

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**A técnica *pro-drug* combinando o adHSVtk e a droga GCV  
como uma estratégia de terapia gênica**

Daniela Bicalho Vargas

Fabyola Andrade

Lílian Praes

Marina Batista

Thiago Vitarelli

Apresentado como pré-requisito parcial  
para avaliação na disciplina Biologia  
Molecular.

Belo Horizonte, Dezembro de 2007

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>3</b>
<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>II – JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>8</b>
<b>III – OBJETIVO.....</b>	<b>8</b>
<b>IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>IV.1 – Cultivo de células.....</b>	<b>9</b>
<b>IV.2 – Montagem do vírus recombinante.....</b>	<b>9</b>
<b>IV.3 – Infecção.....</b>	<b>11</b>
<b>IV.4 – Western Blotting.....</b>	<b>12</b>
<b>IV.5 – FACS.....</b>	<b>13</b>
<b>IV.6 - Microarranjo .....</b>	<b>14</b>
<b>V – CRONOGRAMA.....</b>	<b>15</b>
<b>VI – ORÇAMENTO.....</b>	<b>16</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>17</b>

## Resumo

Um adenovírus atenuado – dl 1520 (ONYX-015) – que perde o gene E1B-55K e passa a conter o gene HSVtk, sob controle transcricional do promotor CAG, será construído. Este vetor será propagado em células HEK 293, e em seguida purificado e estocado. As linhagens celulares de interesse serão infectadas e tratadas ou não com a droga ganciclovir. Após extração de proteínas será realizado *western blotting*, em seguida FACS e então microarranjo, para que se possa verificar a eficácia desta estratégia de terapia gênica.

## I – Introdução

Na Coréia, nos últimos anos, os tumores malignos têm sido a principal causa de óbito (7). Em 2005, a Sociedade Americana do Câncer estimou que os números de novos casos da doença nos Estados Unidos seriam de aproximadamente 1.372.910 e, dentre esses enfermos, por volta de 570.280 morreriam pela doença (7). Esses dados alarmantes são exemplos que demonstram a necessidade de se investir no aprimoramento e desenvolvimento de novos tratamentos além dos métodos convencionais: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Tais métodos são formas comuns de metástase e possuem efeitos agressivos sob os pacientes e ao mesmo tempo não apresentam taxa satisfatória geral de sobrevivência, o que gera dúvidas a respeito desses procedimentos e maior interesse nas terapias alternativas, com destaque especial sob a terapia gênica viral (1).

A terapia gênica que utiliza vírus para combater tumores é uma promissora intervenção médica – uma vez que testada em experimentos prévios e aprovada – que age em diversos tipos de câncer através da manipulação genética das células em questão e/ou do vírus administrado, podendo agir diretamente ou indiretamente no ataque ao câncer.

Na abordagem direta o vírus induzirá a apoptose por manipulação da expressão de genes, que são relevantes para o ciclo de vida celular, e que, uma vez influenciados, forçarão a morte da célula por agentes citotóxicos (5). Esse método necessita de alta eficiência no que diz respeito à transferência de genes e controle na expressão dos mesmos nas células alvos (5). Razão por que podemos ressaltar outra importante característica dessa terapia: explorar a manipulação genética dos vírus usados para “criar” ou enfatizar o tropismo desses microrganismos às células tumorais em detrimento das células normais; mais informações sobre como esse processo seletivo se dá e as suas causas serão exploradas adiante.

Na estratégia indireta, por sua vez, o vírus regulará o crescimento do tumor, o que inclui a supressão da angiogênese e a ativação do sistema imune, que será atraído pelos antígenos virais, logo estes servirão como “*tags*” nas células tumorais, que por muitas vezes passam despercebidas pelo sistema de proteção do organismo (o tropismo também é essencial nessa abordagem indireta) (5).

Devem-se enfatizar essas vantajosas características da terapia gênica viral em relação aos métodos tradicionais, uma vez que ela não é apenas específica para as células tumorais, como também possui a capacidade de estimular o sistema imune do organismo, aumentando muito mais a taxa de sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes do que, por exemplo, a quimioterapia, que suprime esse sistema e causa efeitos muito nocivos aos doentes (1).

A noção de que os vírus poderiam ser utilizados como uma arma biológica contra o câncer surgiu desde o início do século XX. Muitos experimentos envolvendo esses microrganismos foram realizados durante os anos 50 e 60 (1). Os adenovírus, que são os vetores foco do nosso trabalho, foram um dos primeiros a serem estudados. Eles foram isolados, em 1953, de amostras de tecidos da adenóide em culturas que sofriam regressão espontânea (1). Desde então esses vírus foram extensivamente estudados, e durante alguns anos tiveram grandes impactos como nova e promissora modalidade de tratamento ao câncer (1). Contudo, essa terapia não obteve resultados tão significativos, além de apresentar alguns efeitos colaterais, o que levou ao declínio das pesquisas na área por algum tempo. Mais tarde, nos anos 90, com o advento da biotecnologia nos campos da bioquímica, biologia molecular, genética e microbiologia, essa intervenção terapêutica ganhou mais uma vez a atenção dos meios científico e médico reiniciando com firmeza novas pesquisas envolvendo também diversos vírus com potencial oncolítico, a saber: Herpesvírus, Polymavírus, Poxvírus, Parvovírus, Reovírus, Orthomyxovírus, Paramyxovírus, Rhabdovírus, Coronavírus, Picornavírus, Togavírus, Retrovírus e os Adenovírus (1).

Recentemente, intensos estudos continuam sendo realizados sobre a viroterapia, que tem demonstrado ser uma boa opção de tratamento contra o câncer em conjunto às intervenções tradicionais (1). E em consequência de seus resultados satisfatórios vários progressos já foram conquistados, como em 2003, quando o primeiro produto de terapia gênica a ser aprovado para venda em qualquer parte do mundo foi licenciado na China – no caso um adenovírus (6). Mais de 3000 pacientes no mundo todo já foram tratados em testes clínicos com a terapia gênica viral, e esse número tende a crescer muito mais à medida que se aprofunda o conhecimento sobre a biologia dos vetores usados e as células tumorais e aumenta a habilidade de reconstruir mais precisamente as interações vírus-hospedeiro (6).

Todo esse histórico de pesquisas e crescente interesse se devem ao fato de os vírus oncolíticos utilizados nessas abordagens de terapia alternativa possuírem um tropismo específico para as células cancerígenas, provocando o menor dano possível para os tecidos vizinhos saudáveis e suas respectivas células. Surge então o conceito de vírus oncolíticos, aqueles que se propagam seletivamente em tecidos tumorais destruindo-os ou provocando uma resposta imune anti-tumoral (3). Esse tropismo preferencial dos vírus baseia-se em certas características das células cancerígenas, que se desenvolveram devido a uma mini-evolução envolvendo desde muitas mutações pontuais até grandes mudanças em cromossomos, as quais lhes conferiram vantagens no processo de manutenção da replicação independente de controles e estímulos internos e externos, ao contrário do que ocorre em células normais (1).

Os mecanismos de seletividade para a diferenciação do vírus entre uma célula normal e outra tumoral podem ocorrer de várias formas, como esquematizado na fig.1 (3). A primeira forma de fazer esse direcionamento é colocando um gene essencial para a replicação viral sob o controle de um promotor específico de uma célula cancerígena (fig.1a).

Apesar das células anormais terem ganhado atributos que enfatizam seu crescimento, elas simultaneamente perderam componentes críticos dos mecanismos de defesa intracelular, logo se tornaram campo fértil para a replicação de vários vírus (1). A partir desse fato ocorre a segunda forma de tropismo, que se baseia na supressão dos genes dos vírus que combatem os mecanismos antivirais celulares, como genes que inibem a ação do interferon (IFN). O IFN é um intermediário nas respostas comuns que ocorrem durante a infecção viral, sendo responsável pelo abortamento da síntese protéica nas células vizinhas. Contudo, nas células tumorais a produção dessa proteína é frequentemente deficiente, permitindo, assim, que o vírus *knockout*, que não conseguiria inibir a síntese do agente nas células normais, possa replicar-se (fig.1b).

Na terceira maneira, o vírus recombinado não consegue reprimir a apoptose da célula hospedeira, logo ele não é capaz de terminar efetivamente sua replicação em uma célula normal, mas sim em uma tumoral que possui essa via naturalmente defectiva (fig.1c).

Uma última alternativa seria o reconhecimento das partículas virais por receptores expressos preferencialmente ou exclusivamente na superfície das células tumorais, ou pelo reconhecimento por esses microrganismos das proteases que são comumente expostas no tecido cancerígeno (fig.1d). De fato, células malignas podem expressar altos níveis de receptores para vírus em comparação às células fisiológicas, o que as torna muito mais susceptíveis às infecções (1).

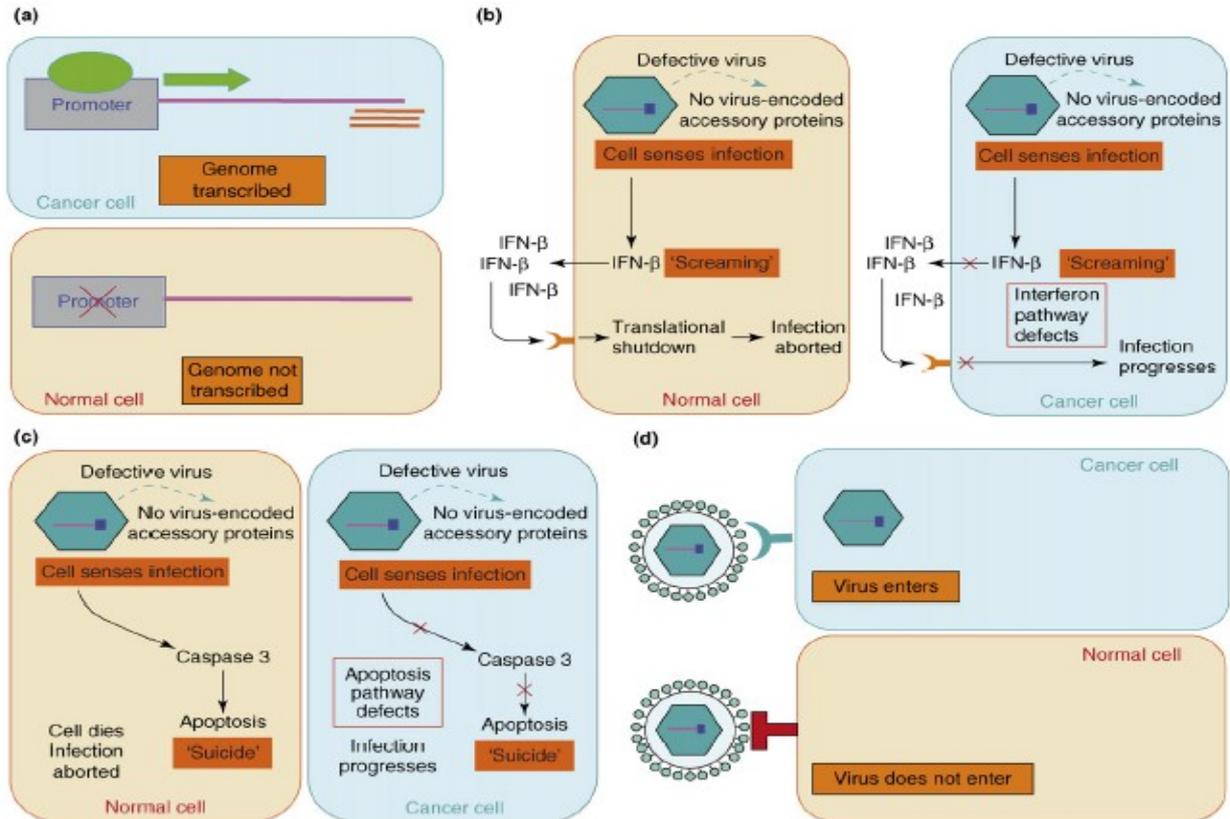


Fig.1: Mecanismos propostos para o tropismo e ação dos vírus oncolíticos.

Fonte: RUSSELL; PENG, 2007.

Todos os mecanismos descritos acima são base para o desenvolvimento da viroterapia, que ao produzir o vetor específico para cada abordagem - que relaciona a íntima relação vetor/célula hospedeira - toma o devido cuidado na atenuação do vírus, com o objetivo de evitar um espalhamento indesejável do mesmo. Isso é feito experimentalmente através de um rearranjo genético do vírion, no qual há deleção em regiões do seu genoma que codificam as proteínas de função estrutural, como aquelas responsáveis pela produção do capsídeo viral e/ou do envelope protéico. Assim o rearranjo gênico não permite ao vírus se espalhar para outras células por meios de replicação autônoma, eliminando ambos as possibilidades e os riscos da disseminação da infecção (1). Apesar de ser uma área promissora e aparentemente segura, mais testes se fazem necessários uma vez que, apesar das atenuações feitas, muitas variáveis ainda podem causar efeitos sérios e pouco conhecidos nos pacientes.

Uma vez dentro da célula hospedeira, o vírus oncolítico causa a morte da mesma devido a vários fatores: por usurpar grande parte da maquinaria de transcrição; por causa da expressão ou importação de proteínas virais, que por si só são tóxicas para o hospedeiro, ou que influenciam funções celulares vitais, levando a apoptose; e também por expressão de

genes que em sinergia com um outro vetor viral ou substância farmacêutica levam à morte da célula (1). Este último mecanismo de ação viral no hospedeiro é o foco do nosso trabalho, uma vez que trataremos da relação conjunta e dependente de um pró-fármaco que para matar a célula tumoral necessita ser ativado pelo produto do gene viral que, por sua vez, é levado à célula alvo pelo vetor adenovírus.

O adenovírus possui DNA dupla-fita, que contém aproximadamente 35-36 Kb. É morfológicamente caracterizado como um vírus de simetria icosaédrica; não possuindo envoltório (8). O tipo selvagem acomete principalmente os olhos, o trato respiratório, o gastro-intestinal, e o urinário (8). A sua expressão clínica é em muitas vezes assintomática podendo permanecer no hospedeiro durante meses (8).

Os adenovírus são sistemas particularmente valiosos pelo seu uso potencial como uma ferramenta na terapia gênica, uma vez que os vírus de replicação defeituosa, não perdem a capacidade de infectar sua célula alvo, e tornam-se seletivos para células tumorais, através da deleção dos genes E1. Estes são expressos nos estágios mais prematuros da infecção, logo após a entrada do vírus no citoplasma (1). Dois genes em especial desse grupo têm sido modificados para criar um vírus tumor-específico. São eles: E1A e E1B (E1B55K) (1). Normalmente os produtos desses genes agem em conjunto para forçar a célula hospedeira a entrar na fase S, um pré-requisito importante para a replicação bem sucedida do vírus (9).

A deleção do E1A tornará o vírus susceptível à ação antiviral do mecanismo mediado pela proteína retinoblastoma (Rb), que bloqueia a transição da fase G1 para S (1). A deleção do E1B, por outro lado, permitirá à p53 induzir a apoptose das células infectadas, abortando a replicação e disseminação do vírus (1). Portanto, a replicação produtiva do adenovírus mutante, somente vigora em células deficientes em Rb e p53, característica comumente encontrada na maioria das células tumorais (3).

Utilizando do adenovírus atenuado com essas características como vetor do gene do vírus herpes simplex que codifica a timidina cinase e de um pró-fármaco chamado ganciclovir (GCV) desenvolveremos nosso experimento que se baseia em outros já feitos. Estes geraram resultados muito bem sucedidos, principalmente naquele que foi o maior ensaio clínico tipo III já feito, que ocorreu em meados dos anos 90, no qual culminou no aumento da sobrevivência de pacientes com câncer cerebral primário, de 37.7 para 62.4 semanas, motivo pelo qual nos incentivaram a criar este projeto. A única diferença é que nos testes já realizados foram usados retrovírus como vetores (4 e 6).

O ganciclovir é um pró-fármaco poderoso, que entra no organismo sem ação prejudicial e só culmina na morte da célula uma vez que induzido – essas são características

importantes para classificação de drogas como pró-fármacos. O GCV só é ativado quando fosforilado pela timidina cinase, que o transforma em uma nucleosídeo monofosfato (9). Este será posteriormente fosforilado por mais duas vezes por kinases celulares, tornando-se, então um trifosfato que competirá com o dGTP, e uma vez introduzido no genoma pára a replicação e leva a morte da célula (9). As timidinas cinases codificadas pelo gene HSV-TK do vírus herpes simplex são muito mais eficientes na catalisação da fosforilação do GCV, do que a humana, daí seu uso recorrente em terapias gênicas, inclusive nos nossos testes.

Para a entrega do HSV-TK à célula alvo, recombinaremos o vetor adenovírus Onyx-015 (dl1520) introduzindo nele o gene em questão (1 e 4). Esse vetor é um vírus atenuado por ser E1-B negativo, logo possui grande tropismo por células tumorais (1). Uma vez na célula cancerígena, o gene produzirá a timidina cinase, que ativará o GCV, culminando na eventual morte da célula, contribuindo, assim, para o combate ao câncer.

Portanto, em uma perspectiva farmacológica, o genoma viral pode ser visto como uma nova classe de droga destruidora de tecido tumoral por meio de sua ação como nanopartícula natural utilizada para o transporte e entrega de ácidos nucléicos nas células alvo, ou seja, um vetor, que ativará, assim, processos mais complexos de sinergia entre expressão gênica viral e fármacos (2).

## **II – Justificativa**

Mediante os altos índices de ocorrência de câncer na população mundial e a crescente importância das terapias para esse tipo de doença, procuramos expandir a técnica HSV-TK/GCV. Esta técnica tem se mostrado efetiva na maioria dos casos de combate a tumores cerebrais e já está em nível III de pesquisa, para outros tipos de tumores, dentre os quais procuramos incluir aqueles mais recorrentes, de forma a propiciar uma nova alternativa no tratamento do câncer.

## **III – Objetivo**

Verificar a eficiência da *pro-drug activation therapy* em diferentes tipos de células cancerígenas, bem como os efeitos na expressão gênica das mesmas.

## **IV – Materiais e métodos**

### **IV.1 – Cultivo de células**

A pesquisa pretende testar a eficácia da técnica do pro-drug em interromper o desenvolvimento de três culturas celulares tumorais diferentes e verificar a especificidade do tratamento utilizando como controle uma célula não tumoral. As linhagens serão obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). As células tumorais humanas a serem usadas no estudo são: PC-3 (isolada de um adenocarcinoma de próstata derivado de um sítio de metástase na medula óssea de uma paciente caucasiano de 63 anos de idade), MCF-7 (obtida de um adenocarcinoma da glândula mamária a partir de um sítio de metástase da efusão pleural de uma paciente caucasiana de 69 anos de idade) e HCT 116 (carcinoma coloretal derivado de um paciente adulto que apresenta uma mutação no codon 13 do protooncogene ras). A célula controle não tumoral é a A31 (fibroblasto).

As linhagens serão cultivadas em garrafas de cultura de plástico 25 cm<sup>2</sup> tratadas para adesão celular (250 ml), a 37 °C em estufa umidificada com atmosfera de 5% CO<sup>2</sup>. O meio nutriente para a manutenção das células consistirá em 20mL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Cultilab) suplementado com bicarbonato de sódio 1,2 g/L, 10% soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), mais 1% de solução de 5000 U/mL de penicilina G e 5 mg/mL de sulfato de estreptomicina em salina 0,9% (solução de PS), para manter a cultura. O meio será trocado três vezes por semana e as células repicadas assim que atingirem 70% de confluência da garrafa. O repique celular consistirá de retirar o meio antigo e depois colocar 2mL de uma solução de MEM contendo 1 mM de EDTA e tripsina a 1%. Após cerca de 2 minutos as células se soltarão da garrafa sendo posteriormente ressuspensas em DMEM com 10% soro fetal bovino para que a ação da tripsina seja bloqueada. O volume final será então centrifugado, o sobrenadante obtido retirado e o sedimento ressuspensado em 10 ml de DMEM.

### **IV.2 – Montagem do vírus recombinante**

Os vetores adenovirais possuem um largo espectro de infectividade celular que inclui virtualmente todas as células pós-mitóticas e mitóticas, e também podem ser produzidos em elevados títulos. A expressão gênica viral ocorre de uma maneira ordenada e é dirigida, em grande parte, pelos genes E1A e E1B, localizados na porção 5' do genoma adenoviral. Esses

genes possuem funções de transativação para a transcrição de vários genes virais e da célula hospedeira (11). Como estes genes da região E1 estão envolvidos na replicação do adenovírus, sua remoção torna o vírus incompetente para replicação ou defeutivo, prevenindo que o vírus se espalhe e lise células normais (12). A remoção também cria espaço para a inserção de um gene de interesse terapêutico. A região E3, cujo produto está envolvido na habilidade do vírus de escapar do sistema imunológico do organismo hospedeiro, também pode ser substituída por um DNA exógeno (11). Estes vetores podem ser propagados em células *E1-complementing human embryonic kidney cell-derived 293 line* (células humanas embrionárias de rim previamente transformadas pelos genes E1A e E1B do adenovírus, derivadas da linhagem 293), conhecidas como HEK-293 (13).

Para inserir o gene de interesse na região E1, ele deve ser primeiramente inserido em um plasmídeo (12). Será feita uma cotransfecção com este plasmídeo pMV60 contendo o gene da *timidina quinase* [junto com o promotor exógeno CAG (9) e seqüências de poliadenilação (12)] e um segundo plasmídeo (pBHG10) carregando seqüências genômicas do adenovírus *dl 1520 (ONYX-015)*, atenuado com deleções selecionadas (genes E1, E3), nas células de empacotamento HEK 293. O DNA do adenovírus sofrerá recombinação homóloga com o gene de interesse, formando partículas adenovirais com o transgene HSVtk substituindo as regiões previamente deletadas e sendo flanqueado por seqüências de DNA adenovirais, que servem como regiões controle e contêm sinais de empacotamento (11). O processo de produção de vetores adenovirais está esquematizado na fig.2 (11). As células HEK-293 são células transformadas que carregam os genes E1 do adenovírus, para que este possa se replicar nela e, tendo sido deletado este gene do seu genoma, seja incapaz de se replicar em células normais.

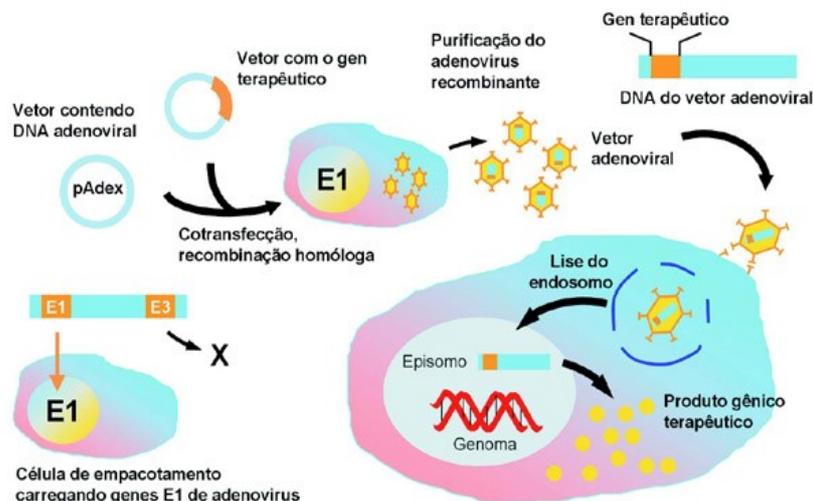


Fig. 2: Etapas da produção e uso de vetores adenovirais.

Fonte: Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.

Os plasmídeos para transfecção adenoviral pMV60 (construído do plasmídeo pXCX2) e pBHG10 (Microbix Biosystems), são preparados usando-se o sistema Maxi-prep (Qiagen). Um dia antes da cotransfecção, semear células HEK 293 (ATCC-1573) em 7mL de meio 293 [meio mínimo essencial Dulbecco's com *Earle's salts*, 10% soro fetal bovino, MEM 1X, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 1 mg/ml estreptomicina, estocado por 1 mês a 4°C], em garrafas de cultura 25cm<sup>2</sup>. Pretende-se alcançar 40% de confluência no dia da transfecção para ótima eficiência desta. No dia do experimento, aspirar o meio e adicionar 5mL de meio 293 fresco pré-aquecido. Pipetar em um tubo falcon de 15mL estéril, 5µg do plasmídeo contendo o gene de interesse, e 5µg do pBHG10. Adicionar low-Tris/EDTA buffer [100 ml 1M Tris·Cl, pH 7,5 e 10 ml 0,5M EDTA, pH 8,0] até um volume final de 210 µL e misturar. Adicionar 30 µl of 2M CaCl<sub>2</sub> e dar um *spin* (1 minuto em 200xg, à temperatura ambiente). Adicionar a mistura para um segundo tubo estéril contendo HeBS 2X (2X HEPES-buffered saline). Permitir precipitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionar a mistura HeBS-DNA-CaCl<sub>2</sub> diretamente nos 5mL de meio das células 293 cultivadas. Um fino precipitado de DNA se formará nas células, enquanto esta é incubada por 16 horas. Aspirar o meio e adicionar 5 ml de D-PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline - Life Technologies). Aspirar o PBS, lavar as células com meio 293 e então adicionar 6mL de meio 293 fresco, e tornar a incubar as células. Trocar o meio a cada três dias. Se a recombinação tiver ocorrido, placas se tornarão visíveis seis dias após a cotransfecção. Permitir que a placa se espalhe através da monocamada. Coletar as células em um tubo falcon de 15mL (as células irão se destacar da superfície da garrafa ou lavando ou batendo levemente) e centrifugar por 15 minutos a 300×g, a 4°C. Aspirar o sobrenadante e ressuspender as células em 100µL de D-PBS. Lisar as células congelando e descongelando rapidamente por três vezes, centrifugar por 15 minutos a 300×g, a 4°C para formar o pellet do *debree* celular, e então transferir o sobrenadante para um “eppendorf” estéril (12). Após estes procedimentos, o adenovírus recombinante é purificado por ultracentrifugação em gradiente de césio. O concentrado do vírus então será dializado (para separação do césio), aliquotado e estocado a -80°C. Em seguida será determinado o título do vírus por plaqueamento (9).

### IV.3 – Infecção

Cada linhagem será submetida a três condições experimentais diferentes. Em uma garrafa as células serão infectadas com o adenovírus recombinante para o gene da timidina

cinase e incubadas com o GVC com o intuito de se verificar a interrupção do crescimento da cultura. As duas outras situações propostas servirão como controle: em uma cultura as células serão infectadas mas não expostas ao pró-fármaco e em outra as células serão apresentadas apenas a este último.

A inoculação do adenovírus recombinante na cultura consiste em adicionar uma suspensão do vírus com multiplicidade de infecção (título de vírus/número de células) adequada. O meio será carenciado (1% SFB) e o vírus incubado durante 1h a 28 °C para a adsorção. Após esse tempo a cultura será lavada três vezes com DMEM.

#### **IV.4 – Western Blotting**

##### Extração de proteínas totais

Após o tempo de infecção as células serão lavadas duas vezes com PBS 1X gelado, adicionando-se, posteriormente, 100µL/garrafa de solução de lise [1% Triton NP40, 50mM HEPES (pH7,5), 5mM EDTA, 10%v/v glicerol, 200mM NaCl, 1mM vanadato de sódio, 1mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), 5µg/mL aprotinina e 2,5µg/mL leupeptina]. As células serão mantidas em repouso no gelo por 30 minutos, e então raspadas, ressuspendidas e coletadas em tubos “Eppendorf”. O lisado será clarificado dos restos celulares através de centrifugação a 13500 rpm por 20min a 4°C em uma centrífuga Eppendorf modelo 5417R.

O sobrenadante será coletado e a concentração das proteínas totais determinada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories, USA). As proteínas serão, então, aliqüotadas e mantidas a -70°C.

##### Transferência de “Western”

Será adicionado tampão LB [0,5M Tris-HCl (pH 6,8), 5% β-mercaptoetanol, 0,1% (p/v) bromofenol blue, 20% (v/v) glicerol] a aliqüotas de 25 ou 30 µg/amostra das proteínas totais, que serão fervidas por cinco minutos a 99°C. As amostras serão, então, fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% a 100 Volts por aproximadamente 2 horas. A seguir, serão transferidas para uma membrana de nitrocelulose, (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech), conforme protocolo do “Kit Bio-Rad Transferency” (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas serão coradas com “ponceau 1%” para visualização da eficiência da mesma, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. As membranas serão bloqueadas por 1hora a temperatura ambiente, utilizando-se PBS 1X/Tween 0,1% contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado. A

seguir, as membranas serão lavadas 3 vezes em PBS 1X/Tween 0,1% e incubadas com o anticorpo primário ab56200 (anticorpo policlonal de coelho em concentração 0,5mg/mL - Abcam) por 12 a 48 horas, a 4°C, na diluição recomendada pelo fabricante, em PBS 1X/Tween 0,1% contendo 5% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA). As membranas serão novamente lavadas 3 vezes em PBS 1X/Tween 0,1% e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário ab6721 (anticorpo policlonal de coelho H&L-conjugado com peroxidase, em concentração 2000mg/mL - Abcam), na diluição recomendada pelo fabricante, em PBS 1X Tween 0,1%, contendo 5% de leite em pó desnatado. Após nova e última seção de lavagens em PBS 1X/Tween 0,1%, as membranas serão incubadas com solução reveladora “ECL-Plus” (Amersham Biotech, UK) por 5 minutos, expostas contra filme de raios X (Hyperfilm ECL, Amersham Biotech, UK), e revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante.

#### **IV.5 – FACS (separação de células ativada por fluorescência)**

Ferramenta que permite identificar subgrupos de célula com determinada propriedade, fenótipo estrutural e/ou funcional, estágio de maturação ou status de ativação dentre uma população inicial a partir do uso de sondas marcadas com um corante fluorescente que se liga de modo específico a um ou mais componentes celulares de interesse. A leitura é feita com um citômetro de fluxo capaz de medir a intensidade da fluorescência emitida através da intersecção de um feixe de laser sobre uma fina corrente de líquido contendo células individuais provocando a dispersão da luz emitida e a excitação do corante acoplado que irá emitir então sinais de fluorescência. Pela análise desses fatores podemos inferir dados acerca do tamanho e granulidade da célula e níveis de expressão de diversas moléculas.

Os estudos acerca do ciclo celular também podem ser realizados pela análise com citômetro de fluxo, as células coradas com iodeto de propídeo que marca ácidos nucleicos de cadeia dupla (DNA) que ao serem estimulados emitem fluorescência cuja intensidade permite-nos distinguir a proporção de células em G0 ou G1, S e em G2 ou M.

Portanto, a pesquisa propõe o uso desta técnica como forma de avaliar o efeito da interrupção do ciclo celular pretendido através do tratamento com o pró- fármaco conjugado a entrega da timidina cinase pelo vetor viral.

Para este fim, as células infectadas e tratadas com GCV, as culturas incubadas apenas com a droga e as células infectadas, mas não expostas à droga, serão removidas com uma solução de tripsina e EDTA. O conteúdo será colocado em um tubo falcon, centrifugado e

após a retirada do líquido, as células serão ressuspensas em 0,5 mL de PBS e então fixadas em álcool 70% e mantidas no refrigerador até o dia do experimento. No dia do experimento estas serão então centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de PBS, contadas e acertadas para a concentração final de  $1,0 \times 10^6$ . Estas amostras e a solução de iodeto de propídio devidamente protegidas contra luz serão inseridas no gelo. Microtubos (PGC scientific) de 1mL contendo 500  $\mu$ L desta solução e 5  $\mu$ L da solução de iodeto de propídio (100 mg/ mL) serão utilizados para realização da leitura.

#### **IV.6 – Microarranjo**

A ação do pró-fármaco ganciclovir sobre as células tumorais impede fisicamente a replicação do DNA, assim como os dímeros de pirimidina, o que impossibilita o pareamento das demais bases e induz a célula à morte. Na maioria dos casos são acionadas vias de reparo que conseguem realizar o pareamento, mas com o GCV, esse dano é irreparável.

Em células normais, quando ocorre um dano irreparável no DNA, são acionadas vias enzimáticas que induzem à apoptose, como a via da P53. Entretanto, nos tumores essas vias estão inativas ou pouco expressas, mas acreditamos que ainda sim a lesão causada pelo GCV conduza a uma superexpressão dessas enzimas apoptóticas que contribua para a morte celular.

De forma a verificar a superexpressão dessas enzimas utilizaremos a técnica de microarranjo, para a qual isolaremos os mRNAs das células tumorais infectadas com o vírus recombinante e das expostas ao vírus e tratadas com GCV, das linhagens de tumor escolhidas.

A partir dos mRNAs desses dois tipos celulares produziremos cDNAs utilizando a enzima transcriptase reversa e marcadores com fluorescência para indicar a qual tipo celular pertence cada cDNA. Esses cDNAs serão então misturados e colocados em um chip contendo oligonucleotídeos para as enzimas das vias apoptóticas.

Aquelas enzimas mais expressas nos tumores apresentarão fluorescência mais intensa, indicando se a lesão causada pelo pró-fármaco é realmente capaz de induzir a superexpressão das vias apoptóticas mesmo em cânceres.

**V – Cronograma**

	Ano I				Ano II			
	1º trim.	2º trim.	3º trim.	4ºtrim.	1º trim.	2º trim.	3º trim.	4º trim.
Aquisição do material	X	X	X					
Cultura das células				X	X	X		
Multiplicação do vírus recombinante						X	X	
Infecção e tratamento com a droga							X	
Extração de proteínas e Western Blotting							X	
FACS							X	
Microarranjo							X	
Comparação e análise dos resultados							X	X

**VI – Orçamento**Material para cultura: (www.cultilab.com.br)

- Penicilina/estreptomicina 5 mL	R\$24,60
- Solução tripsina/EDTA	R\$15,50
- Dulbecco MEM (DMEM) pó embalagem contendo 10 x 1L	R\$640,00
- Soro fetal bovino 500 mL	R\$175,00
- Tubo p/ centrifuga 15mL Polip. est. tampa rosca c/40	R\$45,00
- Frascos p/ cultura de células 60mL (25 cm2)	R\$28,00

Células: (www.atcc.org)

- MCF 7	\$ 203,00
- HCT 116	\$ 203,00
- PC-3	\$ 203,00

Construção do vetor:

Células 293 (Invitrogen) 3x10 <sup>6</sup> células	R\$460,00
Soro fetal bovino 500mL	R\$175,00
D-PBS (Invitrogen) 1L	R\$ 37,00
2mM L-glutamina 400g	R\$110,00
Penicilina/Estreptomicina 5mL	R\$ 24,60
2M CaCl <sub>2</sub> 400g	R\$ 18,00
Tubo falcon de 15mL 50unid	R\$ 81,00
Eppendorf 1,5mL 100unid	R\$ 4,00

**Plasmídeo pBHG10****Plasmídeo pMV60**Anticorpos para WB: ([www.abcam.com/index.html](http://www.abcam.com/index.html))

Anticorpo primário ab56200 (Abcam) para WB 100µg	R\$530,00
Anticorpo secundário ab6721 (Abcam) para WB 1mg	R\$265,00

Western Blotting:

Kit Bio-Rad	R\$725,13
Membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Biotech) 10 folhas	R\$402,50
“ECL-Plus” (Amersham Biotech, UK) 1kit	R\$392,00
Filme de raios X (Hyperfilm ECL, Amersham Biotech) 50 folhas	R\$646,00
Revelador e fixador (Kodak)	R\$646,00
Gel de poliacrilamida/SDS (PAGE)	R\$816,81
PBS 1X/Tween 0,1%	R\$975,68
Tampão LB (GE Healthcare)	R\$263,13
Solução de lise	R\$312,00

Reagentes para FACS: (<https://www.sigmaaldrich.com>)

- (P4170) Iodeto de propídio 25mg (Sigma)	R\$180,16
- (P5119) Phosphate buffered saline 100mL – PBS (Sigma)	R\$135,82

Microarranjo:

Express Kit (Invitrogen)	R\$162.168,00
--------------------------	---------------

<u>Total:</u>	R\$178.404,33
---------------	---------------

## Referências Bibliográficas

1. VÄHÄ-KOSKELA, Markus J.V.; HEIKKILÄ, Jari E.; HINKKANEN, Ari E. Oncolytic viruses in cancer therapy. **Cancer Letters**. n. 254, p. 178-216, 2007.
2. STANDFORD, Marianne M *et al.* Oncolytic virotherapy synergism with signaling inhibitors: rapamycin increases myxoma virus tropism for human tumor cells. **Journal of virology**. n. 3, v. 81, p. 1251-1260, 2007.
3. RUSSELL, Stephen J. and PENG, Kah-Whye. Viruses as anticancer drugs. **TRENDS in Pharmacological Sciences**. n. 7, v.28, p. 326-333, 2007.
4. PALMER, Daniel H.; YOUNG, Lawrence S.; MAUTNER, Vivien. Cancer gene-therapy: clinical trials. **TRENDS in Biotechnology**. n. 2, v. 24, p. 76-82, 2006.
5. TAGAWA, Masatoshi *et al.* Cancer therapy with local oncolysis and topical cytokine secretion. **Frontiers in Bioscience**. n. 13, v. 1, p.2578-2587, 2008.
6. American Society of Gene Therapy. **Brief History of Gene Therapy**. Disponível em: <[http://www.asgt.org/public\\_patient/history.php](http://www.asgt.org/public_patient/history.php)>. Acesso em 17 nov.2007
7. PARK, Keerang *et al.* Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors. **Frontiers in Bioscience**. n. 13, v. 1, p.2653-2659, 2008.
8. BROOKS, Geo F. ; BUTEL, Janet S. ; MORSE, Stephen A. **Jawetz, Relnick e Sdelberg, Microbiologia Médica**. 22ed. Rio de Janeiro. Mcgraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2005.
9. NISHIKAWA, Masaya *et al.* Cell Death of Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Induced by Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene and Ganciclovir. **International Journal of Medical Sciences**, Nagoya, v.66, p. 129-137, 2003.
10. JIN, Shengkan *et al.* Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. **Journal of cell science**. n. 120, v. 3, p. 379-383, 2007.
11. DANI, Sergio U. **Terapia Gênica: Vetores para terapia gênica**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/terapia.pdf>>
12. SOUTHGATE, Thomas D.; KINGSTON, Paul A.; CASTRO, Maria G. Gene Transfer into Neural Cells in vitro Using Adenoviral Vectors. **Current Protocols in Neuroscience**. Manchester, Nov/2000.
13. GRAHAM, F.L.; SMILEY, J., Russell; W.C.; NAIRU, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**. n.68, p. 937-940, 1977.

## **Pareceres dos grupos:**

### **1. Aspectos Peculiares da Leucemia em Crianças com Síndrome de Down.**

#### **Resumo:**

A Síndrome de Down é uma síndrome genética congênita causada pela presença de um terceiro cromossomo 21. O fenótipo expressado por essa anomalia é típico e facilmente reconhecido devido a sua grande difusão na sociedade.

Comparando os casos clínicos de leucemia observa-se que crianças com essa síndrome apresentam chances de desenvolverem esse câncer até vinte vezes maiores do que crianças normais. Como exemplo, que também é o foco do trabalho, a leucemia mielóide aguda, que é rara em crianças saudáveis. Portanto, as pesquisadoras farão um estudo da proteômica dos cinco diferentes grupos estabelecidos, com o objetivo de conhecer melhor as diferenças proteômicas de cada um e compará-las entre si.

Procurarão também comparar a expressão gênica de pacientes com Síndrome de Down leucêmicos antes e depois da quimioterapia, e estes com as de pacientes leucêmicos, mas sem a síndrome. Assim, contribuirão para um melhor entendimento das razões que fazem os pacientes com a síndrome de Down responderem bem ao tratamento quimioterápico, melhor que aqueles que não tem a síndrome mas que também desenvolveram a leucemia. Além de demonstrar as diferenças genéticas nos pacientes com síndrome leucêmicos causadas pelo uso da droga no tratamento quimioterápico.

Para isso as pesquisadoras farão coletas de células da medula óssea contando com campanhas e doações dos pacientes cadastrados no REDOME. Formando assim, cinco grupos sendo os controles pessoas sem leucemia com e sem Síndrome de Down. Os grupos testes serão aqueles leucêmicos sem a síndrome, e aqueles também leucêmicos porém com a anomalia do cromossomo 21 sendo um grupo submetido a quimioterapia o outro não.

A partir das células coletadas serão feitas centrifugações diferenciais, selecionando a porção citoplasmática das mesmas. As proteínas desse compartimento celular serão purificadas e corridas em gel bidimensionais de poliacrilamida (SDS). Por último, para seqüenciar e identificar as proteínas estudadas será usado a espectrometria de massa. Daí o grupo terá condições de comparar e analisar todos os seus objetivos com os variados grupos com base nas informações das proteínas diferenciadas identificadas.

#### **Crítica:**

Esse projeto contribuirá com as pesquisas envolvendo leucemia, sendo muito interessante a relação feita entre Síndrome de Down, pessoas saudáveis, e a leucemia. Os estudos comparando os

diversos grupos poderão apontar padrões promissores de diferentes expressões gênicas, que provavelmente contribuirão para uma melhor compreensão da doença e até mesmo servir de base para pesquisas mais profundas sob um dos padrões encontrados, acarretando em novas descobertas, como por exemplo uma proteína diferencial em pessoas da Síndrome de Down, que lhes confere a melhor resposta à quimioterapia.

Elas poderiam, no entanto, fazer mais um grupo teste com pacientes leucêmicos que apresentam Síndrome de Down e que não foram ainda submetidos à quimioterapia. Esse grupo extra enriqueceria ainda mais o trabalho, pois seria mais um conjunto a se comparar em busca de padrões diferenciais.

Também concordamos com o uso preferencial da técnica de gel bidimensional, uma vez que esta responde melhor ao objetivo desse projeto que o Western blotting, uma vez que a amostra estudada é grande e a técnica de blotting não apresentaria a resolução adequada.

## **2. Transcrição gênica de mRNA's ligados a tigmomorfogênese em *Arabidopsis thaliana***

### **Resumo:**

O objetivo deste projeto é observar a diferença de expressão gênica nos meristemas apical e lateral de *Arabidopsis thaliana* sob estresse mecânico, relacionando esta diferença de expressão ao fenômeno da tigmomorfogênese, que corresponde à diminuição do crescimento apical e aumento do crescimento radial de uma planta quando é submetida a esse tipo de estresse.

Para alcançar tal objetivo o grupo propõe o cultivo de 100 mudas, das quais 50 serão submetidas ao estresse (uma corrente de ar constante produzida por ventilador), e a extração do mRNA dos meristemas apical e lateral das 100 as mudas 6 semanas após a germinação. O método proposto para análise da expressão gênica é o Microarranjo, para o qual serão produzidos dois tipos de cDNA, um correspondente ao meristema apical e outro ao meristema lateral. Os chips irão conter cerca de 126 genes conhecidamente ligados ao crescimento e será comparada a expressão em situação de estresse e em condições amenas para cada um dos meristemas

### **Crítica:**

O projeto, tendo em vista seu objetivo, pode ser considerado relevante, já que apresentaria uma contribuição para a ciência, na medida em que poderia estabelecer os genes responsáveis pela tigmomorfogênese e esclarecer alguns dos mecanismos gênicos da

dominância apical. Além disso poderia significar um avanço econômico com a produção de plantas que tenham o seu padrão de crescimento direcionado ao objetivo de seu cultivo.

Quanto aos métodos propostos para estratificação das sementes, plantio e cultivo não há nenhum problema a ser destacado, já que são métodos empregados com sucesso em outros trabalhos científicos. A técnica para extração de RNA também se mostra confiável e inclui métodos de quantificação e avaliação da qualidade do material obtido. No entanto o uso da técnica de microarranjo da forma como foi proposto não é viável, pois para este tipo de análise é necessário selecionar um ponto mais específico onde se espera encontrar os resultados. A verificação de todas as possibilidades, como 126 genes, é inviável do ponto de vista financeiro. Diante disso seria aconselhável que o grupo tentasse estabelecer entre os genes ligados ao crescimento da planta aqueles com maior probabilidade de estarem associados à tigmomorfogênese.

Talvez fosse interessante comparar a expressão gênica entre os dois tipos de meristemas sob estresse mecânico, já que a tigmomorfogênese e o fenômeno da dominância apical tratam da relação entre o meristema apical e o lateral. Além disso, também poderiam ser feitos experimentos submetendo as plantas a diferentes formas de estresse mecânico além da corrente de ar.

### **3. Desenvolvimento de eucalipto transgênico para a recuperação de áreas contaminadas por metais pesados**

#### **Resumo:**

O projeto propõe desenvolver, a partir das espécies *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, exemplares transgênicos de eucaliptos que superexpressem fitoquelatinas, tendo em vista a recuperação de solos contaminados por metais pesados e seu aproveitamento.

Para tal, o projeto propõe isolar o RNAm responsável pela produção de fitoquelatina em *Arabidopsis* e produzir cDNA a partir dele, realizando sua incorporação ao plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*. Em seguida pretende-se infectar fragmentos foliares de eucalipto a partir de T-DNA de *A. tumefaciens*, e então verificar e selecionar as plantas transgênicas. Então, seriam cultivadas as plantas transformadas em solos contaminados com metais pesados. Após o cultivo, pretende-se avaliar a concentração de metais pesados presente no solo dos vasos com os vegetais transgênicos e com os vegetais controles e comparar os resultados.

**Crítica:**

Pesquisas envolvendo eucalipto transgênico no Brasil já têm sido desenvolvidas no Brasil, tanto pelo Dr. Carlos Labate, da Esalq, quanto pela Dra. Marguerite Quoirin, da UFPR. Este projeto apresenta fins de grande interesse (fitorremediação), e além dos benefícios biológicos ele proporcionaria grandes lucros para a economia. O eucalipto não é nativo do Brasil, entretanto é muito bem distribuído no país, e apresenta a vantagem de se adaptar a vários tipos de clima, ter rápido crescimento e raízes grandes. Outra vantagem dessa planta é que ela pode ficar por muito tempo no solo poluído e estocar metais durante um longo período de tempo. Além disso, a madeira poderia posteriormente ser utilizada na indústria moveleira e em construções. A fitoquelatina produzida pelo híbrido talvez fosse a solução para os grandes malefícios causados pela toxicidade dos metais pesados. Entretanto, dois problemas ecológicos poderiam surgir. As folhas armazenariam os metais pesados e, ao serem ingeridas por animais, estariam passando a contaminação para eles. Ao cair no solo, as folhas também estariam recontaminando-o. Além disso, a dispersão de animais contaminados e folhas poderia ampliar a área de solo contaminado.

Quanto aos métodos moleculares a serem utilizados, estes parecem bastante viáveis, uma vez que os processos de extração de DNA, produção de c-DNA e incorporação em plasmídeo são bastante utilizados em laboratório.

**4. Determinação e comparação da expressão gênica entre endométrios normais, hiperplásicos e com endometriose.****Resumo:**

A infertilidade feminina possui várias causas, e muitas delas ainda necessitam de mais pesquisas como é o caso da endometriose e da hiperplasia do endométrio. Essas duas disfunções acometem uma grande quantidade de mulheres, sendo que a endometriose, por exemplo, segundo dados estatísticos, atinge 5% da população feminina brasileira e corresponde a 20% das mulheres inférteis. Esses 20% estão dentro dos 10% considerados outras causas de infertilidade, além das normais: desordem ovulatórias, obstrução tubária e endometriose. Contudo, as relações entre infertilidade e essas doenças ainda são obscuras, daí o objetivo do grupo de conhecer melhor os fatores genéticos envolvidos e tentar estabelecer a relação entre a expressão de genes diferenciais e um possível polimorfismo dos mesmos em relação aos normais. Com isso eles esperam gerar informações relevantes para o desenvolvimento de melhores técnicas de diagnóstico e acompanhamento dessas patologias,

além de meios para tratamento e cura. Para tal objetivo, eles utilizarão 3 grupos de 5 pessoas, sendo que o primeiro grupo será representado por 5 mulheres normais –controle-, o segundo por 5 mulheres com endometriose e o terceiro de 5 com hiperplasia endometrial. As mulheres a serem testadas assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido e compromisso, e serão escolhidas aleatoriamente. Uma biópsia prévia será feita antes dos testes, para verificar a veracidade da doença nas candidatas.

Após os procedimentos padrões feitos com os grupos a serem testados e o material que será usado, segue-se ao microarranjo, técnica esta que será utilizada para comparar a expressão gênica diferencial entre tecido normal e com endometriose e aquele normal em relação àquele com hiperplasia do endométrio. A partir dos genes das disfunções com expressões diferentes daquelas dos tecidos normais, será feita PCR para amplificar os mesmos. Depois serão realizados sequenciamentos desses genes de interesse objetivando atestar possíveis polimorfismos, que seriam as causas genéticas das patologias. Caso não fossem achadas diferenças entre as seqüências dos genes dos tecidos doentes daqueles saudáveis, os pesquisadores entenderiam que mutações não estariam envolvidas no desenvolvimento dos fenótipos disfuncionais estudados.

### **Crítica:**

Nosso grupo achou o objetivo, justificativa, e o projeto em si, muito interessantes e relevantes, uma vez que os resultados dos seus estudos contribuirão para um melhor entendimento das relações entre infertilidade e as patologias de hiperplasia endometrial e endometriose, conseqüentemente dando suporte para um possível desenvolvimento de diagnósticos e tratamentos.

Foi um projeto bem estruturado e principalmente barato com um orçamento estimado de R\$13.944,10. Contudo, algumas melhoras podem ser feitas como em respeito à obtenção da amostragem, uma vez que provavelmente o grupo terá dificuldades em obter candidatas, principalmente do grupo controle. Então, sugerimos que se na primeira tentativa não for bem sucedida e não responder a necessidade do grupo de obter 5 voluntárias, o melhor seria oferecer uma quantia para aqueles que participarem como doadores de tecido endometrial, como é muito realizado nos Estados Unidos, onde eles pagam uma quantia pré-determinada às pessoas interessadas. E para enriquecer e tornar o trabalho ainda melhor, sugere-se que quando for atestar o polimorfismo, com os genes de expressão diferencial amplificados, utilizar microsátélites com o objetivo de traçar o pedaço do cromossomo onde a mutação se encontra.

## **5. Estudo sobre a variação da expressão da hBD-2 e hBD-3 em queratinócitos expostos ao fungo *Malassezia furfur*.**

### **Resumo:**

*A Malassezia furfur é uma levedura lipofílica considerada como integrante da microbiota normal da pele e do couro cabeludo. É responsável por uma dermatomicose superficial leve e crônica conhecida por pitíriase versicolor caracterizada pela formação de manchas hip- ou hiperpigmentadas na pele, principalmente no tórax, nas costas, nos braços ou no abdômen. Essas máculas podem aumentar e coalescer, embora a descamação, a inflamação e a irritação sejam mínimas. Como efeito, essa condição comum representa em grande parte um problema estético.*

As beta defencinas expressas em várias células de diversos organismos inclusive nas células epiteliais humanas são moléculas que contribuem no controle da replicação do vírus do HIV, possuem atividade quimiotática e imuno-estimulantes recrutando as células dendríticas imaturas e os linfócitos T, além de ser um fator determinante para a diferenciação celular. Mas o papel dessas defensinas explorado no projeto em questão é a sua atividade antimicrobiana.

O trabalho analisado pretende investigar a influência do agente infeccioso *Malassezia furfur* sob a resposta celular de produção das defencinas hBD-2 e hBD-3. Para alcançar este objetivo a pesquisa propõe avaliar a transcrição do gene envolvido quantificando o seu RNAm correspondente na célula infectada utilizando para este fim um protocolo de PCR em tempo real. E posteriormente verificar o consequente aumento do produto protéico deste gene através do Western blotting.

### **Crítica:**

A importância de elucidar a relação entre *Malassezia furfur* – beta defensinas – queratinócitos deve-se ao fato que a pele constitui a primeira barreira de defesa de nosso corpo e a pitíriase vesicolor é uma micose corriqueira e de difícil tratamento portanto, é útil entender melhor os mecanismos da doença.

A metodologia sugerida consegue atender o objetivo proposto, o de constatar se há ou não um aumento das defensinas em resposta a infecção. Para isso o grupo deve o cuidado de não só

avaliar a expressão do RNAm mas também de seu produto certificando-se que sua expressão não estaria sujeita a repressão por um controle pós-transcricional. No entanto, os resultados obtidos não nos permitirão entender se caso a síntese de defensinas esteja aumentada o porque desta resposta não ser tão efetiva no controle da doença.

## **6. Avaliação do efeito do tratamento com Kefir na microbiota e na expressão gênica das células epiteliais do intestino de camundongos.**

### **Resumo:**

Segundo naturalistas o Kefir, produto da fermentação do leite por uma simbiose de fungos e bactérias, atua como normalizador intestinal, prevenindo problemas nervosos, asma, úlcera, anemias, tumores, doenças do fígado, diarreia, icterícia, erupções cutâneas entre outros.

O grupo pretende a partir deste histórico de utilização do Kefir, examinar mudanças quantitativas em membros específicos da microbiota de camundongos pela ação do probiótico, e sua possível influência na expressão gênica das células epiteliais do intestino.

Para tal, será realizada uma quantificação comparativa do material genético da microbiota de camundongos tratados e não tratados (controle) com Kefir por gavagem. Serão utilizadas as linhagens *Bifidobacterium spp*, *E. coli*, *C. difficile*, *B. fragilis*, *Lactobacillus spp* e bactérias totais, recolhidas e purificadas a partir das fezes dos camundongos e então submetidas a RT-PCR para a quantificação do material genético.

Para a avaliação da expressão gênica, serão utilizadas células epiteliais do intestino dos dois grupos de camundongos (tratados e não-tratados) que terão seu mRNA purificado e comparado em CHIP de microarranjo.

### **Crítica:**

Apesar do extenso uso do Kefir como probiótico, existem poucos trabalhos publicados acerca do assunto e os existentes estão voltados para o leite fermentado e não para o Kefir em geral, o que torna o projeto de extrema relevância. Uma vez que, se comprovada a ação do mesmo na microbiota dos camundongos e, principalmente, na expressão gênica do epitélio intestinal, seu uso poderá ser melhor direcionado e novos estudos poderão ser feitos para testar as demais propriedades deste probiótico.

Convém, entretanto, que o grupo também utilize gavagem no grupo controle, de forma a padronizar o nível de estresse dos animais.

O único empecilho para a realização do projeto é a questão financeira, pois pretende-se fazer microarranjo com uma quantidade grande de camundongos e o processo necessitará ser repetido várias vezes para melhorar a amostragem dos genes.

## **7. Construção de bactérias verdes fluorescentes para uso didático.**

### **Resumo:**

O grupo pretende construir uma linhagem de *E. Colli* fluorescente para uso nas escolas e demonstração do processo de clonagem.

Será realizada a inserção de uma GFP (proteína verde fluorescente) em um plasmídeo 322 clivado com enzima de restrição e desfosforilado para facilitar a inserção. Os insertos serão amplificados por PCR e pequenas amostras de cada ciclo serão analisadas em gel de Agarose.

Os vetores serão então incubados com duas linhagens de *E. Colli* para que haja transformação das mesmas induzida por choque térmico. As colônias transformadas serão selecionadas em meios com ampicilina e tetraciclina e então utilizadas didaticamente para demonstração dos processos de reprodução bacteriana.

### **Crítica:**

O projeto é interessante para apoio didático por que *E. Colli* é um organismo modelo não só em genética, mas em outras áreas como a microbiologia e porque é de fácil cultivo e manutenção. Entretanto, torna-se inviável pois existem outras técnicas para o ensino de reprodução bacteriana, utilizando linhagens auxotróficas para determinados nutrientes, ou seja, dependentes da adição destes nutrientes ao meio de cultura e que podem ser plaqueadas em meios diferenciais que exibem as colônias com diferentes colorações, sem a necessidade de recombinar as bactérias ou de usar antibióticos nas culturas. Essas técnicas mostram-se, hoje, extremamente baratas, de fácil acesso e manuseio, tornando a criação de uma linhagem fluorescente um processo dispendioso e, infelizmente, desnecessário.

Todavia, não se pode negar que seria divertido e envolvente aos alunos trabalhar com bactérias fluorescentes do que colônias coloridas, nas quais as cores nem sempre são bem distinguíveis.