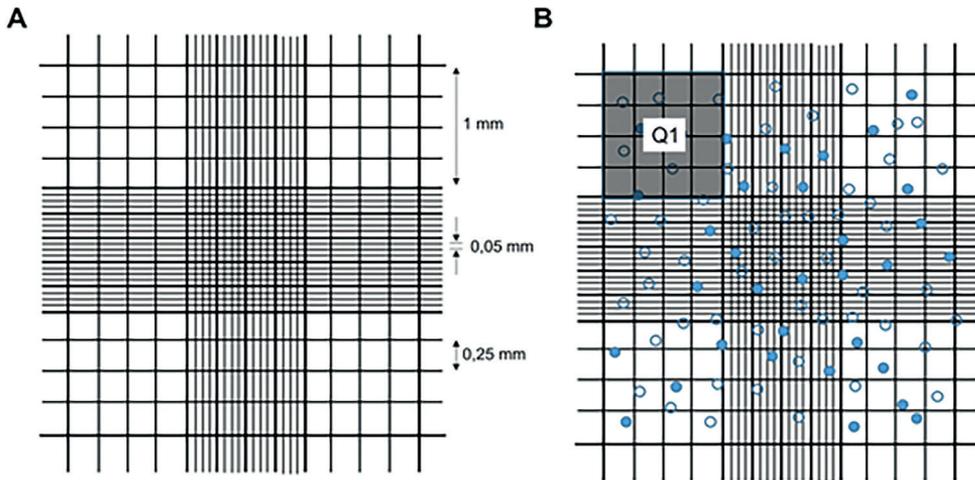


GERAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES NOCAUTEADAS TRANSFECCÃO DE CÉLULAS 293T, TITULAÇÃO VIRAL, CÁLCULO DA MULTIPLICIDADE DE INFECCÃO (M.O.I) E TRANSDUÇÃO DA CÉLULA-ALVO

Em determinados experimentos, são utilizadas quantidades determinadas de células, portanto, é necessário quantificá-las. A quantificação celular pode ser feita de maneira direta, utilizando-se a contagem de células na câmara de Neubauer. Essa câmara consiste de uma lâmina contendo nove quadrados que medem 1 mm^2 (Figura 17), mas apenas os quatro quadrados externos são utilizados na contagem celular. Para quantificação das células utilizando-se a câmara de Neubauer, as células devem estar em suspensão, resultante do processo de tripsinização, quando se tratar de células aderentes.

Figura 17. Esquema do aspecto da câmara de Neubauer.



A) Representação da grade de 3 mm x 3 mm da câmara de Neubauer, subdividida em 9 quadrantes de 1 mm cada. B) Em destaque, um quadrante (Q1) com células azul de tripano positivas (células não viáveis) e células azul de tripano negativas (células viáveis).

Após aplicação da suspensão celular à câmara de Neubauer, deve-se colocar uma lamínula sobre a mesma, de modo que as células sejam distribuídas pela câmara. O espaço que se formará entre a lamínula e a câmara será de 0,1 mm, fazendo com que o volume em cada quadrante corresponda a 0,1 mm³. Assim, as células contadas em um quadrante e contidas em 1 mL, correspondem ao valor de contagem multiplicado pelo fator de correção da câmara que é igual a 10⁴.

Dessa maneira, o número de células por mL de uma suspensão celular é obtido pela equação a seguir. Tendo em mãos o número de células, é possível realizar cálculos para aliquotar, a partir da suspensão celular, o volume correspondente à quantidade de células necessárias para o plaqueamento de diferentes experimentos.

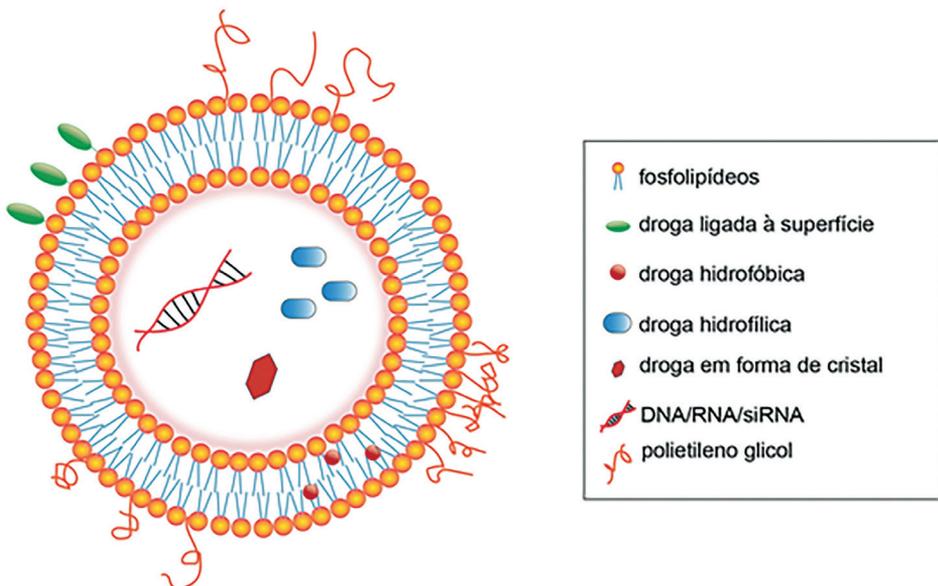
$$\text{Número de células por ml} = (Q1+Q2+Q3+Q4)/4 \times 10^4 \times \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Transfecção é um método de transferência gênica que facilita o estudo e controle da expressão gênica. A principal dificuldade encontrada para a inserção de DNA em uma célula é a ultrapassagem da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática das células, uma vez que, assim como o DNA, esta também é negativamente carregada, gerando um efeito de repulsão eletrostática. Para contornar essa dificuldade, utiliza-se, principalmente, lipossomos, que são estruturas de caráter anfílico, sendo constituídos por lipídios, que podem ser

catiônicos ou aniônicos. Portanto, os lipossomos possuem uma região polar, que permite a interação com o DNA, e uma região apolar, que permite sua passagem pela bicamada lipídica (Figura 18). Dessa maneira, torna-se possível a introdução de ácidos nucleicos exógenos, bem como de outras substâncias hidrofílicas, nas células.

No caso particular de transfecção para a produção de partículas virais, são introduzidos diferentes plasmídeos nas células, sendo que cada um é responsável pela produção de um elemento viral. O tipo viral mais utilizado, para transferência gênica, é o lentivírus, que faz parte da família dos retrovírus, tendo, em comum com estes as características de possuir RNA como material genético e utilizar a ação da enzima transcriptase reversa, codificada no genoma viral, para sintetizar DNA a partir de RNA. Os lentivírus são amplamente utilizados para a entrega de material genético por possuírem baixa imunogenicidade, conseguirem transferir grandes sequências para as células-alvo, se integrarem de forma estável do genoma hospedeiro e, por fim, serem capazes de transformar até mesmo células quiescentes (não proliferantes). O uso de diferentes plasmídeos codificando para os diferentes genes virais (gag, pol, env) foi adotado nos sistemas mais avançados de transferência gênica via lentivírus para garantir maior biossegurança, impedindo a geração de partículas virais virulentas.

Figura 18. Estrutura de um lipossomo.



É importante ressaltar que a manipulação de lentivírus, deve ser realizada em instalação que atenda aos parâmetros do nível 2 de biossegurança (NB2), determinados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Além disso, as pessoas que manipulam as partículas lentivirais devem estar devidamente paramentadas e treinadas.

Para que seja possível a produção viral, as células 293T são utilizadas em nosso laboratório, sendo cotransfectadas com quatro plasmídeos diferentes, a saber: a) plasmídeo de empacotamento, que contém os genes gal-pol (responsáveis por codificar as proteínas estruturais do capsídeo viral, a enzima transcriptase reversa e as integrases e proteases virais); b) plasmídeo contendo os genes que codificam proteínas do envelope viral; c) plasmídeo contendo sequências regulatórias virais; e d) plasmídeo contendo a sequência de interesse, chamado de vetor de transferência. Esse vetor de transferência possui a sequência gênica da endonuclease Cas9 e a sequência guia que conduzirá a enzima até o sítio onde se deseja fazer a edição. Uma vez dentro das células, a maquinaria celular se encarrega da montagem das partículas lentivirais.

O meio de cultura contendo as partículas lentivirais é coletado após 24, 48 e 72 h da transfecção. É necessário saber quantas partículas lentivirais foram produzidas, de modo que seja possível adicionar uma quantidade determinada de vírus/célula na etapa de infecção. A esse processo de quantificação viral, dá-se o nome de Titulação Viral. De posse da quantificação viral, a próxima etapa é a determinação da multiplicidade de infecção (M.O.I – *multiplicity of infection*). Essa variável representa quantas partículas lentivirais irão infectar cada célula, ou seja, se é estabelecida uma M.O.I 10, significa que os cálculos realizados serão para que haja 10 partículas lentivirais por célula. Tendo determinado a M.O.I, parte-se para a transdução das células-alvo.

Transdução é o nome dado ao processo através do qual utiliza partículas virais para transferência gênica. Para tanto, os vírus coletados e titulados são colocados em contato com a célula-alvo num volume estabelecido pelo cálculo da M.O.I. Dependendo das características das células a serem transduzidas, é necessário otimizar o processo de transdução, adicionando, por exemplo, uma etapa de centrifugação ao protocolo (epinoculação). Além disso, dependendo da estratégia escolhida para a edição gênica, os vírus que transportam os vetores recombinantes podem ser transduzidos isoladamente (no caso do nocauteamento por inativação gênica) ou podem ser cotransduzidos com diferentes combinações das preparações lentivirais geradas, sendo direcionados às extremidades 5' e 3' do locus do gene-alvo (uma construção GFP positiva + uma construção

resistente à puromicina, por exemplo, no caso de nocauteamento por deleção gênica). Uma vez transduzidas, espera-se que as células passem a apresentar as características genótípicas e fenotípicas conferidas a elas pelo material genético adicionado através do vírus. Por fim, as células transduzidas podem ser selecionadas baseadas na marca de seleção presente no(s) vetor(es) utilizado(s) para a edição gênica.

PROTOCOLO 5

1. Transfecção das células 293T

- Plaquear 1×10^6 células 293T em cada poço de uma placa de 6 poços;
- No dia seguinte, quando a cultura tiver atingido em torno de 80-90% de confluência, preparar a transfecção em dois tubos diferentes da seguinte maneira.

Tubo dos vetores	Tubo da Lipofectamina
150 uL de DME 0% SFB	150 uL de DME 0% SFB
3 ug do vetor de transferência	5 uL de Lipofectamina
0,2 ug do vetor acessório pHGPM2	
0,2 ug do vetor acessório pREV	
0,2 ug do vetor acessório pTAT	
0,4 ug do vetor acessório pVSVG	

- Misturar o conteúdo desses dois tubos em até 5 min;
- Após misturados os volumes desses tubos, aguardar por 20 min para a formação dos complexos lipossomos/DNA;
- Aplicar todo o volume resultante sobre a camada de células 293T, por gotejamento, tomando cuidado para não desfazer a monocamada;
- O volume total de meio de cultura deve ser de 1,5 mL por poço;
- Voltar as culturas para a estufa de CO₂ e trocar o meio após 5 h;
- Realizar coletas do meio contendo as partículas virais após 24, 48 e 72 h;

- As amostras de vírus coletadas podem ser combinadas (o meio coletado após 48 h apresenta maior conteúdo viral) e centrifugadas a 14.500 RPM por 5-10 min a temperatura ambiente para eliminar restos celulares;
- Em seguida, os sobrenadantes, contendo as partículas virais, devem ser filtrados para evitar que células 293T remanescentes contaminem a cultura celular que será transduzida;
- Para isso, usar filtros hidrofílicos com poros de 0,45 μm (exemplos: acetato de celulose, nitrato de celulose, polietersulfona (PES), PVDF);
- Depois de filtrada, as amostras podem ser aliquotadas e congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento em que serão utilizadas.

2. Titulação Viral e Cálculo da Multiplicidade de Infecção (M.O.I)

- Plaquarear 1×10^5 células 293T em cada poço de uma placa de 6 poços;
- Realizar diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} a partir do estoque viral original:
 - Diluição 10^{-1} :** 90 uL de PBSA + 10 uL de vírus estoque;
 - Diluição 10^{-2} :** 90 uL de PBSA + 10 uL da diluição 10^{-1} ;
 - Diluição 10^{-3} :** 90 uL de PBSA + 10 uL da diluição 10^{-2} ;
- Adicionar 20 uL do vírus estoque e 20 uL de cada diluição aos poços da placa já contendo 480 uL de meio com as células (se preferir, pode misturar células, meio e vírus em tubos eppendorfs e depois adicionar os 500 uL resultantes aos poços da placa);
- Trocar o meio 24 h depois;
- Fixar as células, no mínimo, 48 h depois da transdução (para vetor contendo marca de seleção GFP) ou, 10 dias depois da transdução (para vetor contendo marca de seleção de resistência à puomicina);
- Realizar leitura no citômetro para determinação da porcentagem de células GFP positivas;
- Realizar contagem manual do número de colônias resistentes a puomicina;

- De posse da porcentagem de células GFP-positivas e do número de colônias resistentes a puromicina, utilizar a equação a seguir para se obter o título viral em cfu/mL (*colony-forming units per milliliter*):

$$\text{Título (UFC)} = (P \times N / 100 \times V) \times /DF \quad (2)$$

Onde:

P = % de células GFP+ ou nº de colônias resistentes a puromicina

N = número de células no momento da transdução (Ex: 1×10^5)

V = volume da diluição usado para a transdução

DF = fator de diluição

3. Transdução viral da célula-alvo

- Utilizar M.O.I de 10 para cada preparação lentiviral. A M.O.I de 10 é extremamente importante para o sucesso do processo de transdução;
- Preparar suspensão contendo 5×10^3 células/mL para serem plaqueadas em um poço de uma placa de 48 poços;
- Realizar a transdução ou cotransdução, unindo as células-alvo e as partículas virais contendo o vetor(es) recombinante(s);
- O volume total de célula + vírus deve ser de até 500 uL, facilitando, desta forma, a infecção das células pelo vírus;
- Fechar a placa com Parafilm;
- Sedimentar na estufa de CO₂ por 10 min;
- Centrifugar a P48 por 2 h, a 37 °C, 1.200 RPM (espinoculação);
- No dia seguinte, trocar o meio condicionado contendo os vírus por meio fresco;
- A visualização da fluorescência das células transduzidas será possível em, no mínimo, 48 h. As células GFP-positivas podem ser selecionadas por citometria;
- Para as células transduzidas com os vetores contendo a marca de seleção de resistência à puromicina, adicionar a concentração ideal da puromicina 48 h após a transdução para dar início ao processo de seleção.

