 °C. Esta recombinação em temperatura de 37 °C foi observada através da co-transfecção do plasmídeo pGK.FRT mCherry com pCAGGS-flpE-puro em linhagem Vero e 7b. Para tal, após a co-transfecção desses 2 plasmídeos, realizamos a extração de DNA total dessas células e sequenciamos (sequenciamento capilar) as regiões adjacentes aos sítios FRT envolvidos na recombinação sítio-específica, corroborando assim a correta clivagem dos vetores envolvidos. Essa confirmação foi essencial para o progresso do projeto, dado que o locus FRT servirá para a incorporação dos transgenes que serão carregados pelos vetores mini-amplicon do sistema.

A utilização de recombinação Flipase/FRT para a inserção de transgene em vetores virais foi utilizada por Carrondo e colaboradores em transdução de partículas virais de retrovírus<sup>79</sup>, porém não há estudos com vetores derivados do HSV-1 na literatura. Este projeto

apresenta uma inovação na utilização desta técnica com HSV-1 e conseqüentemente com vetores amplicons.

Uma das principais vantagens do vetor amplicon é a sua alta capacidade de transgenia, podendo variar de 30 kb até 150 kb, dependendo do modo de produção<sup>25,66</sup>. O vetor proposto neste projeto demonstrou a capacidade de integrar um transgene de aproximadamente 1600 pb através da prova de conceito ao utilizar o gene mCherry flanqueado por sequências FRT. Esta prova de conceito demonstrada pela formação de placa de lise vermelha nos mostra que o vírus é capaz de integrar genes flanqueados por FRT através da recombinação mediada por flipase, método que facilita manipulação e inserção de transgenes.

Em estudo recente para produção de vetor amplicon desenvolvido por Soukupová e colaboradores<sup>65</sup>, os pesquisadores utilizaram o vírus LaΔJ como *helper* na produção dos vetores com um plasmídeo amplicon que apresentava o transgene de interesse do estudo. O vírus utilizado no presente projeto se faz como uma alternativa para a produção destes vetores através da facilitação na inserção de transgene utilizando a recombinação sítio específica Flp/FRT em cultura.

Foi utilizado o método de transfecção transiente para produção de vetores amplicons utilizando o reagente Lipofectamina3000 (*ThermoFisher*). Mesmo sendo um método robusto, não foi suficiente para gerar uma clivagem total. Estima-se cerca de 30-50% de eficiência de transfecção na linhagem Vero<sup>80</sup>, mas como utilizamos uma linhagem geneticamente modificada notamos que a eficiência foi menor do que o esperado. Com esta eficiência da transfecção não foi possível realizar uma recombinação Cre/lox com todas as partículas virais na linhagem transfectada com o plasmídeo pBS185, resultando na formação de placas de lise após a produção de vetores amplicons. Este mesmo limitante na eficiência de transfecção esteve também presente na produção da placa de lise vermelha (nesse caso a transfecção do plasmídeo pCAGGS-flpE-puro que expressa a recombinase flipase). Por esse motivo, para a publicação em revista de altíssimo impacto, estabeleceremos novas linhagens derivadas de 7b que expressem as recombinase Cre e Flipase de maneira estável, e assim melhorar a produção e purificação do sistema.

Os métodos atuais de produção de amplicon utilizam o vírus *helper* LaΔJ ou BAC-HSV1, como mencionado anteriormente. O método viral produz  $2 \times 10^8$  TU/mL de amplicons com contaminação de aproximadamente 1% pelo *helper*<sup>67</sup>. A produção derivada de BAC

produz  $10^7$  TU/mL. Ambos os métodos necessitam de aprimoramento uma vez que o método viral apresenta contaminação e o derivado de BAC faz uso da transfecção. Nos estimamos que a produção de vetores amplicons na linhagem 7b+Cre seja acima de  $10^6$  -  $10^7$  TU/mL com ausência de contaminação pelo vírus *helper*.

O nosso método apresenta baixa produção de amplicons e ainda há contaminação pelo *helper*. Esperamos resolver este problema através das linhagens estáveis que serão construídas. Além disso, uma das maiores dificuldades na seleção dos amplicons após a produção é o *screening*, pois os vetores amplicons são idênticos a partículas virais produzidas pelo *helper*. O sistema proposto neste trabalho apresenta uma facilidade inédita na separação do amplicon e do vírus *helper*, através da fluorescência verde, resultado da aproximação do promotor IE4/5 com o gene EGFP presente no amplicon.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho nos permitem concluir:

- O sistema proposto com o vírus *helper* L.OPNE.L.ΔJ. produz vetores *amplicons* na presença de Cre recombinase;
- A recombinação mediada por Flpe é eficiente em nosso vírus *helper* para a inserção de transgene de interesse;
- O vírus L.OPNE.L.ΔJ. é defectivo e somente infecta células trans-complementares;
- Novos ensaios com outros transgenes flanqueados por FRT são necessários para avaliar o efeito terapêutico do vetor *in vitro*;
- Faz-se necessário o estabelecimento de uma linhagem celular com a expressão estável de Cre recombinase para a eliminação da presença de placas de lise na produção de vetores amplicons e uma linhagem com expressão estável de Flipase para facilitação na inserção de transgene.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beyer Nardi, N., Karam Teixeira, L. A., and Ávila Da Silva, E. F. Terapia gênica Gene therapy.
2. Gonçalves, G. A. R. and Paiva, R. de M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**. vol. 15, no. 3. pp. 369–375. Jul. 2017. doi: 10.1590/S1679-45082017RB4024.
3. Hidai, C. and Kitano, H. diseases Nonviral Gene Therapy for Cancer: A Review. doi: 10.3390/diseases6030057.
4. Flotte, T. R. *et al.* The Gene Therapy Resource Program: A Decade of Dedication to Translational Research by the National Heart, Lung, and Blood Institute, **Human Gene Therapy Clinical Development**, vol. 28, no. 4. Mary Ann Liebert Inc., pp. 178–186, Dec. 01, 2017, doi: 10.1089/humc.2017.170.
5. Wirth, T., Parker, N., and Ylä-Herttua, S. History of gene therapy. **Gene**. vol. 525, no. 2. 2013. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.137.
6. Alloway, J. L. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by the use of filtered pneumococcus extracts. **Journal of Experimental Medicine**. vol. 55, no. 1. 1932. doi: 10.1084/jem.55.1.91.
7. Tatum, E. L. and Lederberg, J. Gene Recombination in the Bacterium Escherichia coli. **Journal of bacteriology**. vol. 53, no. 6. 1947. doi: 10.1128/jb.53.6.673-684.1947.
8. Rogers, S. and Pfuderer, P. Use of viruses as carriers of added genetic information [33], **Nature**, vol. 219, no. 5155. 1968, doi: 10.1038/219749a0.
9. Rosenberg, S. A. *et al.* Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. **The New England journal of medicine**. vol. 323, no. 9. pp. 570–578. Aug. 1990. doi: 10.1056/NEJM199008303230904.
10. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M., and Abedi, M. R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. 2018. doi: 10.1002/jgm.3015.
11. Friedmann, T. A brief history of gene therapy, **Nature Genetics**, vol. 2, no. 2. 1992, doi: 10.1038/ng1092-93.
12. Oliveira, B. de A., França, E. dos S., Souza, V. G., Vallinoto, A. C. R., and Silva, A. N. M. R. da. Vetores virais para uso em terapia gênica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. vol. 9, no. 2. pp. 55–64. 2018. doi: 10.5123/s2176-62232018000200008.
13. Chen, Y. H., Keiser, M. S., and Davidson, B. L. Viral Vectors for Gene Transfer. **Current protocols in mouse biology**. vol. 8, no. 4. p. e58. Dec. 2018. doi: 10.1002/CPMO.58.
14. Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. **NEW MICROBIOLOGICA**. vol. 36. pp. 1–22. 2013. Accessed: May 16, 2022. [Online]. Available: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical).
15. Guo, J., Mondal, M., and Zhou, D. Development of novel vaccine vectors: Chimpanzee adenoviral vectors. **Human vaccines & immunotherapeutics**. vol. 14, no. 7. pp. 1679–1685. Jul. 2018. doi: 10.1080/21645515.2017.1419108.
16. Crystal, R. G. Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. **Human Gene Therapy**. vol. 25, no. 1. p. 3. Jan. 2014. doi: 10.1089/HUM.2013.2527.
17. Roy-Chowdhury, J. and Horwitz, M. S. Evolution of Adenoviruses as Gene Therapy

- Vectors. **Molecular Therapy**. vol. 5, no. 4. pp. 340–344. Apr. 2002. doi: 10.1006/MTHE.2001.0575.
18. S Seregin, S. and Amalfitano, A. Overcoming pre-existing adenovirus immunity by genetic engineering of adenovirus-based vectors. <http://dx.doi.org/10.1517/14712590903307388>. vol. 9, no. 12. pp. 1521–1531. Dec. 2009. doi: 10.1517/14712590903307388.
  19. Keeler, A. M., ElMallah, M. K., and Flotte, T. R. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. **Clinical and translational science**. vol. 10, no. 4. pp. 242–248. Jul. 2017. doi: 10.1111/CTS.12466.
  20. Nardi, N. B., Teixeira, L. A. K., and Silva, E. F. Á. da. Terapia gênica. **Ciência & Saúde Coletiva**. vol. 7, no. 1. pp. 109–116. 2002. doi: 10.1590/S1413-81232002000100010.
  21. Kurian, K. M., Watson, C. J., and Wyllie, A. H. Retroviral vectors. **Molecular Pathology**. vol. 53, no. 4. p. 173. 2000. doi: 10.1136/MP.53.4.173.
  22. Lachmann, R. H. Herpes simplex virus-based vectors, **International Journal of Experimental Pathology**. 2004, doi: 10.1111/j.0959-9673.2004.00383.x.
  23. de Silva, S. and Bowers, W. J. Herpes virus amplicon vectors, **Viruses**. 2009, doi: 10.3390/v1030594.
  24. Epstein, A. L. HSV-1-based amplicon vectors: Design and applications. **Gene Therapy**. 2005. doi: 10.1038/sj.gt.3302617.
  25. Laimbacher, A. S. and Fraefel, C. Gene delivery using helper virus-free HSV-1 amplicon vectors. **Current Protocols in Neuroscience**. 2012. doi: 10.1002/0471142301.ns0414s60.
  26. Geller, M. *et al.* Herpes simples: Atualização clínica, epidemiológica e terapêutica, 2013. doi: 10.5533/dst-2177-8264-201224408.
  27. Smith, S., Reuven, N., Mohni, K. N., Schumacher, A. J., and Weller, S. K. Structure of the Herpes Simplex Virus 1 Genome: Manipulation of Nicks and Gaps Can Abrogate Infectivity and Alter the Cellular DNA Damage Response. **Journal of Virology**. vol. 88, no. 17. pp. 10146–10156. 2014. doi: 10.1128/jvi.01723-14.
  28. Elbadawy, H. M., Gailledrat, M., Desseaux, C., Ponzin, D., and Ferrari, S. Targeting herpetic keratitis by gene therapy. **Journal of Ophthalmology**. vol. 2012. 2012. doi: 10.1155/2012/594869.
  29. Reske, A., Pollara, G., Krummenacher, C., Chain, B. M., and Katz, D. R. Understanding HSV-I entry glycoproteins. **Reviews in Medical Virology**. vol. 17, no. 3. pp. 205–215. 2007. doi: 10.1002/rmv.531.
  30. Bataille, D. and Epstein, A. L. Herpes simplex virus type 1 replication and recombination. **Biochimie**. 1995. doi: 10.1016/0300-9084(96)88197-1.
  31. Rixon, F. J. *et al.* Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. **Journal of General Virology**. 1996. doi: 10.1099/0022-1317-77-9-2251.
  32. Vittone, V. *et al.* Determination of Interactions between Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1. **Journal of Virology**. 2005. doi: 10.1128/jvi.79.15.9566-9571.2005.
  33. Kelly, B. J., Fraefel, C., Cunningham, A. L., and Diefenbach, R. J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1, **Virus Research**. 2009, doi: 10.1016/j.virusres.2009.07.007.
  34. Perry, L. J. and McGeoch, D. J. The DNA sequences of the long repeat region and

- adjoining parts of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. **Journal of General Virology**. 1988. doi: 10.1099/0022-1317-69-11-2831.
35. Vlazny, D. A. and Frenkel, N. Replication of herpes simplex virus DNA: Localization of replication recognition signals within defective virus genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1981. doi: 10.1073/pnas.78.2.742.
  36. Akhtar, J. and Shukla, D. Viral entry mechanisms: Cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry, **FEBS Journal**. 2009, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x.
  37. Gong, Y. *et al.* Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. **Antiviral Research**. 2002. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00054-2.
  38. Margolis, D. M., Rabson, A. B., Straus, S. E., and Ostrove, J. M. Transactivation of the HIV-1 LTR by HSV-1 immediate-early genes. **Virology**. 1992. doi: 10.1016/0042-6822(92)90048-T.
  39. Roizman, B. The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1996. doi: 10.1073/pnas.93.21.11307.
  40. Chan, D. Y., Moralli, D., Wheatley, L., Jankowska, J. D., and Monaco, Z. L. Multigene human artificial chromosome vector delivery with herpes simplex virus 1 amplicons. **Experimental Cell Research**. 2020. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111840.
  41. Samaniego, L. A., Neiderhiser, L., and DeLuca, N. A. Persistence and Expression of the Herpes Simplex Virus Genome in the Absence of Immediate-Early Proteins. **Journal of Virology**. 1998. doi: 10.1128/jvi.72.4.3307-3320.1998.
  42. Melendez, M. E., Fraefel, C., and Epstein, A. L. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-derived amplicon vectors. **Methods in Molecular Biology**. 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0428-0\_6.
  43. Zaupa, C., Revol-Guyot, V., and Epstein, A. L. Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. **Human Gene Therapy**. 2003. doi: 10.1089/104303403322124774.
  44. Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X. O., and Chiocca, E. A. Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome. **Molecular Therapy**. 2001. doi: 10.1006/mthe.2001.0294.
  45. Logvinoff, C. and Epstein, A. L. A novel approach for herpes simplex virus type 1 amplicon vector production, using the Cre-loxP recombination system to remove helper virus. **Human Gene Therapy**. 2001. doi: 10.1089/104303401750061221.
  46. Zhang, Z. and Lutz, B. Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. **Nucleic acids research**. 2002. doi: 10.1093/nar/gnf089.
  47. Sun, M. *et al.* Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**. 2005. doi: 10.1016/j.brainres.2005.05.072.
  48. Reinblatt, M., Pin, R. H., Bowers, W. J., Federoff, H. J., and Fong, Y. Herpes simplex virus amplicon delivery of a hypoxia-inducible soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlk-1) inhibits angiogenesis and tumor growth in pancreatic

- adenocarcinoma. **Annals of Surgical Oncology**. 2005. doi: 10.1245/ASO.2005.03.081.
49. Lavin, M. F. and Shiloh, Y. The genetic defect in ataxia-telangiectasia, **Annual Review of Immunology**. 1997, doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.177.
  50. Toda, M., Martuza, R. L., and Rabkin, S. D. Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte - Macrophage colony-stimulating factor. **Molecular Therapy**. 2000. doi: 10.1006/mthe.2000.0130.
  51. Hocknell, P. K. *et al.* Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 from Herpes Simplex Virus Type 1-Derived Amplicons Results in Potent, Specific, and Durable Cellular and Humoral Immune Responses. **Journal of Virology**. 2002. doi: 10.1128/jvi.76.11.5565-5580.2002.
  52. Kaplitt, M. G. *et al.* Preproenkephalin promoter yields region-specific and long-term expression in adult brain after direct in vivo gene transfer via a defective herpes simplex viral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1994. doi: 10.1073/pnas.91.19.8979.
  53. Grindley, N. D. F., Whiteson, K. L., and Rice, P. A. Mechanisms of site-specific recombination, **Annual Review of Biochemistry**, vol. 75. 2006, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908.
  54. Araki, K., Okada, Y., Araki, M., and Yamamura, K. I. Comparative analysis of right element mutant lox sites on recombination efficiency in embryonic stem cells. **BMC Biotechnology**. 2010. doi: 10.1186/1472-6750-10-29.
  55. Li, J., Li, Y., Pawlik, K. M., Napierala, J. S., and Napierala, M. A CRISPR-Cas9, Crelox, and Flp-FRT Cascade Strategy for the Precise and Efficient Integration of Exogenous DNA into Cellular Genomes. **CRISPR Journal**. 2020. doi: 10.1089/crispr.2020.0042.
  56. Radhakrishnan, P. and Srivastava, V. Utility of the FLP-FRT recombination system for genetic manipulation of rice. **Plant Cell Reports**. 2005. doi: 10.1007/s00299-004-0876-x.
  57. Park, Y. N., Masison, D., Eisenberg, E., and Greene, L. E. Application of the FLP/FRT system for conditional gene deletion in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. 2011. doi: 10.1002/yea.1895.
  58. Muratoglu, M. Flp recombinase. **Registry of Standard Biological**. 2018. [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K2560271](http://parts.igem.org/Part:BBa_K2560271) (accessed Aug. 12, 2021).
  59. Carrozza, M. J. and DeLuca, N. A. Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. **Molecular and Cellular Biology**. 1996. doi: 10.1128/mcb.16.6.3085.
  60. Seyffert, M. *et al.* The hsv-1 transcription factor icp4 confers liquid-like properties to viral replication compartments. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021. doi: 10.3390/ijms22094447.
  61. Liu, B. L. *et al.* ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. **Gene Therapy**. vol. 10, no. 4. pp. 292–303. 2003. doi: 10.1038/sj.gt.3301885.
  62. Cheng, G., Brett, M.-E., and He, B. Signals That Dictate Nuclear, Nucleolar, and Cytoplasmic Shuttling of the  $\gamma$  1 34.5 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. **Journal of Virology**. 2002. doi: 10.1128/jvi.76.18.9434-9445.2002.
  63. Epstein, A. L. HSV-1-based amplicon vectors: design and applications. **Gene Therapy** **2005 12:1**. vol. 12, no. 1. pp. S154–S158. Oct. 2005. doi: 10.1038/sj.gt.3302617.

64. Melendez, M. E., Fraefel, C., and Epstein, A. L. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-derived amplicon vectors. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. vol. 1144. pp. 81–98. 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-0428-0\_6.
65. Soukupová, M. *et al.* Improvement of HSV-1 based amplicon vectors for a safe and long-lasting gene therapy in non-replicating cells. **Molecular therapy. Methods & clinical development**. vol. 21. pp. 399–412. Jun. 2021. doi: 10.1016/J.OMTM.2021.03.020.
66. Epstein, A. L. HSV-1-based amplicon vectors: design and applications. **Gene therapy**. vol. 12 Suppl 1. pp. S154–S158. 2005. doi: 10.1038/SJ.GT.3302617.
67. Epstein, A. L. HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties-A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. vol. 104, no. 3. pp. 399–410. 2009.
68. Suzuki, M., Kasai, K., and Saeki, Y. Plasmid DNA Sequences Present in Conventional Herpes Simplex Virus Amplicon Vectors Cause Rapid Transgene Silencing by Forming Inactive Chromatin. **Journal of Virology**. vol. 80, no. 7. pp. 3293–3300. Apr. 2006. doi: 10.1128/JVI.80.7.3293-3300.2006.
69. De Silva, S. and Bowers, W. J. Herpes Virus Amplicon Vectors. **Viruses**. vol. 1. pp. 594–629. 2009. doi: 10.3390/v1030594.
70. Lieber, A., He, C. Y., Kirillova, I., and Kay, M. A. Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo. **Journal of Virology**. vol. 70, no. 12. 1996. doi: 10.1128/jvi.70.12.8944-8960.1996.
71. Choulika, A., Guyot, V., and Nicolas, J. F. Transfer of single gene-containing long terminal repeats into the genome of mammalian cells by a retroviral vector carrying the cre gene and the loxP site. **Journal of Virology**. vol. 70, no. 3. 1996. doi: 10.1128/jvi.70.3.1792-1798.1996.
72. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., and Phipps, M. L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. **Journal of virology**. vol. 71, no. 3. pp. 1842–1849. Mar. 1997. doi: 10.1128/JVI.71.3.1842-1849.1997.
73. Tashiro, F., Niwa, H., and Miyazaki, J. I. Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system. **Human Gene Therapy**. vol. 10, no. 11. pp. 1845–1852. Jul. 1999. doi: 10.1089/10430349950017527.
74. Rezai Amin, S. *et al.* Viral vector-mediated Cre recombinase expression in substantia nigra induces lesions of the nigrostriatal pathway associated with perturbations of dopamine-related behaviors and hallmarks of programmed cell death. **Journal of neurochemistry**. vol. 150, no. 3. pp. 330–340. Aug. 2019. doi: 10.1111/JNC.14684.
75. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y., and Phipps, M. L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. **Journal of Virology**. vol. 71, no. 3. 1997. doi: 10.1128/jvi.71.3.1842-1849.1997.
76. Kimura, T. *et al.* Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications. **Scientific reports**. vol. 9, no. 1. Dec. 2019. doi: 10.1038/S41598-019-49624-W.
77. Schweizer, H. P. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP-FRT system in bacterial genetics. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**. vol. 5, no. 2. pp. 67–77. 2003. doi: 10.1159/000069976.
78. Gronostajskit, R. M. *et al.* The FLP Recombinase of the *Saccharomyces cerevisiae* 2pLm

- Plasmid Attaches Covalently to DNA via a Phosphotyrosyl Linkage Preparation of FLP. FLP protein was purified from *Escherichia coli* JM103 harboring the plasmid pDV64 as described previously (23. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**. vol. 5, no. 11. pp. 3274–3279. 1985.
79. Carrondo, M. J. T., Merten, O. W., Haury, M., Alves, P. M., and Coroadinha, A. S. Impact of retroviral vector components stoichiometry on packaging cell lines: Effects on productivity and vector quality. **Human Gene Therapy**. vol. 19, no. 2. 2008. doi: 10.1089/hum.2007.0101.
  80. Lipofectamine 3000 Reagent | Thermo Fisher Scientific - BR. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-3000.html> (accessed Apr. 12, 2022).