

INÊS RAQUEL DA SILVA IRIA

**OPTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE
MANIPULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
EM CÉLULAS PRIMÁRIAS E TECIDOS**

Orientadora: Prof.^a Doutora Paula Videira

Orientadora Interna: Prof.^a Doutora Susana Santos

Co-Orientador: Doutor José Ramalho

Co-orientador: Doutor Diogo Casal

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2014

INÊS RAQUEL DA SILVA IRIA

**OPTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE
MANIPULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES
EM CÉLULAS PRIMÁRIAS E TECIDOS**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica no Curso de Mestrado em Engenharia Biotecnológica, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientadora: Prof.^a Doutora Paula Videira
Orientadora Interna: Prof.^a Doutora Susana Santo
Co-Orientador: Doutor José Ramalho
Co-Orientador: Doutor Diogo Casal

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia

Lisboa

2014

Nota Prévia

Esta dissertação foi escrita em português prévio ao acordo ortográfico de 1990, sendo as suas referências efectuadas segundo o Journal Genetics Research.

Epígrafe

We must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for humanity.

Marie Curie

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus avós
Maria dos Anjos Iria e Ângelo Iria
e aos meus pais
Lourdes Peres e Rui Iria

Agradecimentos

Ao grupo de Glicoimunologia da Faculdade de Ciências Médicas por me receber no seu laboratório e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Professora Doutora Paula Videira pela oportunidade oferecida, por acreditar no meu trabalho e pelo apoio no âmbito desta dissertação.

À Professora Doutora Susana Santos pelo apoio não só durante esta dissertação, mas durante o meu percurso académico, tanto na licenciatura como no mestrado.

Ao Doutor José Ramalho pela disponibilidade e pelo apoio durante a execução desta dissertação.

Ao Doutor Diogo Casal pela oportunidade oferecida, pela possibilidade de poder entrar em contacto com uma aplicabilidade do meu trabalho, pela explicação de toda a parte cirúrgica efectuada, pelo apoio e por acreditar no meu trabalho.

À Professora Doutora Guadalupe Cabral pelo apoio e paciência no decorrer desta tese.

A todo o grupo de Imunologia, nomeadamente, à Doutora Catarina, D. Filomena, D. Glória e D. Luísa que juntamente com o grupo Glicoimunologia, além de contribuírem com a sua experiência contribuíram, em muito para um ambiente fantástico.

Aos doutorandos por sempre me ajudarem quando era preciso, mais concretamente à Mylène Carrascal, à Mariana Silva e ao Hélio Crespo.

Às minhas colegas e adoráveis amigas de laboratório, Graça Marques, Marília Pereira, Maria Reis, Teresa Veríssimo que além de sempre me ajudarem, contribuíam para tempos de espera/serões muito bem passados, geralmente envolvendo uma grande quantidade e variedade de doces.

À Diana Sousa e Cláudia Reforço, estudantes de licenciatura, que embora tenham estado pouco tempo no laboratório, também contribuíram para o seu bom ambiente.

A todo o grupo de Biologia Celular e Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas que sempre se demonstraram disponíveis para esclarecer dúvidas e possibilitarem a utilização dos laboratórios.

Aos meus professores que me ensinaram e encaminharam durante a licenciatura e o mestrado em Engenharia Biotecnológica, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Aos meus colegas e amigos de mestrado Mário Bordalo e André Tavares, que sempre me incentivaram e apoiaram.

À minha “monstruosa” amiga Catarina Santos, mesmo com as suas atitudes orgânicas, à doce e muito mutável vegetariana Andreia Melo e à apaixonada e sonolenta Bruna Valdez, que me acompanharam durante todo o meu percurso universitário, proporcionando ótimos momentos para recordar, e uma amizade para a vida.

Aos meus colegas e amigos de licenciatura, Cátia Almeida, Frederico Seco, Andreia Revéz, Daniela Ferreira, João Jesus, Jorge Poeiras e Tânia Pires com os quais sempre passei uns bons momentos e que sempre “estiveram lá” para os bons e maus momentos.

Ao meu padrinho de praxe Bruno Alves que sempre me apoiou e ajudou sempre que precisei.

Aos meus amigos Susana Oliveira, Carolina Santos, Sara Pinto, Mariana Silva, Margarida Silva e Nuno Carreira, pela amizade, boa disposição e apoio incondicional.

Agradeço também à minha família que sempre me apoiou. À minha mãe Maria de Loures Silva, ao meu pai Rui Iria, ao meu irmão Hugo Iria, aos meus avós Maria dos Anjos e Ângelo Iria. Um agradecimento especial às minhas priminhas Ana Sofia Duque, Sara Teixeira e Carolina Teixeira, e priminhos Daniel Iria e André Duque, pela nossa relação de “tortura” mútua muito saudável.

Resumo

As infecções cirúrgicas são um dos principais problemas a nível hospitalar, contribuindo para o sofrimento dos doentes devido à dor, atraso na cicatrização e consequentemente aumento do tempo de hospitalização. Representam 13% das infecções nosocomiais, dos quais 56,9% são devidas a infecções do local cirúrgico. Esta problemática encontra-se muitas vezes associada a microorganismos com várias resistências antimicrobianas, como a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (incluindo o *S. aureus* metilicilino-resistente), consequência da utilização de antibióticos de largo espectro. Como tal, pretendeu-se contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de combate a infecções cirúrgicas, através da sobreexpressão de péptidos antimicrobianos, nomeadamente, a utilização de β -defensinas humanas (HBD). Esta sobreexpressão foi efectuada utilizando vectores lentivirais, contendo os respectivos genes, que foram introduzidos no modelo cirúrgico com ratos *Wistar*. De modo a verificar a capacidade antimicrobiana das HBD seleccionadas, procedeu-se previamente ao estabelecimento e caracterização de culturas das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*. Posteriormente estas bactérias foram usadas para infectar o modelo cirúrgico, obtendo-se diferentes graus de infecção consoante a concentração de bactérias utilizadas.

Verificou-se em resultados preliminares, uma diminuição da proliferação das bactérias presentes nos modelos cirúrgicos, sempre que se introduziam vectores lentivirais expressando os genes que codificam as HBD.

Mais estudos estão a decorrer por forma a confirmar o papel antimicrobiano das HBD no modelo de infecção.

Palavras-Chaves: β -defensinas humanas (HBD); Infecções cirúrgicas; Lentivírus; Péptidos antimicrobianos (AMP); Retalhos venosos arterializados (RVA)

Abstract

Surgical infections are a major problem in hospital, contributing to the suffering of the patients due to pain, delayed healing and, hence increased length of hospitalization. These infections represent 13% of nosocomial infections, of which 56.9% are due to surgical site infections. This problem is often associated with antimicrobial resistance of various microorganisms, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), as a consequence of the use of broad spectrum antibiotics.

In this thesis, it was intended to contribute to the development of new strategies to combat surgical infections, through the overexpression of antimicrobial peptides, in particular, the use of human β -defensins (HBD). HBD overexpression was performed using lentiviral vectors containing the respective genes which have been introduced in the surgical model with rats. In order to verify the efficacy of HBD, we first optimized and characterized cultures of *P. aeruginosa* or *S. aureus* bacteria. Thereafter these bacteria were used to infect the surgical model, obtaining different degrees of infection depending on the concentration of bacteria used.

Preliminary results, revealed a decrease in the proliferation of bacteria in surgical models, where lentiviral vectors expressing the HBD genes were introduced.

Further studies are in progress in order to confirm the antimicrobial role of HBD in the infection rat model.

Key Words: Human β -defensins (HBH), surgical infections, lentivirus, antimicrobial peptides (AMP), arterialized venous free flaps

Résumé

Infections chirurgicales sont un problème majeur à l'hôpital, ce qui contribue à la souffrance des patients en raison de la douleur, retard de cicatrisation et, par conséquent, la longueur accru d'hospitalisation. Ces infections représentent 13% des infections nosocomiales, dont 56,9% sont dus à des infections du site opératoire. Ce problème est souvent associée à la résistance aux antimicrobiens de divers micro-organismes tels que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (comprend *S. aureus* résistant à la méthicilline), comme une conséquence de l'utilisation d'antibiotiques à large spectre.

Dans cette thèse, il a été conçu pour contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre les infections chirurgicales, par la surexpression de peptides antimicrobiens, en particulier, l'utilisation des β -défensines humaines (HBD). HBD surexpression a été réalisée en utilisant des vecteurs lentiviraux contenant les gènes respectifs qui ont été introduites dans le modèle chirurgical avec des rats. Afin de vérifier l'efficacité de la HBD, nous avons d'abord optimisé et caractérisé bactéries cultures de *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Par la suite, ces bactéries ont été utilisés pour infecter le modèle chirurgicale, en obtenant des degrés différents de l'infection en fonction de la concentration des bactéries utilisées.

Les résultats préliminaires ont révélé une diminution de la prolifération de bactéries dans des modèles de chirurgie, où les vecteurs lentiviraux exprimant les gènes ont été introduits des HBD.

Des études supplémentaires sont en cours dans le but de confirmer le rôle de HBD antimicrobien dans le modèle de rat de l'infection.

Mots clés: β -défensines humaines (HBD), infections chirurgicales, lentivirus, peptides antimicrobiens (AMP), lambeau veineux artérialisé libre.

Índice

Nota Prévia.....	i
Epígrafe	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Résumé.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xvi
1. Introdução	1
1.1.Infecções bacterianas a nível cirúrgico	1
1.2.Resistência a antibióticos.....	1
1.3.Infecções bacterianas em retalhos venosos arterializados	2
1.4.Péptidos antimicrobianos.....	7
1.4.1.Aspectos estruturais dos péptidos antimicrobianos	8
1.4.2.Actividade biológica dos péptidos antimicrobianos	9
1.4.3.Aplicação clínica de péptidos antimicrobianos.....	11
1.4.4.Defensinas.....	12
1.5.Métodos de expressão de proteínas recombinantes em eucariotas	16
1.5.1.Vectores não-virais.....	17
1.5.2.Vectores virais	18
1.5.2.1. Vectores adenovirais	19
1.5.2.2. Vectores lentivirais	20
1.5.2.2.1. Produção viral.....	20
1.5.2.2.2. Aplicações clínicas de lentivírus em infecções.....	22
1.6.Resposta imunológica	22
2. Materiais e Métodos	25
2.1.Produção de DNA plasmídicos em células bacterianas	25
2.1.1.DNA plasmídicos	25
2.1.2.Transformação bacteriana	25
2.1.3.Extracção e quantificação dos DNA plasmídicos.....	26
2.1.4.Avaliação da integridade do DNA plasmídico em electroforese em gel de agarose.....	27
2.2.Cultura e manutenção de linhas celulares	27
2.3.Armazenamento das linhas celulares	29

2.4.Obtenção de culturas primárias – células dendríticas derivadas de monócitos humanos	29
2.4.1.Método de separação por coluna imunomagnética LS.....	29
2.4.2.Método de aderência celular ou “ <i>Panning</i> ”	31
2.5.Produção dos lentivírus na linha celular HEK293FT	32
2.6.Transdução lentiviral em linhas celulares e células primárias	34
2.6.1.Marcação de linhas celulares.....	35
2.7.Ensaio funcionais <i>in vitro</i>: ensaios de sensibilidade antimicrobiana às β-defensinas	36
2.7.1.Estudo da curva de crescimento das células bacterianas utilizadas	36
2.7.2.Ensaio de sensibilidade antimicrobiana – Ensaio de difusão radial.....	37
2.8.Transdução lentiviral e estudos funcionais <i>in vivo</i>	38
2.8.1.Transdução lentiviral no modelo animal	39
2.8.2.Transdução lentiviral e inoculação bacteriana no modelo animal	39
2.8.3.Recolha de amostras do modelo <i>in vivo</i> para quantificação bacteriana	40
3. Resultados e Discussão	42
3.1.DNA plasmídicos.....	42
3.2.Produção dos lentivírus na linha celular HEK293FT	44
3.3.Transdução das linhas celulares e células primárias.....	45
3.4.Transdução dos tecidos	52
3.5.Avaliação da sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	53
3.5.1.Avaliação da sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i>	54
3.6.Avaliação da actividade antimicrobiana das β -defensinas no modelo <i>in vivo</i>	57
4. Conclusões e Perspectivas Futuras	60
Referências	61
Apêndices	I
Anexos.....	X

Índice de Figuras

Figura 1	Esquema dos quatro tipos de retalhos venosos descritos pela primeira vez na clínica	3
Figura 2	Esquema do modelo de infecção viral e bacteriana nos retalhos venosos arterializados, em ratos <i>Wistar</i> , utilizado pelo Doutor Diogo Casal	5
Figura 3	Esquema do modelo de infecção viral nos retalhos de fluxo convencional, em ratos <i>Wistar</i> , utilizado pelo Doutor Diogo Casal	6
Figura 4	Esquema do modelo de infecção viral nos retalhos venosos arterializados, em ratos <i>Wistar</i> , utilizado pelo Doutor Diogo Casal	7
Figura 5	Vectores utilizados em terapia genética em ensaios clínicos	17
Figura 6	Confirmação da integridade do pDNA pLKO.1, por electroforese em gel de agarose a 1% (m/v), 100V, 1,5h	43
Figura 7	Confirmação do pDNA pLKO.1 por electroforese em gel de agarose a 1% (m/v), 100V, 2h	43
Figura 8	Produção dos lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 às 48 h (A e C) e 72 h (B e D) em HEK293FT	45
Figura 9	Transdução com diferentes volumes de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha CHO-P. Inoculação com 25 µL (A), 50 µL (B), 75 µL (C) e 100 µL (D) de lentivírus	46
Figura 10	Transdução com diferentes volumes de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G2 na linha CHO-P. Inoculação com 25 µL (A), 50 µL (B), 75 µL (C) e 100 µL (D) de lentivírus	46
Figura 11	Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293FT. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C) de lentivírus ao 7º dia	48
Figura 12	Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G2 na linha HEK293FT. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C) de lentivírus ao 7º dia	47

Figura 13	Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C), 100 µL/mL (D) de lentivírus ao 14 ^o dia	47
Figura 14	Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G2 na linha HEK293. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C), 100 µL/mL (D) de lentivírus ao 14 ^o dia	48
Figura 15	Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293. Inoculação com 0 µL/mL (A-D) (controlo), 25 µL/mL (E-H), 100 µL/mL (I-L), de lentivírus ao 7 ^o dia. Marcação com Sytox Green	49
Figura 16	Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293A. Inoculação com 0 µL/mL (A-L) (controlos) e 100 µL/mL (M-X), de lentivírus ao 14 ^o dia. Marcação com Sytox Green	50
Figura 17	Transdução com 10 ⁶ partículas lentivirais resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 em monócitos (D-F) e os respectivos controlos (A-C), 10 ^o dia após transdução	51
Figura 18	Monócitos (A e B) e células dendríticas (C) transduzidos com 10 ⁶ do G1 de pDNA no 0 ^o , 3 ^o e 6 ^o (imagem recolhida no 14 ^o dia)	52
Figura 19	Imagens de microscopia de fluorescência de tecidos transduzidos com GFP, utilizando lentivírus como vector de expressão e respectivo controlo, em ratos <i>Wistar</i>	53
Figura 20	Teste de sensibilidade microbiana em <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (após 24h)	55
Figura 21	Teste de sensibilidade microbiana em <i>Staphylococcus aureus</i> (CIP 106760) (MRSA) (após 24h)	56
Figura 22	Gráfico representativo do número de UFC obtidas através da maceração dos RVA nos ratos <i>Wistar</i> (10 dias após inoculação)	58
Figura 23	Ratos <i>Wistar</i> submetidos à operação por RVA e inoculados com 10 ⁴ UFC/mL de <i>P. aeruginosa</i> CECT 110 ⁺	59

Índice de Tabelas

Tabela 1	β -defensinas Humanas (hBD): Localização do gene e locais de expressão	4
Tabela 2	Capacidade antimicrobiana das hBD-1, hBD-2, hBD-3 e hBD-4.....	15
Tabela 3	DNA plasmídicos utilizados	25
Tabela 4	Pureza dos pDNA obtida por espectrometria	43
Tabela 5	Ensaio de sensibilidade antimicrobiana à gentamicina, rr BD-4 e rr BD-3 em <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	55
Tabela 6	Ensaio de sensibilidade antimicrobiana à gentamicina, rr BD-4 e rr BD-3 em <i>Staphylococcus aureus</i> (CIP 106760) (MRSA)	55

Índice de Apêndices

Apêndice I	Composição das soluções utilizadas	I
Apêndice II	DNA plasmídico portadores DNA complementar que codifica as proteínas hBD-2 e hBD-3	VI
Apêndice III	Curvas de crescimento bacteriano da <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	VII
Apêndice IV	Curvas de crescimento bacteriano da <i>Staphylococcus aureus</i> (CIP 106760) (MRSA)	VIII
Apêndice V	Sensibilidade antimicrobiana	IX

Índice de Anexos

Anexo I	Informação sobre a hBD-2	XI
Anexo II	Informação sobre a hBD-3	XII
Anexo III	DNA plasmídico pMD2.G	XIII
Anexo IV	DNA plasmídico psPAX2	XIV
Anexo V	DNA plasmídico pMDLg/pRRE	XV
Anexo VI	DNA plasmídico pRSV-Rev	XVI
Anexo VII	DNA plasmídico pLL3.7	XVII
Anexo VIII	DNA plasmídico pLKO.1_TRC005	XVIII

Lista de Abreviaturas e Siglas

A260	-	Absorvância a 260 (nm)
A280	-	Absorvância a 280 (nm)
AMP	-	Péptido (s) Antimicrobiano (s) (do inglês <i>Antimicrobial Peptides</i>)
BD	-	Defensina (s) Humana (s) (do inglês <i>β-Defensins</i>)
bp	-	Par de bases nucleotídicas (do inglês <i>base pair</i>)
BSA	-	Albumina bovina sérica (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD	-	Antigénios de diferenciação (do inglês <i>Cluster of Differentiation</i>)
CHO-P	-	<i>Chinese Hamster Ovary expressing P-selectin</i>
cm	-	Unidade de comprimento - centímetro
DC	-	Célula (s) Dendrítica (s) (do inglês <i>Dendritic Cells</i>)
DMEM	-	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	-	Dimetilsulfóxido (do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	-	Densidade óptica
DO₆₀₀	-	Densidade óptica a 600nm
DsRED	-	<i>Dicosoma sp. Red Fluorescent Protein</i>
EB	-	Efeito Bacteriostático
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediaminetetra acetic acid</i>)
FBS	-	Soro Fetal Bovino (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FITC	-	Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
g	-	Unidade de massa – grama (s)
g	-	Unidade de aceleração - força-gravitational
G1	-	Grupo 1 de pDNA utilizados na formação dos lentivírus (pMD2.G e psPAX2)
G2	-	Grupo 2 de pDNA utilizados na formação dos lentivírus (pMD2.G, pMDLg/PRRE e pRSV-Rev)
GFP	-	Proteína Verde Fluorescente (do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GM-CSF	-	Factor de estimulação de colónias granulócitos-macrófagos (do inglês <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating factor</i>)
h	-	Unidade de tempo – hora (s)
hBD	-	β -Defensina (s) Humana (s) (do inglês <i>Human β-Defensins</i>)
HD	-	Defensina (s) Humana (s) (do inglês <i>Human Defensins</i>)

HEK293	-	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HNP	-	Péptido (s) do (s) Neutrófilo (s) Humano (s) (do inglês <i>Human Neutrophil Peptide</i>)
IL-4	-	Interleucina 4 (do inglês <i>Interleukin 4</i>)
LB	-	<i>Luria-Bertani broth</i>
LD50	-	Dose que reduz as UFC em 50%
LD90	-	Dose que reduz as UFC em 90%
M	-	Unidade de quantidade de matéria – molar (es)
MEM	-	<i>Minimum Essencial Media</i>
mg	-	Unidade de massa – miligrama (s)
MHC	-	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIC	-	Concentração Mínima Inibitória
mm	-	Unidade de comprimento – milímetro (s)
mM	-	Unidade de quantidade de matéria – milimolar (es)
min	-	Unidade de tempo – minuto (s)
mL	-	Unidade de volume – mililitro (s)
m/v	-	Unidade de concentração - massa/volume
nm	-	Unidade de comprimento – nanómetro (s)
p.a.	-	Para análise (do inglês <i>Pro analysi</i>)
PBS	-	Tampão Fosfato Salino (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEI	-	Polyethylenimine
pLKO.1	-	Vector plasmídeo portador do gene DsRed (do inglês <i>pGK DsRed TRC Cloning Vector</i>)
r.g.	-	Pureza do reagente (do inglês <i>Reagent grade</i>)
RNA	-	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	-	Rotações por minuto
rr BD-3	-	Proteína recombinante de rato β -defensina 3
rr BD-4	-	Proteína recombinante de rato β -defensina 2
RT-PCR	-	Reacção em cadeia da <i>polimerase</i> – em tempo real (do inglês <i>Real Time - Polymerase chain reaction</i>)
RVA	-	Retalho (s) Venoso (s) Arterializado (s)
UFC	-	Unidades formadoras de colónias
V	-	Unidade de tensão eléctrica – volt (es)

- VEGF** - Factor de crescimento endotelial vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)
- v/v** - Unidade de concentração – volume/volume
- μL** - Unidade de volume – microlitro (s)

1. Introdução

1.1. Infecções bacterianas a nível cirúrgico

As infecções cirúrgicas são um dos principais problemas a nível hospitalar. Estas contribuem para o sofrimento dos doentes devido à dor, atraso na cicatrização e consequentemente aumento do tempo de hospitalização pós-operatório.

A infecção do local cirúrgico é uma das infecções associadas aos cuidados de saúde mais frequente. No Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção realizado em 2010 estas infecções representavam 13% das infecções consequentes aos cuidados prestados no hospital (Pina *et al.*, 2012). Sendo que a 77,8% dos doentes com infecções hospitalares foi efectuado um estudo microbiológico para diagnóstico etiológico da infecção, tendo a frequência sido maior nos doentes com infecção hematogénea (83,9%), infecção das vias urinárias (78,4%), infecções do local cirúrgico (56,9%), infecções osteoarticulares (55%) e infecções da pele e tecidos moles (47,4%). Os principais microorganismos responsáveis por estas infecções foram a *Escherichia coli* (15,33%), *Pseudomonas aeruginosa* (14,04%), *Staphylococcus aureus* (19,40%), dos quais 69,2% são *Staphylococcus aureus* metilicilino-resistente (MRSA) (Pina *et al.*, 2010). No controlo destas infecções, geralmente, são utilizados antibióticos de largo espectro, o que promove o desenvolvimento de resistências por parte das bactérias (Osswald *et al.*, 2012).

1.2. Resistência a antibióticos

A resistência das bactérias aos antibióticos é um problema crescente em todo o mundo (Osswald *et al.*, 2012; Pina *et al.*, 2012; Pina *et al.*, 2010; Wright, 2013), que tem vindo a verificar-se desde há algumas décadas. A resistência a antibióticos é um fenómeno natural em bactérias, que resulta da selecção de elementos genéticos que conferem a capacidade de estas crescerem na presença de compostos que de outro modo seriam tóxicos. A capacidade das bactérias adquirem resistência antibióticos por meio de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposões, é um fenómeno reconhecido em várias estirpes bacterianas (Bhullar *et al.*, 2014; Wright, 2013). Neste contexto, existirá sempre a necessidade de investigar novos compostos no controlo de bactérias resistentes, no entanto a surgimento de novos antibióticos não é suficiente para resolver o problema das resistências a longo prazo (Wright, 2013). Embora o surgimento de resistência por parte das bactérias seja um fenómeno natural, a velocidade com que ocorre pode ser diminuída.

A utilização indiscriminada de antibióticos de largo espectro e/ou utilização de concentrações de antibióticos incorrectas são algumas das principais causas do surgimento das resistências bacterianas. Como tal, quando a administração de antibióticos é correctamente efectuada, no que respeita à especificidade e concentração, o risco do surgimento de resistência a antibióticos é diminuído (Burke, 2001; Caldeira *et al.*, 2006; Osswald *et al.*, 2012).

A utilização profiláctica dos antibióticos, associada a uma assepsia rigorosa durante o procedimento cirúrgico é fundamental no suporte da cirurgia moderna, reduzindo significativamente o risco de infecção da ferida cirúrgica (Burke, 2001; Caldeira *et al.*, 2006). No entanto, as infecções adquiridas pós-cirurgia afectam ainda uma quantidade significativa de indivíduos, com impacto nas taxas de mortalidade e morbilidade (Caldeira *et al.*, 2006; Pina *et al.*, 2012; Pina *et al.*, 2010). Num estudo feito em Portugal em 2006 verificou-se que a taxa média de infecção pós-cirúrgica foi de 1,7%, sendo que a sua incidência variou de acordo com o tipo e o local da intervenção cirúrgica (Caldeira *et al.*, 2006).

1.3. Infecções bacterianas em retalhos venosos arterializados

No caso particular de infecções em indivíduos com feridas crónicas (Ghali *et al.*, 2009), com síndrome de pé diabético, úlceras e osteomielites crónicas que em estágios avançados podem levar a desbridamento ou a amputação das zonas afectadas, há que optar por outras medidas, que não apenas a antibioterapia, de modo a evitar que a infecção se espalhe para o resto do corpo (Schirmer *et al.*, 2013). Quando se recorre ao desbridamento cirúrgico é necessário uma transferência de tecidos, sendo um exemplo desta transferência a utilização de retalhos vascularizados, que embora tenham sido obtidas boas taxas de sucesso, possuem limitações vasculares (Schirmer *et al.*, 2013). Como tal, cada vez mais tem sido necessário recorrer-se a outros tipos de procedimentos, nomeadamente a utilização de retalhos venosos arterializados (RVA), em que o fluxo arterial é realizado através de uma veia aferente e o fluxo venoso através de uma veia eferente, envolvendo uma menor morbilidade do local dador (Woo *et al.*, 2007).

Os retalhos venosos são definidos como retalhos de pele e as respectivas veias subcutâneas, sendo que nestes retalhos o fluxo sanguíneo efectuado através do sistema venoso (Nakayama *et al.*, 1981). A classificação dos retalhos venosos utilizados na área clínica foi pela primeira vez introduzida em 1991 por Chen e colaboradores, em que reportaram quatro tipos de retalhos venosos. O Retalho Tipo I possui somente perfusão

venosa, em que a veia do retalho está anastomada a duas veias; o Retalho Tipo II possui somente perfusão venosa, em que uma das extremidades da veia está intacta, enquanto a outra está anastomada a outra a outra veia adjacente; o Retalho Tipo III possui uma perfusão venosa arterializada com uma fístula artéria-veia aferente, onde a anastomose distal foi feita de uma artéria a uma veia e a anastomose proximal foi feita de veia para veia; e o Retalho Tipo IV possui uma perfusão venosa totalmente arterializada em que as duas extremidades do retalho estão conectadas a artérias (Chen *et al.*, 1991) (Figura 1).

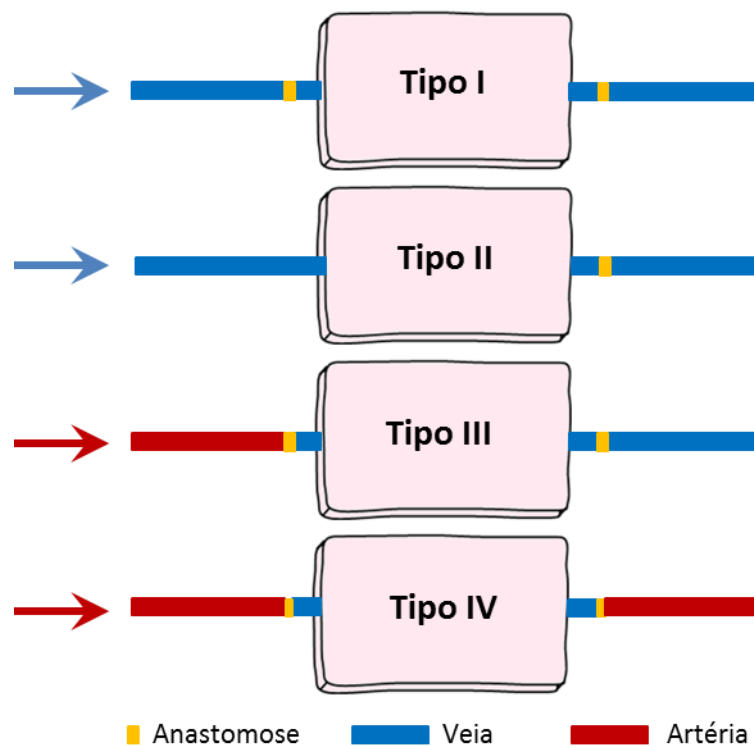


Figura 1 – Esquema dos quatro tipos de retalhos venosos descritos pela primeira vez na clínica

Como os retalhos venosos não envolvem o sistema arterial para a oxigenação dos tecidos, uma vez que o sangue arterial utiliza o sistema venoso, não é necessário sacrificar uma artéria principal do local dador do retalho, como tal, a dissecação dos tecidos é menos profunda, uma vez que as veias se encontram a um nível de profundidade mais superficial (Fasika & Stilwell, 1993; Woo *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011). Deste modo, o procedimento de dissecação é mais fácil e envolve uma menor morbilidade do local dador (Woo *et al.*, 2007). Estes retalhos são facilmente concebidos e colhidos com uma boa qualidade, são finos e flexíveis, não possuem nenhuma limitação do local dador, podendo ser transferido como um retalho puro, mas também como compósito incluindo retalhos com tendões e nervos, bem como enxertos de veias e gordura subcutânea, como tal, podem ser utilizados na microcirurgia e cirurgia reconstrutiva, especialmente para reconstruir tendões e vasos

afectados, sendo este tipo de retalhos indicados para a reparação de tecidos moles em mãos e dedos, incluindo lesões digitais (Cho *et al.*, 1999; Fasika & Stilwell, 1993; Nishi *et al.*, 1989; Woo *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011).

Os RVA envolvem pelo menos uma anastomose arterial e uma anastomose venosa na zona receptora (Kawakatsu *et al.*, 2013). Foram introduzidos pela primeira vez em 1981 por Nakayama *et al.* num estudo experimental, sendo em 1987 aplicados na clínica. Têm sido aplicados, principalmente, na cirurgia reconstrutiva, obtendo-se melhores resultados que os estudos iniciais que utilizavam somente o sistema venoso (Chen *et al.*, 1994). Existe um consenso universal no que se refere à maior viabilidade e confiabilidade do retalho venoso convencional face à do RVA, sendo que estes resultados dependem do local dador e do tamanho do retalho (Chen *et al.*, 1994).

No entanto, a nutrição dos retalhos ainda não se encontra completamente explicada, sendo que se acredita que o mecanismo de troca de fluídos em microcirculação é essencial para explicar a sobrevivência destes retalhos. A troca de fluídos/nutrientes entre os capilares e os tecidos circundantes ocorre quando o fluxo fica detido por alguns segundos, sendo que esta troca ocorre independentemente da direcção do fluxo dentro do capilar. Uma vez que apenas 25 a 30% do teor do sangue arterial é utilizado em circunstâncias normais, pensa-se que os nutrientes adequados à sobrevivência do retalho permanecem disponíveis (Fasika & Stilwell, 1993). Outro problema relacionado com este tipo de retalho é a taxa de necrose associada, principalmente, devido à presença de infecção (Woo *et al.*, 2007). Como tal, no Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciência Médicas da Universidade Nova de Lisboa, encontra-se a decorrer um estudo da autoria do Doutor Diogo Casal que se propõem a contribuir para uma melhor compreensão da arquitectura vascular dos RVA desde a fase inicial do levantamento do retalho até este se encontrar completamente integrado na sua zona receptora. Para esse efeito, estão a utilizar um RVA da parede abdominal ventro-lateral do rato *Wistar*, que já foi validado no trabalho original de Nakayama (Nakayama *et al.*, 1981) e modificado subsequentemente por Wungcharoen (Wungcharoen *et al.*, 2001). Este modelo foi estudado num número relativamente diminuto de animais, que foram observados durante um período máximo de 21 dias após a elaboração do retalho, pelo que persiste um hiato significativo na literatura relativamente ao comportamento destes retalhos em modelos experimentais ao longo de um período mais alargado.

Como referido anteriormente, os RVA apresentam vantagens sobre os retalhos de perfusão convencional, nomeadamente nos casos de traumatismos nas extremidades ou nas queimaduras de áreas nobres (como por exemplo, mãos, face e genitais). No entanto verifica-se muitas vezes uma infecção associada ou, pelo menos, uma colonização

polimicrobiana significativa. Pelo que se conseguiu apurar, o efeito da infecção bacteriana nos RVA nunca foi estudado experimentalmente ou clinicamente. Recentemente, num modelo de rato, foi descrita a transfecção viral com sequências codificadoras de substâncias com acção bactericida aplicadas em retalhos de fluxo convencional. Esta abordagem demonstrou não só ser eficaz na eliminação das bactérias, como também para a sobrevivência dos próprios retalhos (Ghali *et al.*, 2009).

O estudo desenvolvido pelo Doutor Diogo Casal, do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médias da Universidade Nova de Lisboa, tem uma abordagem similar, sendo que o utiliza os RVA em ratos *Wistar*, aos quais são administrados lentivírus que possuem sequências que codificam proteínas com capacidade antimicrobiana, nomeadamente as β -defensina humana 2 e 3 (hBD-2 e hBD-3), de modo a tornar estes retalhos mais resistentes à infecção e, eventualmente, à sua aplicação no tratamento de infecções sub-aguda ou crónicas. Como tal, além de se administrar os lentivírus à veia aferente ao retalho, no qual ficam incubados durante 45 min, é administrado, após 30 min do reposicionamento dos retalhos, 1 mL de uma suspensão bacteriana a um cateter de calibre 14 G que se encontra posicionado no bordo medial do retalho (Figura 2).

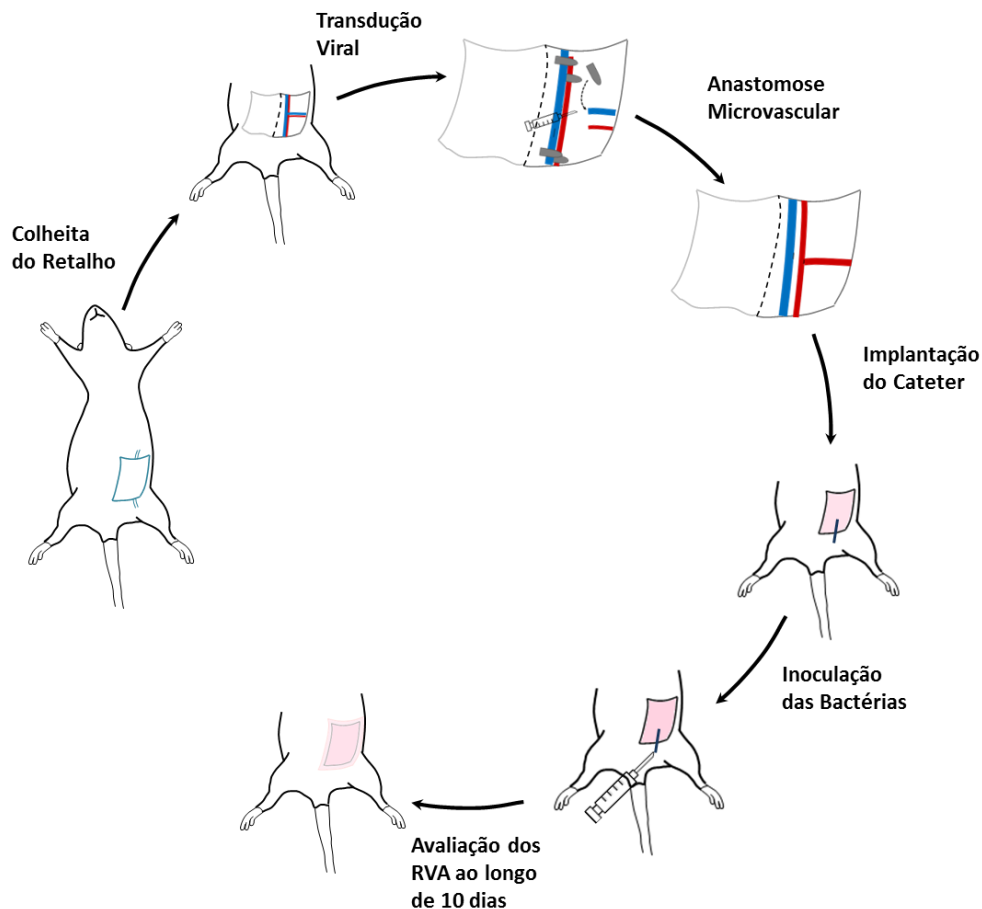


Figura 2 – Esquema do modelo de infecção viral e bacteriana nos retalhos venosos arterializados, em ratos *Wistar*, utilizado pelo Doutor Diogo Casal

O estudo efectuado pelo Doutor Diogo Casal, ainda se encontra a decorrer. Durante o decorrer desta tese, antes de se administrar as partículas virais com os genes que codificam as proteínas hBD-2 e hBD-3 aos RVA foram administrados vírus com genes *reporter*. A administração de lentivírus com genes *reporter* tem como objectivo verificar se os vírus utilizados estavam a transduzir os retalhos, tanto os retalhos de fluxo convencional, como os RVA. Nas Figura 3 e 4 encontra-se os esquemas das operações destes dois tipos de retalhos efectuadas aos ratos *Wistar*. A necessidade de se proceder a ensaios em retalhos de fluxo convencional prende-se com a necessidade de validar os resultados obtidos nos RVA, retalhos estes que foram otimizados anteriormente pelo Doutor Diogo Casal.

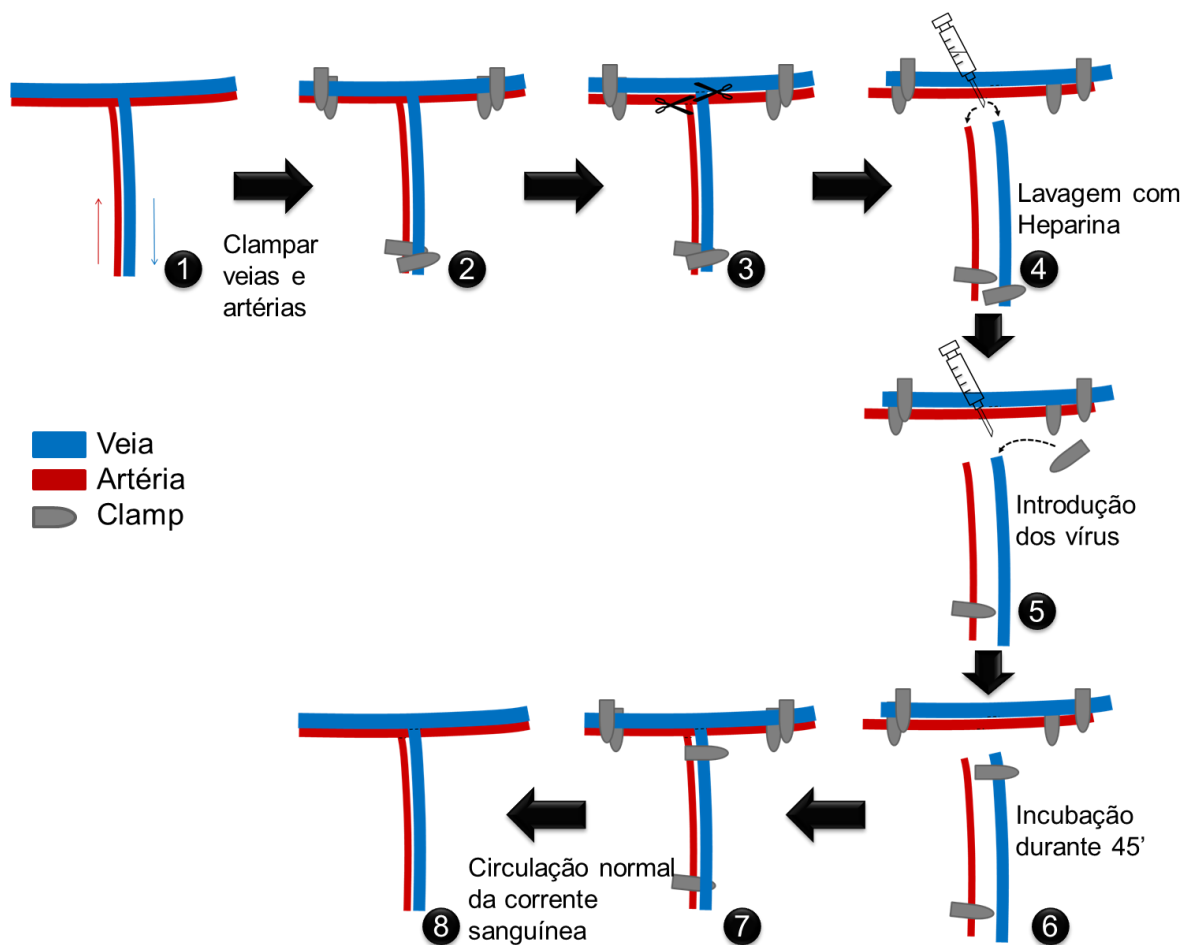


Figura 3 – Esquema do modelo de infecção viral nos retalhos de fluxo convencional, em ratos *Wistar*, utilizado pelo Doutor Diogo Casal

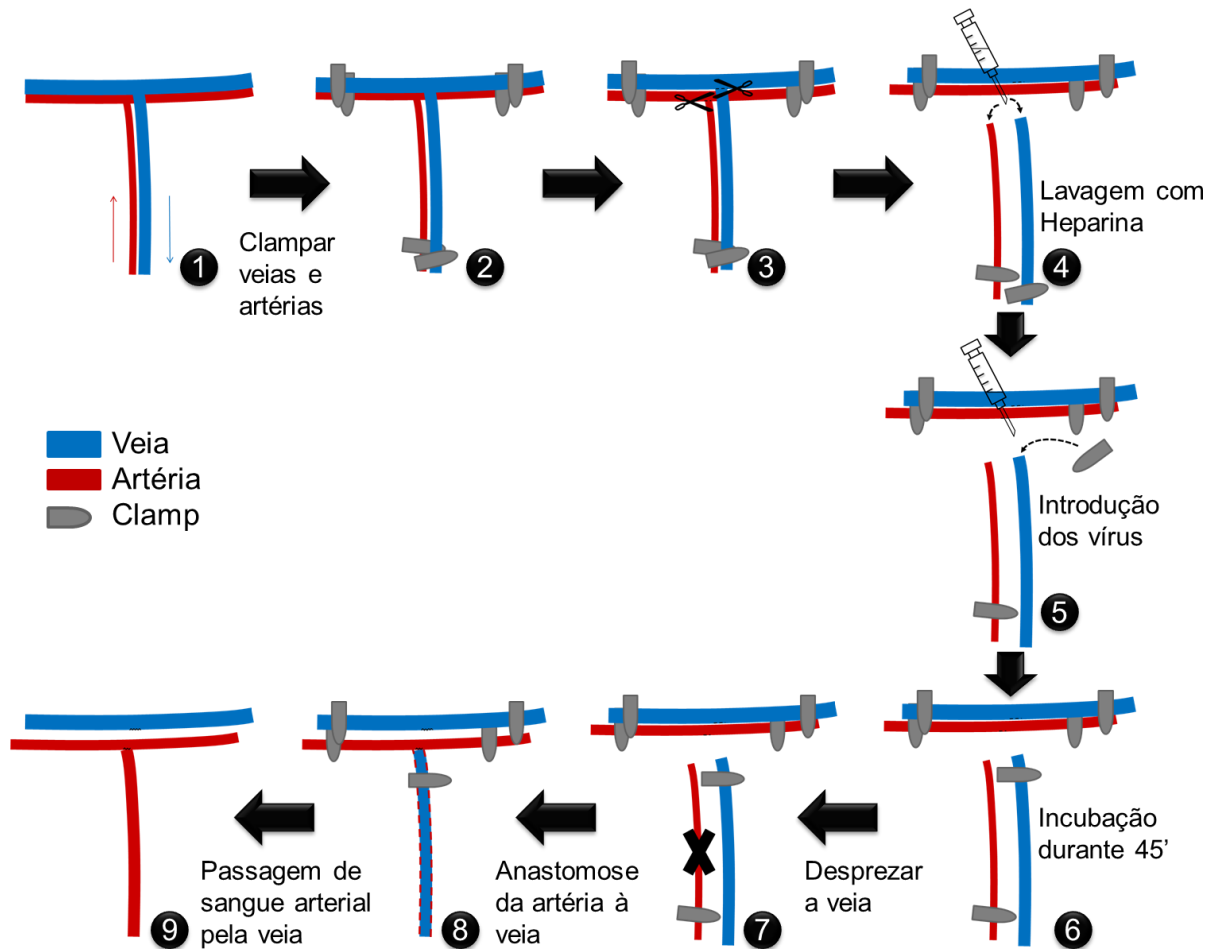


Figura 4 – Esquema do modelo de infecção viral nos retalhos venosos arterializados, em ratos Wistar, utilizado pelo Doutor Diogo Casal

1.4. Péptidos antimicrobianos

No último século os antibióticos tornaram-se amplamente disponíveis, o que possibilitou o tratamento de infecções bacterianas em todo o mundo. No entanto, nas últimas décadas houve poucas classes de antibióticos que entraram na área da saúde, sendo a maioria se encontravam voltados para o tratamento de infecções bacterianas Gram-Positivas. A falta de novos antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas Gram-Negativas combinado com os problemas de multirresistência por parte das bactérias, exige, cada vez mais, a exploração de novas estratégias para o tratamento destas infecções (Marr *et al.*, 2006; Nizet, 2006; Osswald *et al.*, 2012; Zasloff, 2002).

Nas últimas décadas, um número considerável de péptidos com actividade contra diferentes tipos de microorganismos, desde bactérias, vírus a fungos, foram identificados em quase todos os grupos do reino animal e vegetal (Andreu & Rivas, 1998; Nguyen *et al.*,

2011). Os péptidos antimicrobianos (AMP) dos mamíferos têm-se mostrado essenciais para a protecção dos diferentes órgãos, nomeadamente, a pele. A sua importância é devido às suas funções pleiotrópicas, pois além de possuir actividade antimicrobiana, também, controlam algumas funções fisiológicas, como inflamação, angiogénese e cicatrização de feridas (Lai & Gallo, 2009), o que promoveu a sua pesquisa para fins terapêuticos.

Até à data foram descritos 2411 péptidos AMP (The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) contra bactérias, vírus, protozoários e fungos (Brown & Hancock, 2006; Hancock & Sahl, 2006; Marr *et al.*, 2006).

Historicamente, os AMP foram relatados pela primeira vez em 1922 por Fleming e Allison que descreveram a acção bacteriolítica de uma substância encontrada em secreções e tecidos, ao qual deram o nome de lisozima, devido à sua capacidade de lisar as bactérias (Fleming & Allison, 1922). Em 1939, Dubos isolou a gramicidina a partir de sobrenadantes de culturas de bactérias do solo, que mostrou possuir actividade bactericida ou bacteriostático contra uma grande variedade de bactérias Gram-Positivas (Dubos, 1939). Posteriormente, em 1965, foi demonstrado por Sagres e Witkop que a gramicidina descrita por Dubos tratava-se de uma mistura de seis AMP (Nakatsuji & Gallo, 2012). As gramicidinas foram os primeiros AMP utilizados na clínica, em feridas infectadas, obtendo-se uma supressão da infecção (The Antimicrobial Peptide Database) (Gause, 1944).

1.4.1. Aspectos estruturais dos péptidos antimicrobianos

Uma grande variedade de estruturas e tamanhos dos péptidos estão associadas à actividade antimicrobiana em eucariotas (Andreu & Rivas, 1998).

A classificação inicial dos AMP com base na taxonomia tem sido cada vez mais caracterizada como inadequada, tendo em conta o facto da semelhança dos padrões estruturais partilhados pelos péptidos de diferentes organismos (Andreu & Rivas, 1998). Os AMP dos mamíferos são geralmente agrupados de acordo com as características estruturais dos péptidos, pela localização anatómica da sua expressão, ou pela família de genes que codificam. Dada a origem evolutiva comum dos mamíferos, a complexidade da estrutura do péptido antimicrobiano e distribuição sugere que estas moléculas de defesa do hospedeiro são parte de um sistema defensivo multifacetada que está sob pressões evolucionárias selectivas intensas (Dutton *et al.*, 2002).

Cada vez mais, tem sido utilizada uma classificação alternativa baseada na estrutura química dos péptidos. Esta classificação define dois grandes grupos que diferem quanto à sua estrutura linear ou cíclica. Dentro do primeiro grupo, são distinguidos dois

subgrupos, os péptidos lineares que tendem a adoptar uma conformação α -helicoidal anfipática (como a andropina e a cecropina) e péptidos lineares de composição incomum, ricos em aminoácidos como a prolina, arginina ou ocasionalmente o triptofano (como a batenecina 5 e a histatina I). O segundo grupo abrange todos os péptidos que contêm cisteína, e subdivide-se em dois grupos consoante a presença de ligações dissulfeto, podendo esta ser simples (como a esculetina) ou múltipla (como alguns tipos de defensinas) (Andreu & Rivas, 1998).

Os AMP geralmente possuem 10-50 resíduos de aminoácidos, não possuindo quaisquer sequências de aminoácidos de consenso específicas associadas com a actividade biológica. No entanto, a maioria dos AMP possui certas características comuns, tais como, a carga positiva e uma estrutura relativamente hidrofóbica e anfipática. Com base na sua composição de aminoácidos, o tamanho, e as estruturas de conformação, os AMP podem ser divididos em várias categorias, tais como péptidos com estruturas hélice- α , péptidos com estruturas folhas- β estabilizadas por pontes de dissulfeto ou péptidos com estruturas prolongadas ou *loops* (Lai & Gallo, 2009; Nakatsuji & Gallo, 2012).

O agrupamento de péptidos antimicrobianos de acordo com a família de genes com os quais estão associados, também é uma forma muito útil para agrupar os péptidos de mamífero. De acordo com esse esquema de classificação, a maioria dos peptídeos de mamífero caem dentro de duas grandes famílias: as defensinas e as catelicidinas (Dutton *et al.*, 2002).

1.4.2. Actividade biológica dos péptidos antimicrobianos

Os AMP possuem um papel central promovendo o recrutamento e mecanismo de acção do sistema imune inato e diminuem a resposta inflamatória potencialmente nociva (Brown & Hancock, 2006; Hancock & Sahl, 2006; Marr *et al.*, 2006). Geralmente, os AMP partilham uma carga global positiva e cerca de 50% de resíduos hidrofóbicos, o que confere a capacidade de adquirirem numa conformação anfifílica após a interacção com as membranas bacterianas (Marr *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2011).

Uma grande diversidade destes péptidos tem mostrado capacidade de atravessar a membrana plasmática e actuar sobre diversos processos citoplasmáticos, incluído a inibição da síntese de macromolélulas, e de enzimas que se encontram envolvidas no processo de divisão celular ou estimulação da autólise (Marr *et al.*, 2006). A maioria dos AMP actua sobre a membrana plasmática das bactérias provocando um aumento da sua permeabilidade. A correlação entre o efeito antimicrobiano do péptido e a capacidade de

permeabilização foi encontrado, em vários AMP, nomeadamente nas defensinas (Andreu & Rivas, 1998; Cociancich *et al.*, 1993). Uma das primeiras etapas no mecanismo de acção dos AMP é a interacção electrostática entre o péptido catiónico e os componentes aniónicos da membrana plasmática das bactérias, sendo que um aumento na carga do péptido leva a um aumento da sua actividade microbicida. Além da permeabilização membranar, tem sido proposto que os AMP actuam sobre a síntese de proteínas da membrana e *stress*, inibindo-a, interrupção da síntese do DNA através da PR-39 ou a quebra do DNA em cadeia simples por parte das defensinas (Andreu & Rivas, 1998).

A expressão dos AMP difere dependendo do tipo de célula e de tecidos, mas na maioria dos casos, os AMP são co-expressos como grupos que agem em conjunto. Por exemplo, na pele, já foram identificados mais de 20 péptidos e proteínas antimicrobianos, incluindo catelicidinas e β -defensinas (Nakatsuji & Gallo, 2012). A importância do estudo dos AMP na pele deve-se a esta proporcionar uma primeira linha de defesa imunológica contra microorganismos externos, esta defesa funciona tanto constitutivamente, como pelo aumento da produção de vários AMP (Nakatsuji & Gallo, 2012).

O sistema de acção das AMP funciona inicialmente devido à secreção ou libertação destes péptidos proporciona resposta inata contra os microorganismos invasores. No entanto, são activados outros mecanismos de defesa, no caso de o primeiro sistema de defesa falhar (Nakatsuji & Gallo, 2012). AMP como as defensinas e as catelicidinas parecem manter a sua relevância, pois além manterem a actividade antimicrobiana no organismo, também contribuem para o accionamento do recrutamento de células envolvidas na resposta inflamatória e na produção/libertação de citocinas. Este sistema envolve a sinalização mediada por receptores de reconhecimento de padrões microbianos, como os *Toll-like receptor* (TLR) ou por resposta a citocinas pró-inflamatórias (Nakatsuji & Gallo, 2012).

No homem, os queratinócitos da pele e células epiteliais da mucosa produzem níveis muito baixos de proteínas antimicrobianas em condições basais. Contudo a sua expressão é fortemente induzida em resposta a lesões, infecções e/ou processos inflamatórios. As funções da barreira epitelial são completadas pelas proteínas antimicrobianas produzidas pelos leucócitos presentes nos tecidos (como por exemplo macrófagos, células dendríticas (DC) e mastócitos) ou leucócitos recrutados na resposta inflamatória aguda (como por exemplo os neutrófilos) (Nakatsuji & Gallo, 2012; Nizet, 2006).

Ensaio com base na deleção dos genes das catelicidinas provaram que estas possuem um papel importante na resposta imunológica em vários tecidos, mucosa e fluídos corporais, e que actuam sobre uma vasta gama de microorganismos, como bactérias, vírus e fungos (Nizet *et al.*, 2001).

Em ensaios *in vivo* para o estudo da função da BD1 face à infecção por parte de vírus, foram utilizados ratinhos *knockout* para a BD1 e *wild type* (como controlo) que foram infectados com o vírus influenza, os ratinhos *knockout* tiveram uma perda de peso e morreram dois dias mais cedo que os controlos, sendo que as titulações virais feitas aos pulmões dos ratinhos não revelaram diferenças. Este resultado, conjugado com os resultados obtidos do estado da infecção dos ratinhos, em que os ratinhos *knockout* apresentavam um menor grau de infecção que os *wild type*, sugere que, para além da BD1 estar envolvida na resposta imunitária inata precoce, também, está envolvida na protecção da patogénese do vírus por um mecanismo que não actua sobre a inibição da replicação viral (Ryan *et al.*, 2011).

1.4.3. Aplicação clínica de péptidos antimicrobianos

A principal vantagem para a utilização de péptidos com capacidades terapêuticas é a sua diversidade de aplicações, pois além de poderem ser utilizados com agentes antimicrobianos individuais, podem ser utilizados em combinação com antibióticos convencionais de modo a promover um efeito sinérgico ou como compostos imunomoduladores (Marr *et al.*, 2006; Zasloff, 2002). Embora estes péptidos possuam capacidade antimicrobiana, normalmente, a sua potência não é tão elevada como a de alguns antibióticos convencionais, o seu ponto forte está relacionado com a sua capacidade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes, como é o caso do *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (MRSA) e da *Pseudomona aeruginosa* multi-resistente (Zhang *et al.*, 2005). Esta actividade é conseguida com concentrações semelhantes às utilizadas com os antibióticos convencionais e, além disso, a sua capacidade bactericida actua mais rapidamente e pode envolver vários alvos bacterianos (Marr *et al.*, 2006).

Uma das principais questões que se coloca quando se pensa em novas terapias antimicrobianas é saber se podem ou não levar novas resistências. Embora o desenvolvimento de resistência completa de bactérias a AMP tenha sido proposto, este é improvável, pois os péptidos, devido às suas características possuem facilidade de interacção com a membrana plasmática das bactérias. No entanto já foram descritos alguns mecanismos de resistência a péptidos (Nizet, 2006), sendo que estes resultaram apenas de um pequeno aumento da resistência após várias passagens de *Pseudomona aeruginosa* (Steinberg *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2005). No entanto, comparando com a resistência aos antibióticos convencionais, como a norfloxacin e a gentamicina, continuam a ser uma

vantagem na medida em que com menos de metade das passagens, as bactérias apresentaram um aumento de resistência muito superior (Steinberg *et al.*, 1997).

Estudos recentes, em murganhos *knockout* e em sistemas de expressão transgénica confirmaram que as proteínas antimicrobianas desempenham um papel crucial na restrição da proliferação microbiana na pele e mucosas, e na prevenção da propagação microbiana nos tecidos profundos onde se podem desenvolver infecções graves (Nizet, 2006).

1.4.4. Defensinas

As defensinas são os péptidos melhor caracterizados dos mamíferos. As defensinas nos mamíferos contêm três ligações dissulfeto intramoleculares e são divididas em três subgrupos (α -, β - e θ -defensinas) com base no emparelhamento dos seis resíduos de cisteína, sendo que apenas as α -, β -defensinas estão presentes nos humanos. As α -defensinas possuem pontes de dissulfeto entre os resíduos cisteína C1-C6, C2-C4 e C3-C5, enquanto as β -defensinas possuem entre C1-C5, C2-C4 e C3-C6. Apesar das suas ligações dissulfeto diferentes, a estrutura tridimensional de ambos os grupos de péptidos é muito semelhante (Dutton *et al.*, 2002; Harder *et al.*, 1997; Pazgier *et al.*, 2006; Selsted *et al.*, 1985). A θ -defensina possui uma estrutura cíclica e foi descoberta, mais recentemente, nos neutrófilos da *Macaca mulatta* (Tang *et al.*, 1999).

Os genes que codificam as α - e β - defensinas humanas encontram-se num *cluster* de 450kb num segmento do cromossoma 8p23 (Linzmeier *et al.*, 1999).

A família das α -defensinas humanas compreende os HNP (do inglês *Human Neutrophil Peptide*) e as HD (*Human Defensin*). Os HNP1, HNP2, HNP3 e HNP4 encontram-se nos grânulos azurófilos das células leucocitárias fagocíticas que possuem um papel importante na morte dos microorganismos fagocitados, sendo que se encontram em elevadas concentrações nos neutrófilos e fornecem-lhes a sua actividade microbicida não oxidativa. As α -defensinas humanas HD5 e HD6 são expressas no intestino delgado, nas células de Paneth, onde são continuamente segregadas da cripta intestinal para o lúmen (Jones & Bevins, 1993; Zasloff, 2007) (Online Mendelian Inheritance in Man®, <http://www.omim.org/>).

A família das β -defensinas (BD) tem demonstrado possuir capacidades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus.

As β -defensinas humanas (hBD) são pequenos péptidos catiónicos produzidos por células epiteliais, que se acredita fazerem parte da resposta imune inata e adaptativa, sendo

que demonstram uma elevada capacidade antimicrobiana (Joly *et al.*, 2004) (ver Tabela 1 e 2). Existe uma grande variedade de hBD, sendo que as que se encontram mais escritas na literatura são a hBD-1, hBD-2 e hBD-3.

A hBD-1 foi a primeira hBD identificada, descrita pela primeira vez em 1995, obtida a partir do plasma de pacientes com insuficiência renal (Bensch *et al.*, 1995). Desde então, outras hBD foram isoladas ou as suas sequências de nucleótidos foram identificadas por análise do genoma (Pazgier *et al.*, 2006). A hBD-2 e a hBD-3 foram isoladas pela primeira vez de pacientes com psoríase (Harder *et al.*, 1997; Harder *et al.*, 2001). As restantes hBD foram na sua maioria originalmente detectadas por análise do genoma (Pazgier *et al.*, 2006).

A hBD-1 é constitutivamente expressa nos queratinócitos, no entanto exibe uma menor actividade antimicrobiana em comparação com as outras hBD (Nakatsuji & Gallo, 2012). Enquanto a hBD-2 e a hBD-3 possuem níveis de expressão muito reduzidos nos queratinócitos em estado normal, e encontram-se sobreexpressas durante a infecção, inflamação e feridas (Harder *et al.*, 1997; Nakatsuji & Gallo, 2012). Este facto sugere que estes AMP actuam como uma resposta secundária, aumentando a expressão com o objectivo de limitar o grau de severidade dos sintomas, quando a primeira linha de defesa (expressão constitutiva de AMP) falha (Nakatsuji & Gallo, 2012). As hBD encontram-se presentes em diversos epitélios e em células não epiteliais (ver Tabela 1).

Algumas α - e β -defensinas encontram-se descritas como possuindo alguma actividade quimioattractiva para alguns tipos de leucócitos em circulação. Ambas as defensinas atraem DC imaturas, linfócitos T e monócitos, e podem induzir a produção de citocinas por monócitos e células epiteliais. A hBD-2 activa as DC imaturas através dos mecanismos dependentes do TLR4, induzindo uma resposta do tipo Th1 (Biragyn *et al.*, 2002; Linzmeier *et al.*, 1999; Zasloff, 2007).

Tabela 1 - β -defensinas Humanas (hBD): Localização do gene e locais de expressão

Símbolo do Gene	Localização do Gene	AMP	Actividade Antimicrobiana ^[1]	% Resíduos Hidrofóbicos	Produção/Localização	Expressão	Referências
DEFB1 ^[2]	8p23.1 ^[2]	β-Defensina Humana 1 (hBD-1) ^[3]	Gram-Positivas ^[4] Gram-Negativas ^[4] Vírus ^[4]	36 ^[4]	Nos epitélios: Gengivas, Fígado, Mucosa Bucal, Pâncreas, Peito, Placenta, Próstata, Pulmão, Traqueia, Trato Gastrointestinal, Trato Respiratório, Trato Urogenital, Trompas de Falópio, Útero	Células dendríticas Glândulas Mamárias Macrófagos Monócitos	(Dale <i>et al.</i> , 2001) (Duits <i>et al.</i> , 2002) (Harder <i>et al.</i> , 1997) (Krisanaprakornkit <i>et al.</i> , 1998) (Pazgier <i>et al.</i> , 2006) (Tunzi <i>et al.</i> , 2000) (Underwood & Bevins, 2010) (Valore <i>et al.</i> , 1998)
DEFB4A (DEFB2) ^[2]	8p23.1 ^[2]	β-Defensina Humana 4A (β-Defensina Humana 2 - hBD-2) ^[3]	Gram-Positivas ^[4] Gram-Negativas ^[4] Vírus ^[4] Fungos ^[4]	36 ^[4]	Nos epitélios: Cólón, Estômago, Glândulas salivares, Gengivas, Mucosa Bucal, Pele, Prepúcio, Pulmão, Traqueia, Trato Gastrointestinal, Trato Respiratório, Rim, Útero	Células dendríticas Glândulas Mamárias Macrófagos Monócitos	(Bals <i>et al.</i> , 1998) (Dale <i>et al.</i> , 2001) (Duits <i>et al.</i> , 2002) (Harder <i>et al.</i> , 1997) (Pazgier <i>et al.</i> , 2006) (Singh <i>et al.</i> , 1998) (Underwood & Bevins, 2010)
DEFB103A (DEFB3) ^[2]	8p23.1 ^[2]	β-Defensina Humana 103 (β-Defensina Humana 3 - hBD-3)	Gram-Positivas ^[4] Gram-Negativas ^[4] Vírus ^[4] Fungos ^[4]	33 ^[4]	Nos epitélios: Amígdalas, Coração, Pele, Trato Gastrointestinal, Traqueia, Trato Respiratório	Células epiteliais das vias aéreas Queratinócitos	(Harder <i>et al.</i> , 2001) (Pazgier <i>et al.</i> , 2006) (Underwood & Bevins, 2010)
DEFB104A (DEFB4) ^[2]	8p23.1 ^[2]	β-Defensina Humana 104 (β-Defensina Humana 4 - hBD-4) ^[3]	Gram-Positivas ^[4] Gram-Negativas ^[4]	32 ^[4]	Nos epitélios: Epidídimo, Estômago, Fígado, Pele Pulmão, Rim, Testículos, Tiróide, Trato Gastrointestinal, Útero	Glândula Tiróide Queratinócitos Neutrófilos	(Garcia <i>et al.</i> , 2001) (Pazgier <i>et al.</i> , 2006) (Underwood & Bevins, 2010)

^[1] Actividade antibacteriana, antifúngica e antiviral; ^[2] HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>); ^[3] UniProt - Universal Protein Resource (<http://www.uniprot.org/>); ^[4] The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>

Tabela 2 – Capacidade antimicrobiana das hBD-1, hBD-2, hBD-3 e hBD-4

AMP	Microorganismo Alvo	Capacidade Antimicrobiana (µg/mL)*	Referência
hBD-1	<i>Pseudomona aeruginosa</i> PAO1	LD50 = 1	(Singh <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Candida albicans</i>	LD90 = 25	(Harder <i>et al.</i> , 1997)
hBD-2	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MIC = 15	(Bals <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Escherichia coli</i>	LD90 = 10	(Harder <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Escherichia coli</i> ATTC 25922	MIC = 62	(Bals <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Escherichia coli</i> D31	MIC = 62	(Bals <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	LD90 = 10	(Harder <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> PAO1	LD50 = 0,10	(Singh <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	EB = 100	(Harder <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC = 62	(Bals <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	LD50 > 100	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Candida albicans</i> (isolada da clínica)	LD90 = 6	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
hBD-3	<i>Enterococcus cloacae</i> NCTC 13047	LD50 = 0,78	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Enterococcus faecium</i> (isolado clinica, resistente vancomicina)	LD90 = 12	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	LD90 = 6	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LD50 = 0,10	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 10145	LD50 = 0,78	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 11440	LD50 = 0,78	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 11446	LD50 = 0,78	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 11568	LD50 = 0,20	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	LD90 = 13	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 39324	LD50 = 0,39	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (isolada clinica, multiresistente)	LD90 = 25	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 6538	LD90 = 13	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 12600	LD50 = 0,20	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 33593	LD50 = 1,56	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATTC 14990	LD50 = 0,39	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400	LD50 = 1,56	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12344	LD50 = 3,10	(Sahly <i>et al.</i> , 2003)
		LD90 = 13	(Harder <i>et al.</i> , 2001)
hBD-4	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17770	MIC > 100	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Escherichia coli</i> BL21	MIC > 100	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	4,5	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	MIC > 100	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MIC > 100	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	4,5	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 33400	MIC > 100	(Garcia <i>et al.</i> , 2001)

EB – Efeito Bacteriostático; LD50 – Dose que reduz as UFC em 50%; LD90 – Dose que reduz as UFC em 90%; MIC – Concentração Mínima Inibitória ; * ensaios *in vitro*

Métodos de expressão de proteínas recombinantes em eucariotas

A expressão de proteínas heterólogas em células eucariotas é uma das estratégias utilizada para a produção de várias proteínas, nomeadamente as AMP. Tem como objectivo produzir as proteínas de interesse com as características de maturação semelhantes às que surgem no seu meio natural.

O paradigma da transferência de genes *in vivo* diz respeito à inserção de um gene num organismo utilizando um vector que transfere apenas o gene pretendido para as células-alvo desejadas. A transferência de genes é uma importante ferramenta usada rotineiramente em ensaios *in vitro* e em modelo animais para investigar os mecanismos moleculares subjacentes a diversas funções biológicas. A terapia genética tem como objectivo final a utilização de genes com capacidades terapêuticas em seres humanos. O objectivo é fornecer a informação genética para uma célula-alvo, quer para substituir a função da proteína defeituosa (doença monogénica), ou para conferir uma função adicional no caso de um tratamento (como o cancro, ou a sobreexpressão de determinada proteína) ou para evitar uma doença (como uma vacina) (Bouard *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2006; Sakuma *et al.*, 2012). No entanto, a transferência de sequências isoladas de genes é ineficiente, uma vez que o DNA é rapidamente degradados devido à acção de nucleases e apresentar uma baixa absorção celular, como tal, é essencial o desenvolvimento e a utilização de vectores eficientes no *delivery* de genes (Elouahabi & Ruyschaert, 2005; Lv *et al.*, 2006). Esta dificuldade existente no *delivery* eficiente de genes prende-se com o facto das células possuírem uma membrana plasmática que é altamente eficaz na sua função como barreira permeável selectiva, que é essencial para a sobrevivência e função celular, e representa um grande desafio no *delivery* de genes (Lodish *et al.*, 2000).

A falta de um sistema de *delivery* de genes eficiente e não-tóxico é o maior desafio na entrega de sequências de genes de interesse *in vivo* (Bouard *et al.*, 2009). Os sistemas de *delivery* existentes podem ser divididos entre vectores não-virais e virais, sendo que ambos estão a ser utilizados em ensaios clínicos (Figura 5).

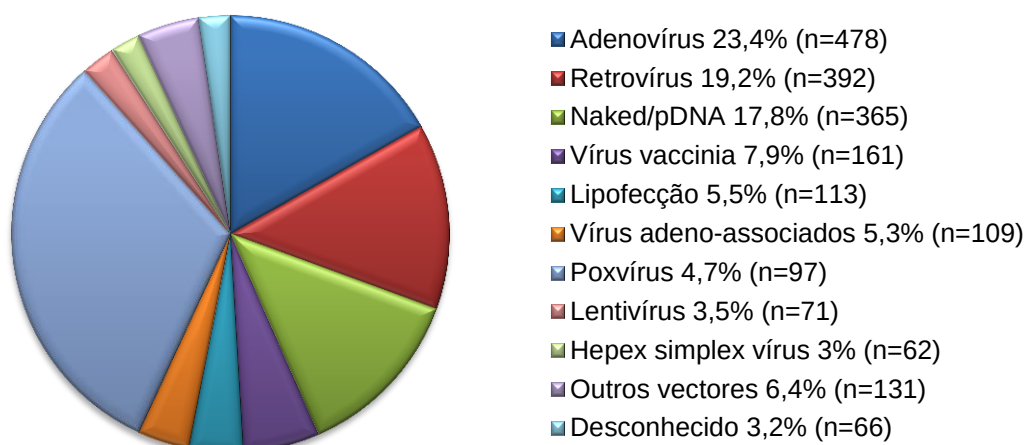


Figura 5 – Vectores utilizados em terapia genética em ensaios clínicos (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide provided by the Journal of Gene Medicine, © 2014 John Wiley and Sons Ltd, <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>)

1.4.5. Vectores não-virais

A utilização de vectores de *delivery* apropriados podem ser cruciais para a transferência de genes. Existem diversas variedades de vectores não-virais, como são o caso de, *quantum dots*, nanopartículas de ouro, nanopartículas de prata, nanopartículas magnéticas, nanopartículas carregadas e lipossomas (Farkhani *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2006).

Os lípidos e polímeros catiónicos possuem muitas vantagens sobre os vectores virais, por serem não-imunogénicos e não-oncogénicos, fáceis de produzir, permitindo a sua administração repetida, tratando-se de uma promessa na substituição dos vectores virais na clínica, no entanto a sua citotoxicidade continua a ser um dos principais obstáculos (Elouahabi & Ruysschaert, 2005; Lv *et al.*, 2006).

Os lípidos catiónicos podem ser utilizados na forma de lipossomas, ou de complexos de DNA/lípido formado pela interacção dos lípidos carregados positivamente a pH fisiológico com o DNA carregado negativamente através de atracções electrostáticas. A eficiência de transfecção com estes veículos de *delivery in vitro* é, em parte, determinada pela sua estabilidade e do tamanho de partícula. No entanto, estes lipossomas ou complexos de DNA/lípido exibem muitas vezes uma eficiência de transfecção reduzida *in vivo*, e uma toxicidade celular associada. A toxicidade está em parte associada ao tamanho dos complexos, à relação de carga entre os lípidos catiónicos e os ácidos nucleicos e à dose administrada (Lv *et al.*, 2006).

Os polímeros catiónicos podem ser combinados com o DNA, formando um complexo particulado. A principal diferença entre polímeros e lípidos catiónicos está na ausência da fracção hidrofóbica, sendo completamente solúveis em água (Elouahabi & Ruyschaert, 2005). Os polímeros mais estudados na terapia incluem a *poly-L-lisine* e a *Polyethylenimine* (PEI) (Lv *et al.*, 2006).

A *poly-L-lisine* foi um dos primeiros polímeros catiónicos a ser utilizado na transfecção de genes, trata-se de um polipéptido linear com repetições sucessivas de lisinas (aminoácido) (Lv *et al.*, 2006), encontra-se também relatado como um composto que melhora a aderência celular, através da alteração das cargas superficiais, uma vez que a *poly-L-lisine* possui uma carga catiónica interage com a superfície das células com carga aniónica (Huang *et al.*, 1983). No entanto possui uma certa toxicidade associada (Lv *et al.*, 2006). A *poly-L-lisine* possui uma natureza biodegradável, o que é muito útil para aplicações *in vivo*, mas no entanto quando entra no sistema circulatório liga-se às proteínas do plasma e é rapidamente removida, o que leva a uma transfecção pouco eficiente (Dash *et al.*, 1999; Lv *et al.*, 2006).

A PEI é uma poliamina catiónica amplamente utilizada na entrega de genes. Existem dois tipos de estrutura: a molécula linear e a molécula ramificada. A PEI possui uma elevada eficiência de transfecção e elevada citotoxicidade. Muitos factores afectam o perfil eficácia/citotoxicidade dos polímeros de PEI, como peso molecular, o grau de ramificação, a força iónica da solução e o tamanho da partícula (Lv *et al.*, 2006; Naldini *et al.*, 1996a).

O *polybrene* é um polímero catiónico que tem sido amplamente utilizado para transdução lentiviral, que reduz a repulsão de cargas entre os vírus e a superfície das células alvo, aumentando a transfecção (Davis *et al.*, 2004; Sakuma *et al.*, 2012). Outros reagentes, como a retronectina tem sido utilizada para aumentar a eficiência da transdução lentiviral, bem como a adesão das células às placas de cultura (Sandrin *et al.*, 2002).

1.4.6. Vectores virais

Os vírus são veículos de *delivery* biológicos, muito eficientes na transdução da sua própria informação genética nas células hospedeiras, de modo a replicarem-se e propagarem-se eficazmente. Através da substituição dos genes virais não essenciais por genes de interesse terapêutico, os vectores virais recombinantes podem ser utilizados para transduzir o tipo de células que normalmente infectam, sendo que este material genético a transferir pode ser sob a forma de DNA ou de RNA (Bouard *et al.*, 2009; Liechtenstein *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2006).

A utilização de vectores virais como *delivery* de genes encontra-se relatado como tendo algumas desvantagens, como é o caso, da dificuldade na sua produção, de possuírem toxicidade associada à sua imunogenicidade e serem limitados no tamanho do material genético a ser transferido (Delenda, 2004; Lv *et al.*, 2006) e a falta de especificidade na infecção de células-alvo. Neste contexto têm sido realizadas alterações eficientes, permitindo que os vírus repliquem apenas em células-alvo, sendo que os vírus devem ser capazes de evitar a maior parte das barreiras biológicas e atingir somente as desejadas. Se por um lado a infecção massiva de células que não as células-alvo reduz severamente a biodisponibilidade do vector, por outro lado, iria aumentar o risco potencial de consequências clínicas indesejáveis (Bouard *et al.*, 2009).

1.4.6.1. Vectores adenovirais

Os adenovírus são vírus icosaédricos que não possuem envelope, são compostos por uma nucleocápside que contém um genoma de DNA em cadeia dupla linear e possuem uma expressão transiente, uma vez que não são integrativos. Os adenovírus são utilizados como vectores de *delivery*, sendo que são necessárias, algumas, modificações de modo a poderem ser utilizados em expressão heteróloga. As principais modificações prendem-se com a eliminação das regiões E1 e E3, de modo a impedir a replicação autónoma dos vírus, sendo que a função de replicação encontra-se contida nas células hospedeiras complementadas com gene *E1*, como é o caso das HEK293 (Graham *et al.*, 1977; Khan, 2013). A região E1 é responsável pela replicação autónoma, enquanto a E3 não é necessário para a replicação viral em cultura. A eliminação destas duas regiões permite aumentar a capacidade deste vector relativamente à dimensão de clonagem do DNA de interesse (Bett *et al.*, 1993; Butel, 2013).

Modificações posteriores envolvem a eliminação das regiões E2 ou E4, sendo que a E2 codifica proteínas envolvidas na replicação do DNA do adenovírus, como tal, a sua eliminação impossibilita a replicação, reduzindo, desta forma, a expressão dos genes de interesse (Butel, 2013), enquanto a E4 codifica várias proteínas envolvidas numa variedade de funções que têm impacto tanto na expressão de genes virais e celulares, como na transdução do sinal, como tal, parte ou total deleção da região E4 atenua significativamente a expressão do vector (Butel, 2013; Wong *et al.*, 2013). Estas deleções demonstraram efeitos benéficos no que se refere de respostas imunitárias, devido à redução da expressão de proteínas virais, o que permitiam a expressão do transgene por um maior período de tempo (Wong *et al.*, 2013).

1.4.6.2. Vectores lentívirais

Os lentívirus fazem parte da família viral *Retroviridae* (retrovírus) que são caracterizados pelo uso a *transcriptase reversa* e *integrase* para uma inserção estável de informação genómica viral no genoma do hospedeiro (Sakuma *et al.*, 2012). O prefixo *lenti* vem do latim, que significa lento, esta terminologia deve-se ao seu longo período de tempo que decorre entre a infecção inicial e o aparecimento da doença, que se pode prolongar ao longo de um período de meses ou até mesmo anos (Durand & Cimorelli, 2011).

Os lentívirus induzem uma grande variedade de patologias progressivas lentas, nomeadamente imunodeficiências, anemia, pneumonia e encefalite nos seus hospedeiros específicos (primatas, ungulados e felinos) (Durand & Cimorelli, 2011; Sakuma *et al.*, 2012). Os lentívirus de diferentes espécies têm propriedades distintas na sua estrutura do genoma, no uso de receptores e na patogenicidade. A característica comum do ciclo replicativo destes vírus é a sua capacidade de atingir as células que não se encontram em divisão, ou que não se dividem, uma propriedade que constitui um atractivo na terapia genética (Durand & Cimorelli, 2011; Sakuma *et al.*, 2012).

O principal interesse nos vectores lentivirais para fins de terapia genética é a integração do seu genoma. No entanto, senão controlada, essa mesma característica é intrinsecamente perigosa (Durand & Cimorelli, 2011), pois além, da integração poder ocorrer em regiões reprimidas do genoma, também pode ocorrer dentro de genes, afectando a sua funcionalidade (Sakuma *et al.*, 2012).

O ciclo viral pode ser dividido em duas fases, a primeira é em que o genoma viral é transferido para uma célula hospedeira e o segundo é quando o seu genoma é expresso e a propagação viral é assegurada (Durand & Cimorelli, 2011).

1.4.6.2.1. Produção viral

In vitro os vectores lentivirais dependem da separação física em diferentes plasmídeos, que são necessários para a produção de proteínas envolvidas na formação das partículas virais e capacidade de infecção e das sequências *cis-acting* para mobilizar o genoma viral (Durand & Cimorelli, 2011). Para a produção lentiviral é necessário a utilização de pelo menos três vectores plasmídicos, dois dos quais são responsáveis pela formação do vírus (*empacotamento* e *envelope*) e o terceiro o vector com o transgene (Naldini, 1998). O vector de *empacotamento* expressa as proteínas de promotores heterólogos e sinais de poliadenilação e as sequências *cis-acting* necessárias para a transferência do genoma viral.

O vector com o transgene contém a *cassette* de expressão do transgene ligado a sequências *cis-acting* viral necessárias para a encapsidação, transcrição reversa e integração (Naldini, 1998; Naldini *et al.*, 1996b). Os vírus são montados pelo (s) vector (es) de *empacotamento* e apenas o vector com o transgene é transferido para o genoma. Como nenhum gene viral acompanha o transgene, o processo de transdução é limitado a um único ciclo. No entanto é possível ocorrer recombinação entre os diferentes vectores, podendo originar vírus com capacidade de replicação, o que representa um possível perigo para o hospedeiro. Este risco pode ser minimizado através da utilização de um vector de *envelope* de um vírus não relacionado (Naldini, 1998). Uma outra estratégia para melhorar a biossegurança do vector foi a identificação dos genes essenciais para ocorrer a transdução de genes, possibilitando a eliminação, bem-sucedida, das sequências não essenciais das construções utilizadas para gerar o vector lentiviral. Esta estratégia é viável se a eliminação destas sequências não afectar a eficiência da transdução (Naldini, 1998).

Além dos genes estruturais comuns a todos os retrovírus – *gag*, *pol* e *env*, os lentivírus contêm dois genes reguladores, *tat* e *rev*, essenciais para a replicação viral, e um conjunto de variáveis de genes acessórios, que embora não sejam essenciais para a replicação viral, são fundamentais para a patogénese (Naldini, 1998). Assim, outra estratégia para aumentar a biossegurança é a eliminação do gene *tat*, um dos mais fortes activadores de transcrição, que desempenha um papel importante na replicação dos lentivírus. No entanto, o gene *tat* não é absolutamente necessário para a transdução, podendo ser substituído por promotores fortes constitutivos (Naldini, 1998).

Geralmente, os vectores lentivirais são produzidos em HEK (Human Embryonic Kidney)-293T ou clones de células derivados através da transfecção transiente de vários vectores plasmídeos. Têm sido utilizados vários métodos de transfecção com sucesso, sendo que o número de títulos virais varia consoante as condições das HEK-293T, sistema de *empacotamento* e o *design* do vector de transferência. Com a introdução de mais vectores plasmídeos na transfecção a eficiência do *delivery* é proporcionalmente menos eficiente. Como tal, sistemas de quatro vectores plasmídeos produzem uma menor titulação do que os sistemas de três plasmídeos. Outro factor que pode afectar fortemente o desempenho do vector é a utilização de promotores internos para produzir os transgenes, sendo que habitualmente se utilizam promotores constitutivamente activos, como o promotor CMV (citomegalovírus), que pode ser menos eficaz em determinados tipos de células (Sakuma *et al.*, 2012). As linhas celulares de *empacotamento* estável para vectores lentivirais podem fornecer todos os elementos necessários para a produção lentiviral por transfecção transiente ou para a produção de uma ou mais proteínas virais, reduzindo o número de plasmídeos necessários para a produção dos vírus (Sakuma *et al.*, 2012).

A nível laboratorial têm sido utilizadas várias estratégias para aumentar o nível de transfecção dos plasmídeos utilizados para a produção e transdução dos lentivírus, sendo que alguns dos agentes utilizados para esta finalidade estão relatados como eficazes no aumento da adesão celular. No entanto a maioria destes agentes apresentam alguma citotoxicidade associada (Lv *et al.*, 2006; Sakuma *et al.*, 2012; Sandrin *et al.*, 2002). Alguns destes agentes são a *poly-L-lisine*, a PEI e o *polybrene*, que se encontram descritos na secção 1.5.1.

Após a obtenção dos vírus, geralmente, é necessário recorrer-se à sua concentração. Para tal, existem vários métodos, nomeadamente, a ultracentrifugação ($1-3 \times 10^5 g$ durante 1-4 h a 4 °C), centrifugação a alta-velocidade ($10^4 g$ durante 8-12 h a 4 °C), filtração por centrifugação usando um filtro de 100kDa ou precipitação com fosfato de cálcio. A eficiência dos métodos de concentração pode ser afectada pela utilização de Soro Bovino Fetal (FBS) na produção das partículas virais, principalmente nos métodos que requerem centrifugação (Sakuma *et al.*, 2012).

1.4.6.2.2. Aplicações clínicas de lentivírus em infecções

Actualmente, segundo a Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (Journal of Gene Medicine, <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>), encontram-se em ensaios clínicos 71 ensaios que utilizam lentivírus como vectores de entrega de genes, sendo 13 desses ensaios na área de doenças infecciosas. Todos estes ensaios encontram-se dirigidos a infecções relacionadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

1.5. Resposta imunológica

O sistema imunológico protege o nosso organismo de uma variedade de ameaças, incluindo agentes patogénicos, toxinas e células do próprio organismo alteradas/mutantes. Esta protecção é conseguida através da acção regulada de um certo tipo de células, quer imunes, quer não imunes. Algumas destas células são especializadas na captura e processamento de antígenos, tendo a capacidade de decidir quais representam uma ameaça real. Outros tipos de células são especializadas em neutralizar patogénicos e toxinas, enquanto outras exercem uma citotoxicidade directa em células infectadas/mutadas, como é o caso das células cancerígenas (Liechtenstein *et al.*, 2013).

As DC têm um importante papel na regulação da resposta imunológica, controlando a resposta dos linfócitos B e T, de forma a estimulá-los ou inibi-los (Goold *et al.*, 2011; Tarbell *et al.*, 2006). As DC células apresentadoras de antígenos, que possuem uma grande capacidade de processamento e apresentação destes (Breckpot & Escors, 2009). Estas células funcionam como sentinelas do sistema imunitário, migrando do sangue para os tecidos. Aqui as DC imaturas entram em contacto com sinais característicos de um processo inflamatório, infeccioso ou de destruição de tecidos, capturem e processam os antígenos (Caux *et al.*, 2000; Flores-Romo, 2001). Através desta interacção antígenos-DC, as DC sofrem uma complexa mudança fenotípica e funcional – a maturação (Breckpot & Escors, 2009; Hawiger *et al.*, 2001). A maturação pode ser induzida por uma grande variedade de sinais, como microorganismos ou produtos microbianos (Beyer *et al.*, 2001; Sallusto & Lanzavecchia, 2000), células apoptóticas (Breckpot & Escors, 2009) e citocinas (Sallusto & Lanzavecchia, 2000).

As DC maduras migram para os órgãos linfóides secundários (gânglios linfáticos, baço, tecidos linfóides associados à mucosa e tecidos linfóides associados ao intestino [por referência]) onde apresentam os antígenos aos linfócitos. Dependendo da natureza do antígeno, bem como o contexto em que foi encontrado, provocam diferentes tipos de resposta imunológica (Breckpot & Escors, 2009; Hawiger *et al.*, 2001). Durante a maturação as DC diminuem a sua capacidade de capturar os antígenos, característico de DC imaturas, mas tornam-se muito eficazes na apresentação aos linfócitos T (Breckpot & Escors, 2009; Sallusto & Lanzavecchia, 2000). Na maturação, também, ocorre alterações na morfologia e sobreexpressão de moléculas MHC (complexo principal de histocompatibilidade), moléculas co-estimulatórias (como CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 e CD86), moléculas de adesão e receptores de quimiocinas (Breckpot & Escors, 2009; Caux *et al.*, 2000). A sobreregulação dos receptores das quimiocinas é uma das primeiras alterações a ocorrer, sendo que as quimiocinas regulam a migração das DC dos tecidos periféricos para as áreas de drenagem dos linfócitos T dos órgãos linfóides, onde as DC apresentam os péptidos derivados dos antígenos adquiridos na periferia (Breckpot & Escors, 2009; Caux *et al.*, 2000).

In vitro vários tipos de células podem diferenciar-se em DC, no entanto a fonte mais abundante para se estabelecer linhas DC são as células mononucleares do sangue periférico, sendo tratadas *in vitro* com Interleucina 4 (IL-4) e Factor de estimulação de colónias granulócitos-macrófagos (GM-CSF), mantém as características de captura e processamento de antígenos das DC imaturas *in vivo* (Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

Várias células do sistema imunológico produzem HBD, nomeadamente, a hBD-1 e a hBD-2 são produzida em macrófagos, monócitos e DC, sendo a expressão da hBD-1 aumentada com a diferenciação dos monócitos a DC (Duits *et al.*, 2002).

Introdução ao tema de tese

Tendo em conta a problemática das infecções cirúrgicas, que representa 13% das infecções aos cuidados prestados no hospital (Pina *et al.*, 2012), esta tese pretende contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de combate a infecções cirúrgicas baseada nos mecanismos de resposta imune inata, nomeadamente, a utilização de β -defensinas.

Os objectivos específicos da tese foram:

- Estabelecimento da sobreexpressão de genes que expressam as β -defensinas (BD) em retalhos cirúrgicos.

Os genes antimicrobianos utilizados codificam as β -defensinas humanas 2 e a 3 (hBD-2 e hBD-3). A escolha destas proteínas prende-se com o que se encontra descrito na literatura, como sendo as β -defensinas o grupo de péptidos antimicrobianos (AMP) mais bem caracterizado e com uma maior capacidade antimicrobiana. Dentro dos vários vectores de expressão existentes foram utilizados os lentivírus.

- Estabelecimento em modelo cirúrgico de infecção bacteriana.

O modelo de infecção é importante para testar a eficácia antimicrobiana das HBD, bem como a eficácia do método de expressão destes genes, após transdução dos tecidos. Utilizaram-se inicialmente *Escherichia coli* (ATCC8739), *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110⁺, devido a serem os principais microorganismos responsáveis por infecções cirúrgicas (Pina *et al.*, 2010). No entanto, prosseguiu-se com as *Pseudomonas aeruginosa* para o modelo de infecção em rato *Wistar*, devido a tratarem-se dos principais microorganismo a afectarem este tipo de cirurgia em humanos.

A técnica cirúrgica utilizada nos ratos *Wistar* foi optimizada e efectuada pelo Doutor Diogo Casal no âmbito da sua tese de doutoramento, tratando-se de uma mais-valia para este trabalho.

2. Materiais e Métodos

2.1. Produção de DNA plasmídicos em células bacterianas

2.1.1. DNA plasmídicos

Durante o decorrer desta tese foram utilizados vários DNA plasmídicos (pDNA), com diferentes características, cuja informação encontra-se resumida na Tabela 3.

Tabela 3 – DNA plasmídicos utilizados

Nome	Resistência a antibióticos	Função/Proteínas	Referência	Anexo
pMD2.G ^[1] (G1), (G2)	Ampicilina	envelope	#12259, Addgene®	Anexo III
psPAX2 ^[1] (G1)	Ampicilina	empacotamento	#12260, Addgene®	Anexo IV
pMDLg/pRRE ^[1] (G2)	Ampicilina	empacotamento	#12251, Addgene®	Anexo V
pRSV-Rev ^[1] (G2)	Ampicilina	empacotamento	#12253, Addgene®	Anexo VI
pLL3.7 ^[1]	Ampicilina	Gene reporter GFP	#11795, Addgene®	Anexo VII
pLKO.1 ^[2]	Ampicilina, Puromicina	Gene reporter (DsRed)	Cedido ^[2]	Anexo VIII
pLenti6 hBD-2	Ampicilina, Blastidina	hBD-2	Produzido ^[1]	-
pLenti6 hBD-3	Ampicilina, Blastidina	hBD-3	Produzido ^[1]	-

Legenda: ^[1] Cedido pelo Doutor José Ramalho do Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC)/Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Nova de Lisboa; ^[2] Cedido pelo Doutor Joseph Lau do Roswell Park Cancer Institute (G1) – Grupo 1 de pDNA utilizados na formação dos lentivírus; (G2) Grupo 2 de pDNA utilizados na formação dos lentivírus; hBD-2 – β -defensina humana 2; hBD-3 – β -defensina 3

2.1.2. Transformação bacteriana

Procedeu-se à transformação de *Escherichia coli* DH5 α competentes com os pDNA que codificam as proteínas envolvidas na síntese dos lentivírus. No caso dos pDNA lentivirais, pLenti6, utilizou-se as *E. coli* Stbl3 competentes. Ambas as estirpes competentes foram cedidas pelo Doutor José Ramalho.

A temperatura óptima de crescimento da *E. coli* DH5 α é de 37 °C e da *E. coli* Stbl3 é de 30 °C.

Para a transformação bacteriana procedeu-se ao descongelamento das bactérias competentes que se encontravam armazenadas a -80 °C, adicionaram-se 100 μ L destas a um microtubo e 1 μ L do pDNA desejado, e incubou-se esta mistura em gelo durante 30 min, de modo a favorecer a concentração dos pDNA perto das membranas celulares. De seguida, incubou-se num banho termostático a 42 °C (Tectron Bio da P Selecta®) durante

1 min, de modo a formarem-se poros nas membranas bacterianas possibilitando a entrada do pDNA. Por fim voltou-se a incubar em gelo durante 2 min, com o objectivo de tornar as membranas novamente selectivas. Finalizado o choque térmico adicionou-se 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) ao microtubo e incubou-se a 37 °C ou 30 °C, dependendo da estirpe bacteriana, durante 1 h. 100 µL de células transformadas foram então plaqueadas em placas de *petri* com meio LB sólido suplementado com ampicilina (Bioline®) numa concentração de 100 µg/ml, as restantes células foram preservadas a -80 °C (Thermo Electron Corporation) em glicerol na proporção 2:3.

As colónias obtidas nas placas obtidas após incubação durante a noite numa estufa a 37 °C ou 30 °C foram recolhidas e inoculadas em meio LB líquido suplementado com ampicilina e deixadas a crescer durante a noite a 37 °C ou 30 °C, com uma agitação de 250 rotações por minuto (rpm) numa incubadora de agitação orbital (Medline Scientific Limited MD3000), de modo a se obter um elevado número de cópias dos respectivos pDNA. As bactérias resultantes destes crescimentos foram preservadas a -80 °C em glicerol na proporção 2:3 até à sua utilização.

2.1.3. Extracção e quantificação dos DNA plasmídicos

As extracções de pDNA foram feitas através dos sistemas comerciais Miniprep kit (#27104, Quiagen®) ou Midiprep kit (#12143, Quiagen®), tendo-se seguido as instruções do fabricante.

Para estas extracções, as bactérias transformadas e armazenadas como descrito anteriormente (secção 2.1.3) foram crescidas durante a noite a 37 °C ou 30 °C (dependendo da estirpe utilizada) a 250 rpm em de meio LB (5 mL no caso do Miniprep Kit ou 50 mL no caso do Midiprep Kit) suplementado com ampicilina numa concentração de 100 µg/ml.

No final das extracções procedeu-se à quantificação dos pDNA obtidos com base na leitura no espectrofotómetro (UV-1700 PharmaSpec, UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu®), das absorvâncias de 260 (A260) nm (pico de absorção dos ácidos nucleicos), recorrendo à relação: uma unidade de A260 corresponde a 50 µg de DNA. O estado de pureza das amostras também foi determinado através da relação entre os valores das leituras a 260 nm e a 280 nm (pico de absorção das proteínas), ou seja, foram consideradas amostras de pDNA puro sempre que se obtiveram valores de A260/A280 entre 1,8 e 2,0.

Durante o procedimento de extracção utilizaram-se os seguintes equipamentos, minicentrífuga (Thermo Scientific Heraeus® Fresco™ 17 Centrifuge), vortex (MS2 Minishaker, IKA®) e banho termostatzado (General Electric®).

2.1.4. Avaliação da integridade do DNA plasmídico em electroforese em gel de agarose

Para confirmar a integridade dos pDNA extraídos procedeu-se a uma electroforese em gel de agarose (molecular grade, Bioline®) a 1% (m/v). Utilizaram-se também as enzimas de restrição *EcoRI* (50 U/μL) e *PstI* (10 U/μL) (New England BioLabs®) para efectuar a digestão dos pDNA de modo a confirmar inicialmente, como base no peso molecular dos fragmentos obtidos, se os plasmídeos que nos foram fornecidos correspondiam aos desejados. A digestão dos pDNA foi efectuada durante 2 h a 37 °C, utilizando BSA e tampão *multicore*.

O gel de agarose a 1% (m/v) foi preparado em tampão TBE 1x (Tris-Borato-EDTA) e após ser fervido adicionou-se Brometo de Etídeo (Merck®) numa concentração final de 0,5 μg/mL. As amostras foram aplicadas contendo um quinto do volume de *Loading Buffer* de modo a conferir densidade às amostras e possibilitando a visualização da frente da electroforese. As electroforeses foram efectuadas a 100 V durante 2 a 3 h. Utilizaram-se os marcadores 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™), HyperLadder I (Bioline®), HyperLadder II (Bioline®) e Hyperladder IV (Bioline®).

2.2. Cultura e manutenção de linhas celulares

Neste trabalho foram utilizadas as linhas celulares, HEK293FT, HEK293A (derivadas de HEK293 - *Human Embryonic Kidney 293*) e CHO-P (*Chinese Hamster Ovary P*, células que expressão P-selectina). Estas células são caracteristicamente aderentes a superfícies plásticas polarizadas e foram mantidas na estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ em atmosfera húmida (Heraeus® HERAccl®).

As linhas celulares HEK293FT e HEK293A foram gentilmente cedidas pelo Doutor José Ramalho do CEDOC/FCM-UNL.

A produção dos lentivírus foi efectuada na linha celular HEK293FT que é ideal para a produção de vírus, uma vez que é derivada da linha celular 293F e expressa constitutivamente o SV40 large T antigen do plasmídeo pCMVSPORT6TA_g.neo sob o

controlo do promotor do citomegalovírus humano (CMV), que tem demonstrado maximizar a produção de vírus em HEK293 (Naldini *et al.*, 1996a). Assim, a linha celular 293FT é um hospedeiro particularmente adequado para a produção de construções lentivirais (Invitrogen, 2006).

As células HEK293FT foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) completo (suplementado como descrito no Apêndice I). No entanto na fase de incubação das HEK293FT com os agentes transfectantes foram omitidos do meio o Soro Fetal Bovino (FBS) e a solução de penicilina-estreptomicina (DMEM incompleto I, ver Apêndice I).

As células HEK293A e CHO-P foram utilizadas para a transdução com os lentivírus produzidos anteriormente em HEK293FT. As HEK293A foram mantidas em DMEM completo, enquanto as CHO-P foram mantidas em *Minimum Essential Media* (MEM) completo suplementado como descrito no Apêndice I.

Conforme a conveniência as linhas celulares foram mantidas em frascos de cultura com filtro Cell Star® (Greiner bio-One) ou em placas de cultura de tecidos 100x20mm (BD Falcon™).

A manutenção das culturas variou dependendo da linha celular e o tempo que demoravam a atingir a confluência. Nomeadamente a linha HEK293A foi subcultivada a cada três dias, devido à sua rápida proliferação, enquanto as linhas HEK293FT e CHO-P a cada quatro a cinco dias. Entre as subculturas, sempre que o meio de cultura apresentou um pH básico, indicado pela cor, com base na presença de um indicador de pH (vermelho fenol) no meio, este foi renovado.

Para remover as células do frasco ou placa de cultura, recorreu-se à utilização de Tripsina 5% (v/v) (Tripsina 25%, Gibco®) em PBS 1X, a 37 °C durante 4-5 min, de modo a dissociar a matriz das células do plástico das placas, e assim obter células individualizadas. Por ser uma enzima proteolítica inespecífica, cuja acção prolongada pode conduzir à lise celular, foi necessário inibir a acção da Tripsina ao fim destes 4-5 min com FBS a 10% em PBS 1x.

De seguida as células foram transferidas para um tubo *falcon* e centrifugadas a 250g durante 5 min na centrífuga Megafuge® 1.0R, Heraeus®. No caso das linhas HEK293FT e CHO-P a subcultura foi feita de um frasco para dois, enquanto na linha HEK293A de um frasco para seis.

2.3. Armazenamento das linhas celulares

No decorrer do trabalho houve a necessidade de armazenar as linhas celulares, de modo a ter sempre disponível as células a utilizar e ter um maior controlo das passagens das linhas celulares. Para tal, foi efectuado um banco de células principal e um de trabalho, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O banco de células principal foi obtido após a proliferação da segunda passagem das linhas celulares, tanto HEK293FT como HEK293A, e o banco de células de trabalho foi obtido após a proliferação da sexta passagem das linhas celulares, sendo que as linhas celulares nos foram cedidas com cerca de 30 passagens.

A congelação das células foi feita após a centrifugação a 250g de modo a remover a tripsina, tendo-se ressuspendido as células em meio DMEM completo suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®). O meio de congelação foi preparado no momento da utilização, e após as células serem ressuspendidas foram transferidas imediatamente para os criotubos que foram guardados numa caixa de congelação da Nalgene™ Cryo com isopropanol, onde ficaram durante 24 h, na arca a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deste modo garante-se que a congelação é feita pela diminuição da temperatura de $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Posteriormente os criotubos foram transferidos para uma caixa de armazenamento permanecendo na arca a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até utilização das células.

Para o descongelamento das células (que deve ser efectuado rapidamente) os criotubos foram incubados num banho termostaticado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante cerca de 1 minuto. Transferiu-se o seu conteúdo para um tubo *falcon* de 15 mL e centrifugou-se a 180g durante 5 min. Ressuspenderam-se as células no volume apropriado do meio de cultura e cultivaram-se as células em placa ou frasco de cultura na estufa húmida a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 5% de CO_2 .

2.4. Obtenção de culturas primárias – células dendríticas derivadas de monócitos humanos

2.4.1. Método de separação por coluna imunomagnética LS

Para além das linhas celulares acima referidas, também foram utilizadas neste trabalho culturas primárias, nomeadamente células dendríticas (DC). Estas foram obtidas através da diferenciação de monócitos humanos, obtidos a partir de concentrados leucoplaquetários (*buffy coats*) de doadores saudáveis, fornecidos pelo Instituto Português do Sangue.

Inicialmente procedeu-se à separação das células mononucleares, que consiste numa fracção celular composta maioritariamente de monócitos e linfócitos, através de centrifugações em gradiente de densidade, na centrífuga Megafuge® 1.0R (Heraeus®). Para tal, o concentrado leuco-plaquetário foi diluído em PBS 1x, numa proporção de 2:3, e centrifugado a 1083g durante 10 min, sem sistema de travagem, para remoção das plaquetas e dos eritrócitos. Após a centrifugação, o anel leucocitário (anel que se encontra na interfase) foi removido e transferido para um novo tubo, onde foi diluído três vezes em PBS 1x, sendo a ressuspensão feita cuidadosamente. Num outro tubo com 12 mL de Ficoll-Hypaque (Biochrom AG®) foi adicionado lentamente o concentrado diluído, de modo a não perturbar a camada de Ficoll-Hypaque. Este tubo foi sujeito a uma centrifugação de 1083g durante 20 min, num rotor oscilante sem sistema de travagem. O Ficoll-Hypaque possui uma densidade superior à das células mononucleares e inferior aos glóbulos vermelhos e granulócitos, o que permite uma separação diferenciada. Como resultado da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interfase, entre o plasma (fase superior) e os eritrócitos e granulócitos em Ficoll-Hypaque (fase inferior). O anel resultante foi transferido para um novo tubo e foi ressuspendido em PBS 1x e sujeito a duas centrifugações sucessivas, a primeira a 340g durante 10 min e a segunda a 110g durante 5 min a 4°C, para remover os granulócitos restantes, plaquetas e resíduos de Ficoll-Hypaque. O sedimento celular resultante foi ressuspendido em 10 mL de PBS 1x, sendo retirado uma pequena amostra à qual se adicionou azul tripiano a 0,4% (m/v) para determinar a concentração celular (número de células/mL) e a viabilidade celular, usando uma câmara de Neubauer (Brigh-Line), e contando o número de células a microscópio óptico (Nikon®). Enquanto se procedia à contagem das células centrifugou-se a restante suspensão a 110g durante 5 min.

De acordo com a concentração celular obtida ressuspenderam-se as células em 80 µL de Tampão 'Beads' (solução para a incubação com as microesferas magnéticas) frio e 20 µL de microesferas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec®) por cada 3×10^7 células. As microesferas imunomagnéticas anti-CD14 reconhecem apenas os monócitos, uma vez que estes expressam na sua superfície o marcador CD14.

As células foram incubadas com as microesferas durante 15 a 20 min a 4°C, sendo posteriormente lavadas com Tampão 'Beads' frio e centrifugadas a 250g durante 10 min. O sedimento celular resultante foi ressuspendido em 3 mL de Tampão 'Beads' frio e a suspensão celular obtida foi adicionada à coluna de selecção positiva LS (Miltenyi Biotec®) num MidiMACS™ Separator (Miltenyi Biotec®), tendo sido a coluna previamente equilibrada com 3 mL do tampão. O MidiMACS™ Separator exerce um campo magnético, promovendo a retenção na coluna dos monócitos ligados às esferas imunomagnéticas anti-CD14. A

coluna foi lavada três vezes com 3 mL de Tampão 'Beads' tendo sido primeiro recolhida e desprezada a fracção celular CD14 negativa. A coluna foi então retirada do campo magnético e a fracção celular CD14 positiva é eluída por adição de 5 mL de Tampão 'Beads' e por acção da pressão produzida com o auxílio do êmbolo. Os monócitos assim obtidos foram sujeitos a nova centrifugação de 10 min a 250g e posteriormente ressuspensos em meio *Roswell Park Memorial Institute* – 1640 (RPMI-1640) completo (suplementado de acordo com o Apêndice I) e distribuídos por uma placa de cultura de 24 poços (Greiner bio-One) com uma concentração de 1×10^6 células/mL. Ao meio de cultura onde os monócitos foram incubados adicionou-se ainda 750U/ mL de *Interleukin 4* (IL-4) (R&D Systems) e 1000U/mL de *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating factor* (GM-CSF) (R&D Systems). As culturas foram mantidas durante seis dias na estufa a 37 °C com 5% de CO₂, tendo o meio de cultura sido renovado a cada dois dias, tendo sido retirado apenas metade do meio e adicionado o mesmo volume de meio fresco suplementado com a IL-4 e GM-CSF. Ao sexto dia de cultura os monócitos encontravam-se diferenciados em DC imaturas, podendo ser utilizadas nos ensaios pretendidos.

2.4.2. Método de aderência celular ou “*Panning*”

Alternativamente ao método descrito anteriormente, as DC foram também obtidas através da diferenciação de monócitos humanos, pelo método de aderência ou “*Panning*”. Este método baseia-se nas características diferenciais das células que fazem parte do anel leucocitário (após a centrifugação com Ficoll-Hypaque), nomeadamente o facto de os monócitos aderirem naturalmente a uma superfície sólida, enquanto os linfócitos se mantêm em suspensão.

Numa primeira fase o procedimento efectuado foi o mesmo que o da separação por coluna imunomagnética LS, descrito na secção anterior, sendo que as diferenças no procedimento foram a partir da contagem de células. Assim, tendo em conta a concentração celular obtida, as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado, de acordo como descrito no procedimento anterior, de modo a obter 20×10^6 células/mL, e foram incubadas numa placa de cultura de tecidos 100 x 20mm (BD Falcon™) durante 45 minutos na estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Durante este período de tempo é esperado que ocorra a aderência dos monócitos ao fundo da placa, o que se verificou pela opacidade da placa aquando a finalização da incubação. Foi então removido o meio de cultura inclinando levemente a placa, de modo a remover as células não aderentes (linfócitos), com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, efectuaram-se duas lavagens com meio RPMI-1640, tendo-

se tido o cuidado de pipetar contra as paredes da placa e nunca contra o fundo da placa. Por fim adicionaram-se 10 mL de RPMI-1640 completo com as citocinas IL-4 (750 U/mL) e GM-CSF (1000 U/mL) adicionadas.

As culturas foram mantidas durante seis dias na estufa e o meio renovado a cada dois dias, sendo recolhido apenas metade do meio e adicionado o mesmo volume de meio fresco suplementado com a IL-4 e GM-CSF. Ao sexto dia de cultura os monócitos encontravam-se diferenciados em DC imaturas com características semelhantes às obtidas pelo método descrito anteriormente.

2.5. Produção dos lentivírus na linha celular HEK293FT

A produção dos lentivírus foi efectuada na linha celular HEK293FT, pelas razões referidas na secção 2.2.

As produções de lentivírus foram efectuadas inicialmente em placas de cultura de células de 15 cm (Corning Life Sciences), e posteriormente, em placas de cultura de tecidos de 10 cm (BD Falcon™), em ambos os casos as placas foram previamente tratadas com *poly-L-lisina* 0,1% (Sigma-Aldrich®). A metodologia seguida foi idêntica, como tal, só será descrito o procedimento efectuado nas placas de cultura de 10 cm.

Os lentivírus foram produzidos através da utilização de dois grupos de plasmídeos, o Grupo 1 (G1) constituído pelos plasmídeos pMD2.G (envelope) e psPAX2 (empacotamento), e o Grupo 2 (G2) constituído pelos plasmídeos pMD2.G (envelope), pMDLg/PRRE (empacotamento) e pRSV-Rev (empacotamento), sendo que a cada um destes grupos foi adicionado o plasmídeo com o gene *reporter*, nomeadamente o pLL3.7 que codifica a proteína GFP ou o pLKO.1 que codifica a proteína DsRed, dependendo do ensaio.

A introdução dos plasmídeos nas linhas celulares foi realizada por transfecção, com o auxílio de agentes transfectantes, nomeadamente, a *Polyethylenimine* (PEI) e o Xfect™ cedido pela Clontech®. Após se ter testado os dois agentes, optou-se por realizar os ensaios com a PEI.

Como referido anteriormente, as placas de cultura foram previamente tratadas com *poly-L-lisina* através da adição de 4 mL de *poly-L-lisina* a 0,01% às placas de cultura, de forma a cobrir completamente o fundo da placa. De seguida as placas foram incubadas durante 1h na estufa.

Finalizada a incubação a *poly-L-lisina* foi transferida para um tubo estéril e guardada a 4 °C para os seguintes tratamentos e as placas foram lavadas três vezes

abundantemente com PBS 1x, devido à citotoxicidade associada a este composto. De seguida cultivaram-se as células da linha HEK293FT em cada placa com uma concentração aproximada de $7,5 \times 10^5$ células/mL.

Os grupos de plasmídeos, incluindo o plasmídeo contendo o gene *reporter*, a adicionar às placas nos diferentes ensaios foram preparados consoante o tamanho de pDNA, de modo a adicionar-se o mesmo número de cópias de cada pDNA. Nomeadamente foram preparados os seguintes tubos (ensaio optimizado):

- G1 + DsRed – 4 µg de pMD2.G + 6,7 µg de psPAX2 + 4 µg de pLKO.1
- G1 + GFP – 4 µg de pMD2.G + 6,7 µg de psPAX2 + 4 µg de pLL3.7

As misturas assim preparadas foram submetidas a 70 °C durante 20 min, num termociclador (PTC-100TM, MJ Research) de modo a esterilizar os pDNA, evitando as contaminações durante o processo de transfecção. Posteriormente foram armazenados a -20 °C, até à sua utilização.

Os ensaios da produção dos lentivírus nas HEK293FT foram iniciados quando as placas de culturas se encontravam com uma confluência de cerca de 90%. Começou-se por substituir o meio de cultura 1 h antes da transfecção. Descongelaram-se em gelo os tubos contendo os diferentes grupos de pDNA e adicionou-se conteúdo de cada tubo a 500 µL de meio Opti-MEM (Sigma-Aldrich®). Paralelamente, adicionou-se um determinado volume de PEI (3 a 4 µL de PEI por cada 1 µg de pDNA a utilizar) a outros 500 µL de meio Opti-MEM. Adicionou-se em seguida a solução de Opti-MEM - pDNA à solução com Opti-MEM – PEI e incubou-se durante 45 min, de forma às moléculas de PEI se disporem à volta do pDNA formando um lipossoma.

Finalizada a incubação dos pDNA com o agente transfectante, foi substituído o meio em que se encontravam as HEK293FT por 4 mL de meio Opti-MEM e as soluções com os diferentes lipossomas foram adicionadas gota-a-gota à placa correspondente.

Posteriormente incubaram-se as placas durante 6 h na estufa com a 37 °C com 5% de CO₂ e no final da incubação adicionaram-se 4 mL DMEM incompleto I, como se encontra descrito no Apêndice I.

No dia seguinte, retirou-se o meio e adicionaram-se 10 mL de meio DMEM completo, e incubaram-se as placas novamente na estufa. Após 48 h e 72 h recolheu-se o sobrenadante de cada placa para um tubo *falcon* de 50 mL. Este sobrenadante foi centrifugado a 4000g durante 15 min a 4 °C, transferido para um novo tubo e armazenou-se a 4 °C, para posteriormente, se proceder à ultracentrifugação, com o objectivo de se concentrar os lentivírus.

A ultracentrifugação foi feita em duas etapas, a primeira a 20000g durante 1 h a 4 °C, com o objectivo de se retirar os restos celulares de menor dimensão e a segunda a

150000g durante 1 h a 4 °C. O sobrenadante não foi retirado na totalidade de modo a deixar uma pequena quantidade para ressuspender os lentivírus. Posteriormente, as soluções com lentivírus foram guardadas em alíquotas de 100µL e armazenados a - 80 °C, até serem utilizadas para a transdução quer de linhas celulares ou células primárias, quer de tecidos no modelo animal (ratos *Wistar*).

A adição e a remoção de todas as soluções realizadas às placas de cultura de tecidos foram sempre efectuadas no mesmo local da placa, de modo a minimizar perturbações, tanto ao tratamento efectuado, como às células adicionadas.

Posteriormente, foram produzidos lentivírus que codificam as proteínas hBD-2 e hBD-3 segundo o mesmo procedimento, tendo estes genes sido clonados em plasmídeos pLenti6 e cedidos pelo Doutor José Ramalho (Apêndice II).

2.6. Transdução lentiviral em linhas celulares e células primárias

A capacidade de transdução dos lentivírus produzidos foi testada em duas linhas celulares, nomeadamente a linha CHO-P e a linha HEK293A (ver secção 2.2), utilizando placas de cultura de 12 poços. Assim, adicionaram-se 2 mL de uma suspensão celular da linha CHO-P com uma concentração de $4,0 \times 10^4$ células/mL a cada poço, de modo a que estes ficassem com uma confluência de cerca de 20%. De seguida, inoculou-se (em duplicado) os volumes: 0; 25; 50; 75 e 100 µL das soluções de lentivírus, e analisou-se a fluorescência das células (conferidas pelos genes *reporter* contido no lentivírus) às 24 h e 48 h após a inoculação, no microscópio de fluorescência.

Alternativamente, um ensaio semelhante foi realizado com a HEK293A, sabendo que esta é uma linha mais permissiva à transdução. Neste caso adicionaram-se 2 mL de suspensão de células com uma concentração de $6,0 \times 10^4$ células/mL a cada poço. Os lentivírus foram adicionados às células, no dia seguinte de manhã, nos volumes (em duplicado): 0; 25; 50; 75 e 100 µL. A fluorescência destas células foi analisada em microscopia de fluorescência ao 7º e 14º dia, após alguns ensaios de optimização. Estas células foram ainda marcadas com uma fluorescência adicional, como se encontra descrito na secção 2.6.1.

A capacidade para a transdução dos lentivírus produzidos foi ainda testada em células primárias, nomeadamente em monócitos e em DC, obtidas como descrito anteriormente (ver secção 2.4.). Os lentivírus foram adicionados a $1,0 \times 10^6$ células/mL nos

seguintes volumes (em duplicado): 0; 10 e 100 μL aos dias 0; 3 e 6 de cultura. A aquisição de fluorescência pelas células foi analisada ao longo de 10 dias.

A titulação dos lentivírus foi feita em parceria com o Doutor José Ramalho através de diluições sucessivas dos lentivírus em HEK293A.

A transdução da linha celular HEK293A foi posteriormente realizada com os lentivírus contendo os genes que codificam as proteínas hBD-2 e hBD-3, segundo o procedimento descrito acima para esta linha. Neste caso as células foram mantidas em cultura durante 7 dias, as células e/ou o sobrenadante da cultura foram recolhidos e armazenados para a realização de ensaios posteriores (confirmação da expressão das β -defensinas e ensaios funcionais).

2.6.1. Marcação de linhas celulares

De modo a compreender melhor a localização celular da fluorescência conferida pelos genes *reporter* resultante da transdução lentiviral, procedeu-se a uma marcação fluorescente adicional, em particular do núcleo da célula, especificamente no caso da linha celular HEK293A.

A marcação das células desta linha foi efectuada após a transdução com os lentivírus portadores do pDNA com o gene *reporter DsRED*, com o marcador Sytox Green (Invitrogen®) que tem afinidade específica para os ácidos nucleicos, corando-os de verde fluorescente.

Para esta marcação utilizaram-se lamelas (previamente esterilizadas) no fundo das placas de cultura de 24 poços, para que as células crescessem aderidas a estas. Adicionou-se então a suspensão celular de HEK293A em meio DMEM completo, para que os poços ficassem com uma confluência de 20%.

Para a marcação realizada ao 7 e 14º dia, antes da análise ao microscópica, retirou-se o meio dos poços e procedeu-se à fixação as células com 250 μL de Paraformaldeído a 3,7% (m/v) (Sigma-Aldrich®) durante 10 min. Posteriormente as células foram permeabilizadas com 250 μL de uma solução de Triton 0,1% (v/v) (Packard®) durante 20 min e finalmente marcadas com 100 μL de Sytox Green durante 20 min. Entre cada etapa procedeu-se a três lavagens das lamelas com PBS 1x, durante 5 min. Após a última lavagem para retirar o excesso de corante, as lamelas contendo as células foram transferidas para lâminas de microscopia e as preparações analisadas ao microscópio de fluorescência.

2.7. Ensaio funcionais *in vitro*: ensaios de sensibilidade antimicrobiana às β -defensinas

A finalidade do trabalho desenvolvido foi a optimização de um sistema de transferência de péptidos antimicrobianos, como as β -defensinas, para tecidos/células potencialmente infectados. Tendo esta ideia em mente, paralelamente ao desenvolvimento dos sistemas lentivirais acima descritos, foram realizados alguns testes *in vitro* para testar a sensibilidade das bactérias seleccionadas (tipicamente por conduzirem a complicações pós-cirúrgicas) às β -defensinas. Assim utilizaram-se, numa primeira fase (antes de se obterem os lentivírus com os genes que codificam as proteínas hBD-2 e hBD-3) proteínas comerciais recombinantes de rato da β -defensina 2 (rr BD-4) e 3 (rr BD-3) (ImmunoTools®).

2.7.1. Estudo da curva de crescimento das células bacterianas utilizadas

As bactérias seleccionadas para os ensaios de sensibilidade, foram a *Escherichia coli* (ATCC8739), o *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA) cedidas pela Professora Elisabete Maurício (Professora de Microbiologia da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e Directora da empresa de Elisa Camara, Lda), e *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110⁺, cedidas pela Doutora Isabel Sá Correia do Instituto Superior Técnico).

Antes de se proceder aos ensaios de sensibilidade realizaram-se as curvas crescimento destas bactérias com objectivo de identificar a fase exponencial de crescimento de cada bactéria e garantir posteriormente que se utilizavam bactérias viáveis. Recolhidas no meio da fase exponencial.

Para o estudo da curva de crescimento, realizou-se para cada bactéria um pré-inóculo em 10 mL de meio LB num *erlenmeyer* de 50 mL, ao qual se adicionou uma ansada da bactéria desejada que se encontrava armazenada a – 80 °C. O pré-inóculo foi incubado durante a noite a 37 °C com uma agitação de 250 rpm.

A curva de crescimento foi iniciada com a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) pretendida (0,050 ou 0,200) a partir do pré-inóculo, sendo mantidas as mesmas condições de incubação e o crescimento foi seguido através da leitura no espectrofotómetro da DO₆₀₀ a diferentes tempos (h): 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 10; 12; 24 e 48.

2.7.2. Ensaio de sensibilidade antimicrobiana – Ensaio de difusão radial

Os ensaios de sensibilidade antimicrobiana foram feitos com base na difusão radial das amostras em estudo.

Inicialmente procedeu-se ao ensaio de difusão radial convencional em meio Müller-Hinton agar, em que 100 µL das bactérias seleccionadas foram recolhidas a meio da fase exponencial do crescimento microbiano (ver secção 2.7.1.) e espalhadas nas placas com uma DO₆₀₀ igual a 0,100. Adicionaram-se os péptidos rr BD-4 ou rr BD-3 de diferentes formas, como o objectivo de otimizar o ensaio. Inicialmente o ensaio foi realizado pela adição de 10 µL da amostra a testar directamente ao meio de cultura. Posteriormente o ensaio foi efectuado através da adição ao meio de cultura de uma papel de filtro esterilizado em forma de círculo com um diâmetro de cerca de 5 mm ao qual foi adicionado 20 µL da amostra a testar. Nos dois casos as placas de meio Müller-Hinton foram incubadas a 37 °C, durante a noite. Foi utilizado como controlo a gentamicina, um antibiótico ao qual a *Escherichia coli* (ATCC8739) e o *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA) apresentam sensibilidade (Anexo V).

Realizou-se ainda um ensaio de difusão radial como descrito na literatura (Joly *et al.*, 2004). As bactérias foram crescidas como descrito anteriormente (secção 2.7.1.), sendo que após atingirem o meio da fase de crescimento foram centrifugadas a 6.000g durante 15 min e foram ressuspensas em Fosfato de Sódio a 10 mM, pH 7,4, de modo a obter-se uma suspensão bacteriana com uma DO₆₀₀ igual a 0,100. Paralelamente, foi preparado o Fosfato de Sódio a 10 mM com 1% (m/v) de agarose a pH 7,4 e a cada 10 mL desta solução foram adicionados a 100 µL da suspensão de bactérias preparadas, tendo o cuidado de esta adição ser só feita quando a solução com agarose tiver uma temperatura que não afecte as bactérias a inocular. A mistura foi imediatamente transferida para as placas de *petri* a fim de solidificarem e foram feitos poços com cerca de 5 mm de diâmetro com pontas previamente cortadas e esterilizadas. Foram adicionados 10 µL da amostra a testar a cada poço e as placas foram incubadas durante 1,5 h a 37 °C. No final desta incubação adicionaram-se mais 10 µL da amostra e voltaram a incubar-se as placas durante mais 1,5 h a 37 °C. Espera-se que esta incubação de 3 h no total permita que as amostras difundam na agarose. Por fim foram adicionados 10 mL de meio LB com 1% (m/v) de agar de modo a fornecer nutrientes às bactérias e as placas foram incubadas durante 18 h a 37 °C. Neste ensaio os péptidos com capacidade antimicrobiana rr BD- 4 e rr BD-3 foram ressuspensos numa solução com 0,01% (v/v) ácido acético e 0,1% (m/v) de BSA, ficando com uma concentração de 200 µg/ml. Em todos os ensaios foram feitos controlos com o Fosfato de

Sódio a 10 mM e com a solução de 0,01% (v/v) ácido acético e 0,1% (m/v) de BSA. Foram também feitos controlos com a gentamicina nas concentrações: 2,5; 5; 12,5; 25; 50 mg/mL.

Ainda que preliminarmente, foram também efectuados ensaios funcionais *in vitro* da sensibilidade bacteriana aos péptidos hBD-2 e hBD-3 produzidos pelas células HEK293A transduzidas, utilizando o sobrenadante destas culturas. Estes ensaios foram realizados em meio LB agar ao qual foram adicionados 10 µL de sobrenadante das culturas HEK293A transduzidas com os lentivírus contendo os genes que codificam a proteínas hBD-2 ou hBD-3, separadamente, ou não transduzidas (controlo), no qual já se encontrava plaqueada uma suspensão bacteriana com DO₆₀₀ igual a 0,007, preparada como descrito anteriormente. Estas culturas foram então incubadas durante a noite a 37 °C.

2.8. Transdução lentiviral e estudos funcionais *in vivo*

A transdução dos lentivírus produzidos neste trabalho foi testada também no modelo *in vivo*, nomeadamente em os ratos *Wistar*. Os ratos *Wistar* utilizados geralmente são do sexo masculino (depende da disponibilidade), são sempre utilizados ratos adultos de 0,5 a 1 ano, com um peso de 250 a 350 g, sendo mantidos no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Inicialmente os ratos foram infectados com lentivírus portadores dos genes *reporter* que codificavam as proteínas fluorescentes, de modo a verificar se seria possível, também transduzir tecidos num modelo *in vivo*. Após a confirmação da transdução dos tecidos procedeu-se à transdução com os lentivírus portadores dos pDNA contendo os genes que codificam a as proteínas antimicrobianas hBD-2 e hBD-3.

Tendo em conta que o objectivo desta transferência de genes que codificam proteínas antimicrobianas é diminuir potenciais infecções em tecido sujeito a cirurgia, mais concretamente, retalho venoso arterializado (RVA), a inoculação dos lentivírus com os genes que codificam as proteínas hBD-2 e hBD-3, foi também efectuada em ratos que simultaneamente foram infectados com as bactérias seleccionadas, nomeadamente a *P. aeruginosa*. Posteriormente foram avaliadas, em ratos transduzidos e não transduzidos (controlo), as características micro (avaliação da vasculatura) e macroscópicas (avaliação da necrose, edema, congestão, epidermólise, discência da ferida e exsudatos) do retalho do rato e a quantidade de bactérias presentes no retalho.

2.8.1. Transdução lentiviral no modelo animal

Inicialmente inocularam-se 100 μ L com cerca de 10^7 partículas virais/ml na veia do retalho nos ratos *Wistar*, de lentivírus portadores de pDNA com os genes *reporter* que codificam as proteínas com fluorescência verde (GFP) ou vermelha (DsRed), produzidos como anteriormente descritos (ver secção 2.5.) para verificar a eficácia da transdução dos tecidos e a integração do gene *reporter*, por microscopia de fluorescência.

Para além de se administrar a solução com os lentivírus adicionaram-se 5 μ g de factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) (ImmunoTools®), que melhora a área de sobrevivência do retalho, devido à neovascularização (Ghali *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2006).

Paralelamente também se inocularam os retalhos com adenovírus portadores de pDNA com o gene *reporter GFP*, que foram cedidos pelo Doutor José Ramalho.

As partículas virais foram sempre mantidas a -80 °C e quando necessárias foram descongeladas em gelo e alíquotadas em volumes de trabalho.

2.8.2. Transdução lentiviral e inoculação bacteriana no modelo animal

Retalhos de ratos *Wistar* transduzidos ou não com lentivírus contendo os genes que codificam a hBD-2 e hBD-3 foram infectados com *P. aeruginosa* CECT 110⁺ marcadas com fluorescência (para posterior análise ao microscópio de fluorescência), como descrito na secção 1.3.

Para tal, as bactérias foram inoculadas a partir de um pré-inóculo, como descrito anteriormente, com uma DO₆₀₀ inicial de 0,100 em 10 mL de meio LB num *erlenmeyer* de 50 mL, e foram incubadas a 37 °C com uma agitação de 250 rpm, durante 2,5 h a 3 h, e foram recolhidas a meia fase exponencial. De seguida foi feita a marcação das bactérias com FITC (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*) (Invitrogen®) que é um corante que confere propriedades fluorescentes à bactéria, nomeadamente estas ficam verdes fluorescentes, pois o FITC tem um comprimento de onda de excitação de 494 nm e um comprimento de onda de emissão de 518 nm (dados obtidos do fabricante).

A suspensão de bactérias recolhida na fase exponencial foi alíquotada em microtubos de 1,5 mL e centrifugada a 6200g durante 10 min, lavadas em PBS 1x e novamente centrifugadas a 6200g durante 10 min. As bactérias foram então ressuspensas em 500 μ L de Tampão Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) a pH=9,2, ao qual foram adicionados 5 μ L de FITC. Em paralelo, foram preparadas bactérias não marcadas expostas ou não ao

Tampão Carbonato de Sódio (controlos). Todos os microtubos foram forrados individualmente com papel de alumínio, de modo a evitar a degradação da fluorescência do marcador, e foram submetidos a uma incubação com agitação num *coulter mixer* durante 1 h à temperatura ambiente. Após o período de incubação as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 6,200g durante 5 min e ressuspensas em 1 mL de PBS 1x, sendo este passo de lavagem repetido 3 vezes.

Determinou-se posteriormente a DO₆₀₀ das diferentes suspensões e prepararam-se novas suspensões com uma DO₆₀₀ igual a 0,007 para inoculação. A escolha desta DO₆₀₀ teve por base vários testes em que os ratos foram inoculados com suspensões bacterianas com várias densidades (0,7; 0,07 e 0,007) e optou-se pela que causava infecção nos ratos, mas não a sua morte. Assim os ratos *Wistar* foram inoculados com um 1 mL de suspensão bacteriana, nomeadamente de *P. aeruginosa* preparadas como a cima descrito. Tendo em conta que na literatura se encontra descrito, que para a *P. aeruginosa* um valor de DO₆₀₀ igual a 0,7 corresponde a 10⁷ UFC (Heo *et al.*, 2009).

Devido a utilizarmos uma DO muito reduzida e a marcação com FITC poder afectar a viabilidade das células bacterianas, foram feitos espalhamentos das suspensões inoculadas nos ratos e dos respectivos controlos em placas de LB sólido, com uma DO₆₀₀ igual a 0,007, e com diluições de factor 10 e 100, de forma seriada. Foram adicionados 100 µL das diferentes suspensões às placas de LB e as placas foram incubadas durante a noite a 37 °C. Os ensaios de viabilidade das bactérias marcadas foram sempre efectuados em duplicado.

2.8.3. Recolha de amostras do modelo *in vivo* para quantificação bacteriana

A colheita de fragmentos dos RVA foi efectuada pelo Doutor Diogo Casal. Antes de cada colheita dos fragmentos os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina e diazepam

As amostras de fragmentos dos retalhos foram recolhidas a meio do ensaio (3º dia) e no final do ensaio (entre o 7º e o 10º dia), momento no qual se sacrificavam os ratos.

As colheitas foram feitas com vários propósitos, determinação da quantidade de bactérias viáveis presentes no retalho após maceração do fragmento, seguida de espalhamento em placas de LB sólido e, outra, para posterior quantificação das bactérias por RT-PCR (do inglês *Real Time-Polymerase Chain Reaction*) com recurso a sondas específicas contra o RNA ribossomal 18S e 23S (exclusivo de procariotas).

Para o primeiro caso, a colheita dos fragmentos foi efectuada na zona do retalho e transferida para uma placa de *Petri* de 10 cm estéril.

Os fragmentos foram cortados em pedaços de cerca de 1 a 2 mm de espessura e foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL previamente pesado, de modo a posteriormente, determinar-se a massa do fragmento. De seguida adicionou-se um volume de NaCl a 0,9% de modo obter-se uma suspensão com uma concentração de 100mg/mL. Procedeu-se de imediato à maceração com um pistão durante 5 min, ao fim do qual, foi retirado o sobrenadante e transferido para um novo microtubo. Realizaram-se então várias diluições, nomeadamente, 1/10 e 1/100, de forma seriada e espalharam-se 100 µL de suspensão em placas de *petri* com LB sólido (em duplicado). As placas foram incubadas durante a noite a 37 °C. No dia seguinte foram contadas as unidades formadoras de colónias (UFC) de modo a avaliar se houve proliferação bacteriana no retalho (amostra recolhida de ratos não transduzidos - controlo) e se a transdução lentiviral com os genes das β -defensinas foi eficiente a inibir essa proliferação (amostras recolhidas de ratos transduzidos).

Para quantificação bacteriana por RT-PCR, a colheita dos fragmentos foi efectuada na zona do retalho e transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril previamente pesado.

Durante a recolha de todas as amostras, os microtubos com as amostras já colhidas foram preservados em gelo, e posteriormente foram armazenados a – 80 °C.

Para facilitar a homogeneização do retalho com a finalidade de se extrair o DNA para quantificar as bactérias presentes no retalho, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente durante 30 min e transferidas novamente a arca de – 80 °C durante pelo menos 12h e repetiu-se este procedimento mais duas vezes.

A quantificação bacteriana em amostras recolhidas de ratos não transduzidos (controlo) e transduzidos com lentivírus contendo os genes para as β -defensinas será realizada posteriormente à entrega desta dissertação. Uma vez que as bactérias com que os ratos foram inoculados haviam sido previamente marcadas com FITC (ver secção 2.6.1), foi ainda realizada uma colheita dos fragmentos dos retalhos para determinação da quantidade de bactérias por microscopia de fluorescência. Neste caso os fragmentos recolhidos da zona do retalho foram transferidos para microtubos de 1,5 mL estéreis aos quais foi adicionado PBS 1x de modo a cobrir a amostra. Os tubos foram congelados a – 80 °C para posterior realização de preparações microscópicas.

Sempre que possível foi também feita a colheita dos cateteres utilizados para inocular as bactérias nos retalhos, para posterior análise dos biofilmes microbianos por microscopia de electrónica de varrimento. Assim, estes foram transferidos para um microtubo de 1,5 mL ao qual se adicionou cerca de 1mL de formol a 10%, de modo a cobrir por completo o cateter, permitindo a fixação das bactérias. Os microtubos foram mantidos à temperatura ambiente.

3. Resultados e Discussão

Iniciou-se este trabalho com o objectivo de sobreexpressar os genes que codificam as β -defensinas humanas 2 (hBD-2) e 3 (hBD-3), tendo-se, primeiro isolado os DNA plasmídicos necessários à produção dos lentivírus. Seguiu-se a transdução de linhas celulares ou tecidos, com os lentivírus obtidos, e posterior confirmação da eficácia da expressão das HBD.

3.1. DNA plasmídicos

Os DNA plasmídicos (pDNA) que se encontram caracterizados na Tabela 3 (secção 2.1.) foram avaliados com base na sua pureza, concentração e integridade. Para tal, a qualidade dos pDNA utilizados nesta tese foi analisada após serem extraídos das bactérias, tendo por espectrofotometria, como por electroforese em gel de agarose.

A avaliação da pureza do pDNA determinada por espectrometria, nomeadamente, pela leitura das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm, revelou que nem todos os pDNA se encontravam com a pureza ideal para a produção lentiviral. De facto obtiveram-se alguns valores para a razão A260/A280 fora do intervalo (1,8-2,0) no qual o DNA é considerado puro (Tabela 4)

Tabela 4 – Pureza dos pDNA obtida por espectrometria

pDNA	A260	A280	A260/A280	Concentração de DNA ($\mu\text{g/mL}$)
pMD2.G	5,14	3,09	1,663	257,0
	9,19	4,87	1,887	459,5
psPAX2	5,24	2,90	1,807	262,0
	1,85	1,09	1,697	92,5
	1,91	1,06	1,802	95,5
pMDLg/pRRE	16,08	8,84	1,819	804,0
pRSV-Rev	7,38	4,29	1,720	369
pLL3.7	6,86	4,14	1,657	343
pLKO.1	9,90	5,28	1,875	495

A avaliação da integridade dos pDNA por electroforese em gel de agarose foi realizada em algumas situações de modo a verificar se os pDNA se encontravam íntegros.

Confirmou-se que todas as amostras de pDNA testadas se apresentavam com qualidade para prosseguir com a transfecção, pois não apresentavam degradação. Na Figura 6 apresenta-se um exemplo para o pLKO.1. Para além disso, através da digestão do pDNA com enzimas de restrição seguida de electroforese em gel de agarose confirmou-se que os pDNA eram os correctos por comparação dos resultados obtidos com os esperados pela análise dos mapas de restrição respectivos. No exemplo da Figura 7 está o ensaio com o pLKO.1 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*, obtendo-se fragmentos com os tamanhos esperados, 1069 pares de bases (bp) e 8226 bp.

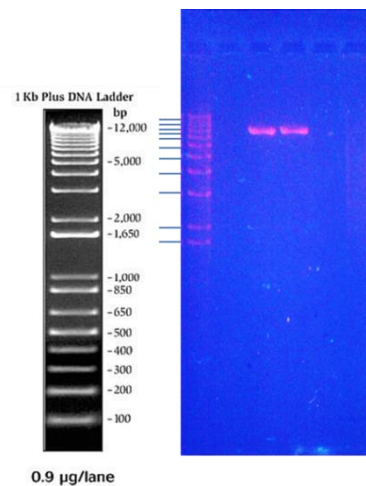


Figura 6 – Confirmação da integridade do pDNA pLKO.1, por electroforese em gel de agarose a 1% (m/v), 100V, 1,5h (Marcador 1Kb Plus DNA Ladder)

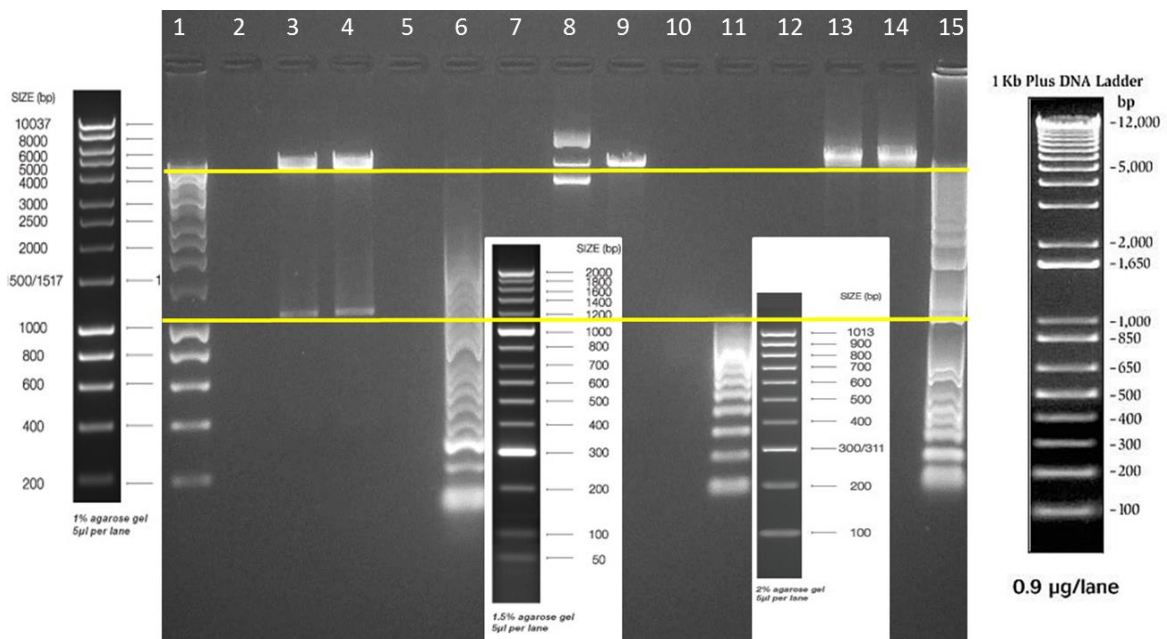


Figura 7 – Confirmação do pDNA pLKO.1 por electroforese em gel de agarose a 1% (m/v), 100V, 2h
Legenda: Poço 1 – Marcador HyperLadder I, 1%; Poços 3/4 – pLKO.1 (*EcoRI* e *PstI*); Poço 6 – Marcador HyperLadder II, 1,5%; Poços 8/9 – pLKO.1 (*EcoRI*); Poço 11 – Marcador HyperLadder IV 2% Poços 13/14 - pLKO.1 (*EcoRI* e *PstI*); Poço 15 – Marcador 1Kb Plus DNA Ladder

3.2. Produção dos lentivírus na linha celular HEK293FT

A produção dos lentivírus foi feita na linha celular HEK293FT (*Human Embryonic Kidney 293 cells* FT) como descrito na secção 2.5.

Os ensaios iniciais da produção dos lentivírus não correram como esperado, pois as células HEK293FT soltaram-se antes das 48 h, ou no momento em que se recolhia o seu sobrenadante às 48 h. Tal aconteceu, porque durante a produção dos lentivírus as células ficam mais sensíveis, uma vez que se encontram muito confluentes, mas também porque a produção viral, pode levar a alterações do metabolismo celular, nomeadamente interferir na síntese de proteínas de adesão. Assim, foram necessários alguns passos de optimização. Nomeadamente, recorreu-se à utilização de *poly-L-lisine* que melhora a aderência celular através da alteração das cargas superficiais (Huang *et al.*, 1983). Verificou-se então que apesar do tratamento das placas com a *poly-L-lisine* afectar o crescimento das células HEK293FT resultando numa diminuição da sua proliferação, a produção dos lentivírus foi melhorada. Nestas condições, as células só se soltavam na periferia da placa, sendo pouco significativa às 48h, mas bastante notório às 72h, devido provavelmente ao manuseamento das placas às 48 h. Verificou-se também que o tratamento das placas com *poly-L-lisine* requeria uma lavagem abundante com PBS 1x (ver secção 2.5.) para remover o excesso deste composto que possui uma toxicidade associada (Lv *et al.*, 2006). Tal foi verificado em alguns ensaios, em que a lavagem não ocorreu com a devida eficiência, resultando num número considerável de células soltas no dia a seguir à adição da suspensão das células HEK293FT às placas com tratamento, em comparação com a placa não tratada.

Para avaliar a eficiência da produção dos lentivírus, numa primeira fase estes ensaios foram realizados com os plasmídeos contendo genes que codificam para proteínas fluorescentes (DsRed e GFP) sendo a avaliação da produção realizada pela observação directa das placas no microscópio de fluorescência. Imagens de microscopia, como as que se podem observar na Figura 8 foram então obtidas, confirmando-se que de facto os lentivírus foram correctamente produzidos e as proteínas de interesse correctamente expressas pois as células transfectadas adquiriram fluorescência. A Figura 8 é representativa de vários ensaios que foram realizados, após optimização do processo, e onde se pode observar as células HEK293FT fluorescentes durante a produção dos lentivírus com os lipossomas PEI-pDNA do G1, às 48 e 72 h.

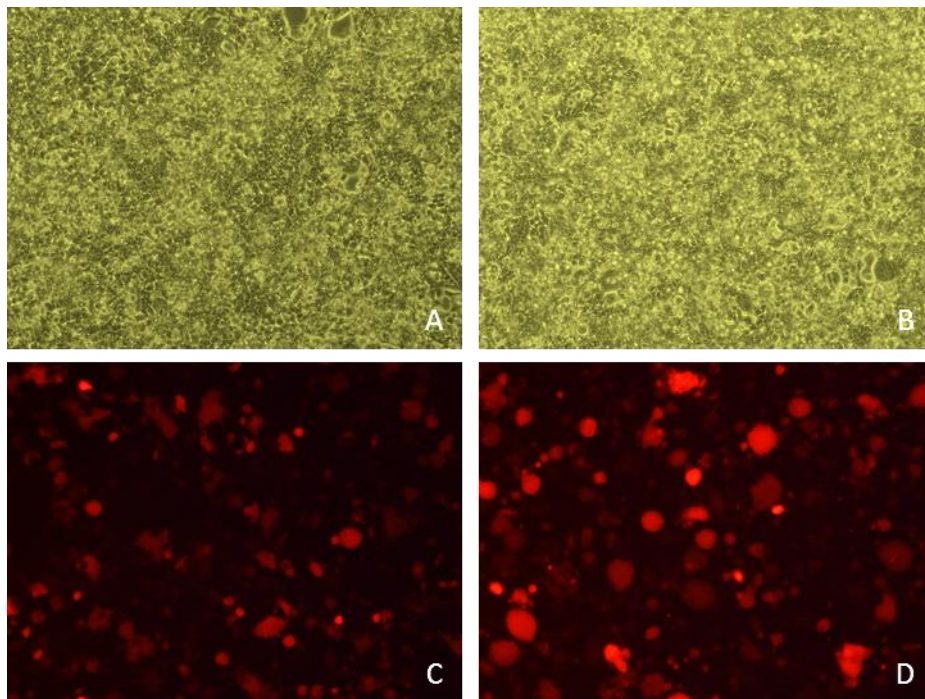


Figura 8 – Produção dos lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 às 48 h (A e C) e 72 h (B e D) em HEK293FT

3.3. Transdução das linhas celulares e células primárias

Optimizada a produção dos lentivírus, procedeu-se à comparação da produção dos dois grupos de vírus, G1 e G2 (ver secção 2.5.) através da avaliação da transdução em linhas celulares. Inicialmente, experimentou-se transduzir a linha celular CHO-P (*Chinese Hamster Ovary expressing P-selectin*) com os vírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 (Figura 9) e do G2 (Figura 10). Verificou-se que a transdução não foi muito eficiente, pois as células transduzidas não apresentavam praticamente fluorescência, quando inoculadas com volumes crescentes de lentivírus (Figuras 9 e 10).

Recorreu-se então à utilização de uma linha celular mais permissiva à transdução, a HEK293A e à utilização de um polímero catiónico para aumentar a transdução viral, o *polybrene* (Davis *et al.*, 2004; Sakuma *et al.*, 2012).

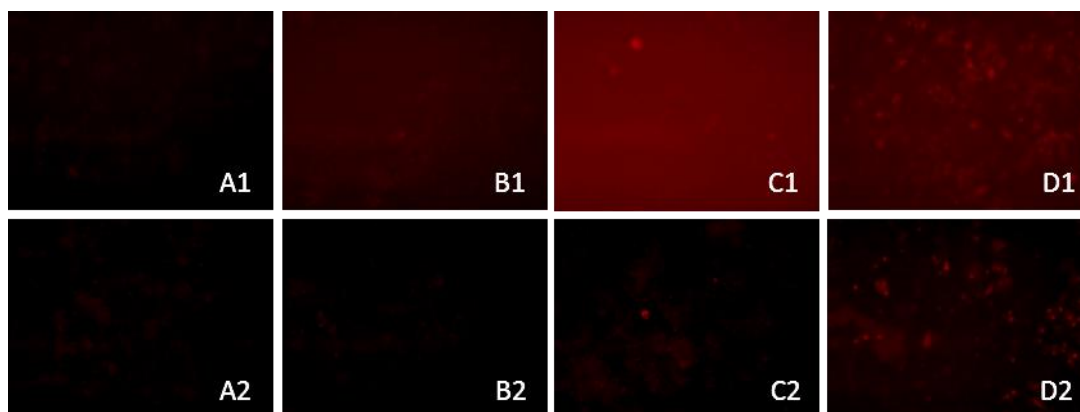


Figura 9 – Transdução com diferentes volumes de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha CHO-P. Inoculação com 25 µL (A), 50 µL (B), 75 µL (C) e 100 µL (D) de lentivírus (Os números representam duplicados do mesmo ensaio)

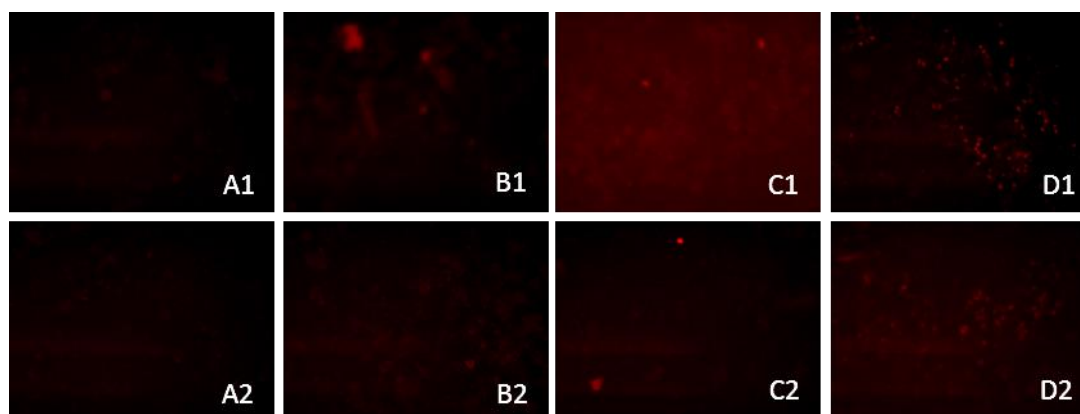


Figura 10 – Transdução com diferentes volumes de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G2 na linha CHO-P. Inoculação com 25 µL (A), 50 µL (B), 75 µL (C) e 100 µL (D) de lentivírus (Os números representam duplicados do mesmo ensaio)

A transdução em HEK293A, inicialmente foi efectuada em placas de 12 poços com diferentes concentrações de lentivírus: 12,5 µL/mL; 25 µL/mL; 37,5 µL/mL, 50 µL/mL e 100 µL/mL. A transdução das células HEK293A com estes lentivírus foi então analisada a microscópio de fluorescência no 7º e 14º dia.

No 7º dia após a transdução com os dois grupos de lentivírus não se observou fluorescência relevante, quer na transdução com os lentivírus da transfecção com os pDNA do G1 (Figura 11), quer na transdução com lentivírus resultantes da transfecção com os pDNA do G2 (Figura 12). No entanto ao 14º dia já se notou alguma fluorescência, tendo-se verificado uma ligeira diferença entre os dois tipos de lentivírus. Nomeadamente as células transduzidas com os lentivírus resultantes dos pDNA do G1 (Figura 13) apresentaram uma maior fluorescência que as células transduzidas com os lentivírus resultantes dos pDNA do G2 (ver Figura 14), pelo menos para as maiores concentrações de lentivírus inoculadas.

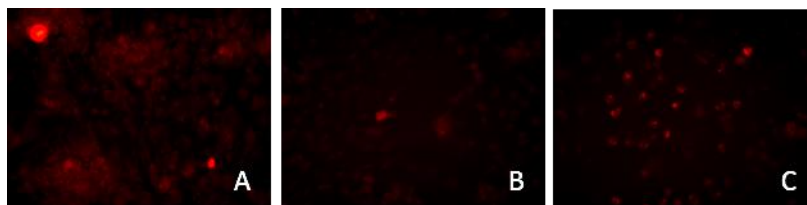


Figura 11 – Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293FT. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C) de lentivírus ao 7º dia



Figura 12 – Transdução com diferentes volumes de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G2 na linha HEK293FT. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C) de lentivírus ao 7º dia

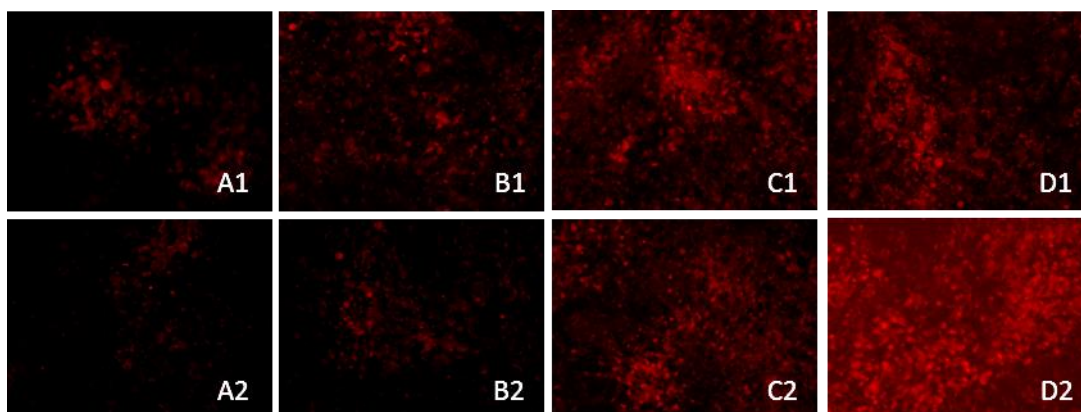


Figura 13 – Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C), 100 µL/mL (D) de lentivírus ao 14º dia. (Os números representam duplicados do mesmo ensaio)

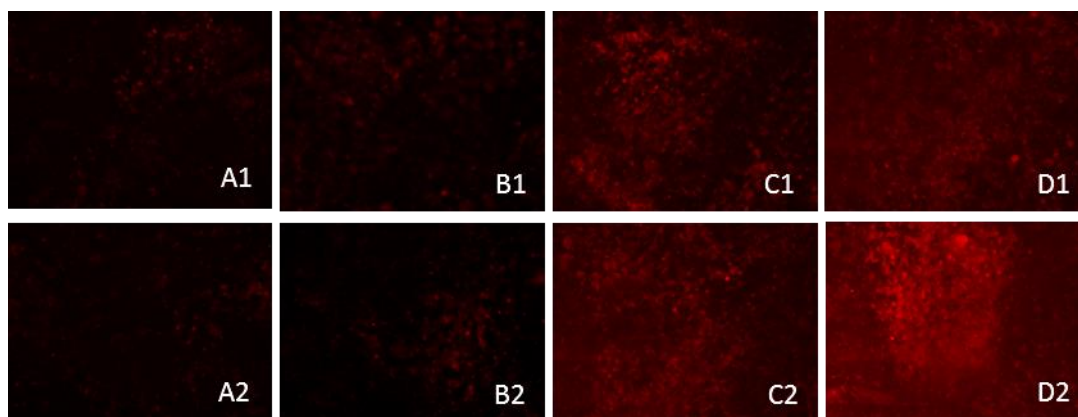


Figura 14 – Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G2 na linha HEK293. Inoculação com 25 µL/mL (A), 37,5 µL/mL (B), 50 µL/mL (C), 100 µL/mL (D) de lentivírus ao 14º dia. (Os números representam duplicados do mesmo ensaio)

Com este resultado optou-se por prosseguir o trabalho apenas com os lentivírus produzidos com os pDNA do G1. Passaram-se então a fazer as transduções em placas de 24 poços com lamelas no fundo da placa para no dia da análise das células, se marcar o núcleo com Sytox Green e se procederem às preparações para microscopia.

Nas imagens obtidas ao 7º dia do ensaio de transdução (Figura 15) verifica-se que as células HEK293A quando inoculadas com os lentivírus apresentam uma fluorescência vermelha crescente com a quantidade de lentivírus inoculado. Este aumento de fluorescência vermelha é ainda mais evidente quando as células são analisadas ao 14º dia (Figura 16). O aumento desta fluorescência quer com o tempo de incubação das células quer com a concentração de lentivírus que foi inoculada é indicativo de que a transdução nesta linha celular foi eficiente e que ocorreu a integração do gene de interesse (*dsRed*) no genoma de forma estável e que a proteína está a ser expressa.

O facto de nem todas as células cultivadas apresentarem fluorescência vermelha poderá justificar-se pelo facto de não ter sido utilizado no meio de cultura nenhum antibiótico para seleccionar exclusivamente as células transduzidas, e assim na mesma placa poderem proliferar células transduzidas e não transduzidas.

Para determinar a eficiência da transdução foi efectuada a titulação dos lentivírus resultantes do G1 nas células HEK293A obtendo-se pelo menos 10^7 partículas virais/mL.

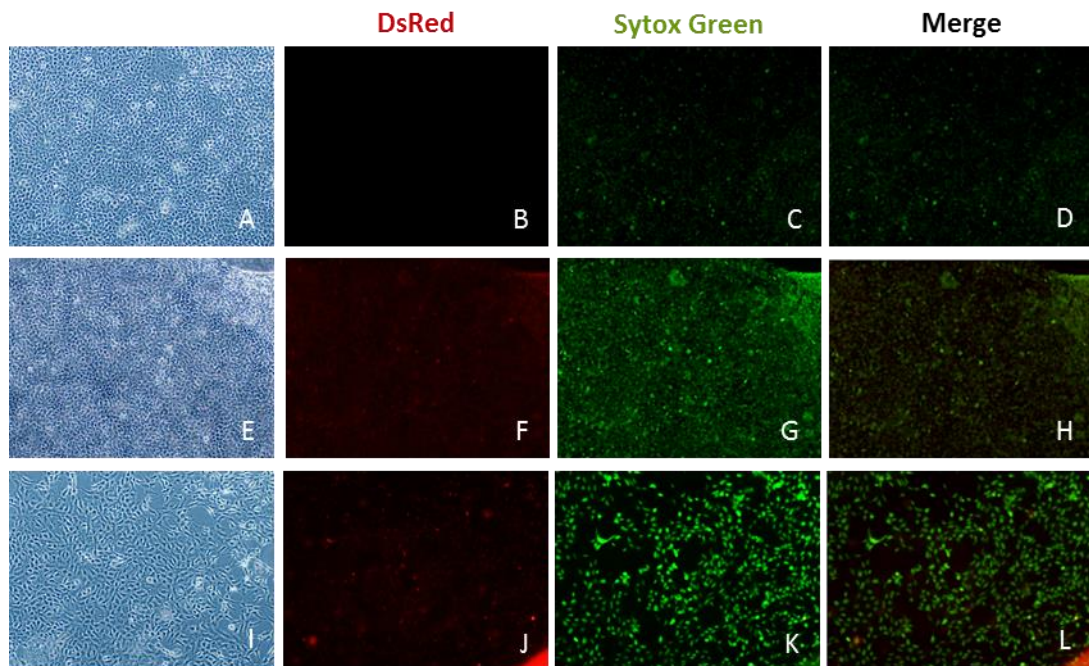


Figura 15 – Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293. Inoculação com 0 µL/mL (A-D) (controlo), 25 µL/mL (E-H), 100 µL/mL (I-L), de lentivírus ao 7º dia. Marcação com Sytox Green

A fluorescência verde (marcação do núcleo) deve aumentar essencialmente com o tempo, pois é proporcional ao aumento do número de células. No entanto, pelas imagens obtidas pensa-se que esta marcação nem sempre foi muito homogénea.

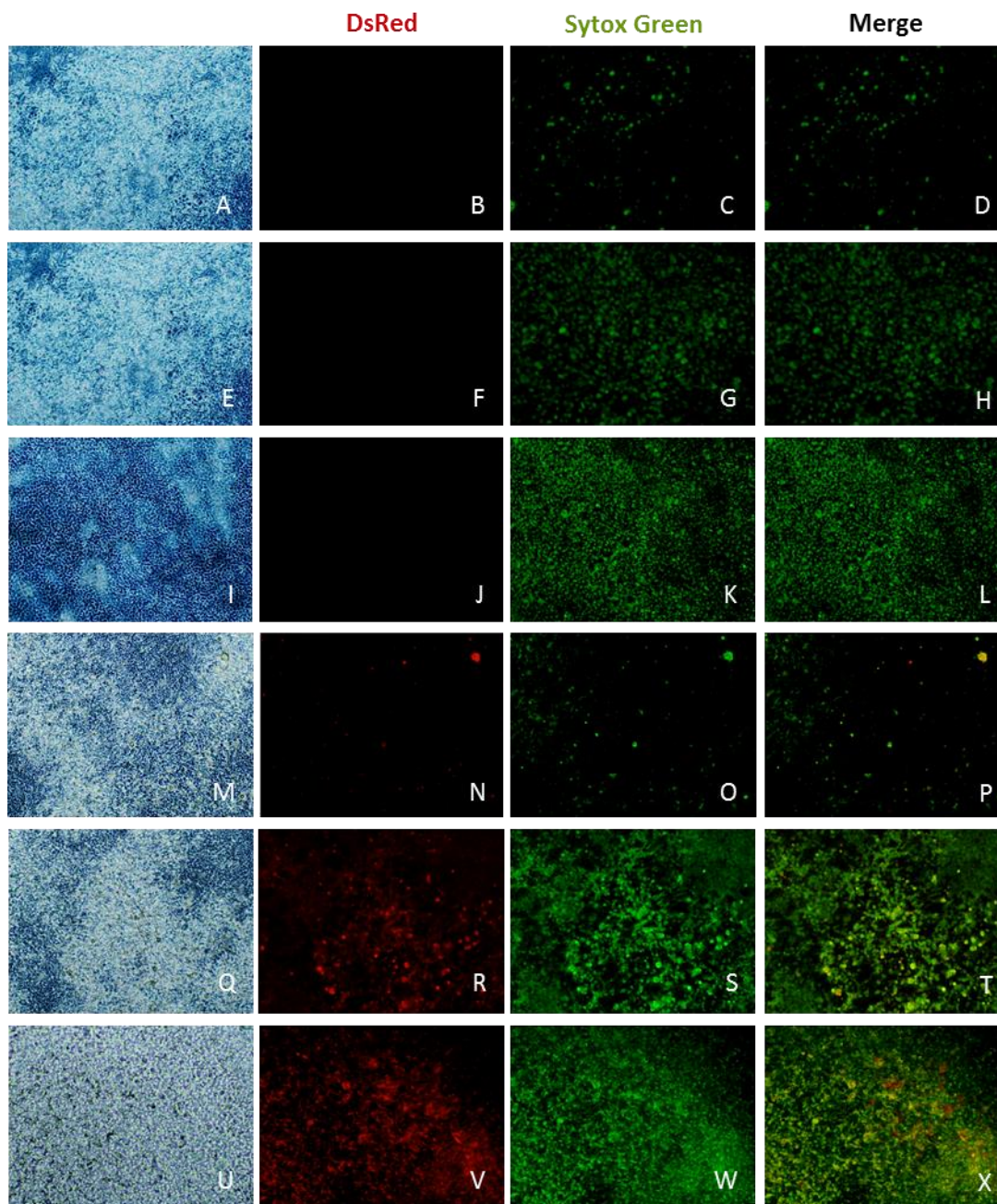


Figura 16 – Transdução com diferentes concentrações de lentivírus resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 na linha HEK293A. Inoculação com 0 $\mu\text{L/mL}$ (A-L) (controlos) e 100 $\mu\text{L/mL}$ (M-X), de lentivírus ao 14º dia. Marcação com Sytox Green

Foram também transduzidas células primárias do sangue. Nomeadamente monócitos no dia 0, ou seja, quando isolados por separação magnética ou por ‘paining’ (secção 2.4.), durante a sua diferenciação e ao fim de 6 dias, quando as células já se encontravam diferenciada em células dendríticas (DC). A transdução destas células foi efectuada com os lentivírus provenientes do G1 com GFP.

A análise dos monócitos por microscopia de fluorescência, no 10º dia, não revelou qualquer fluorescência (resultados não apresentados), sugerindo que não ocorreu

transdução. No entanto verificou-se que em contacto com os lentivírus as células alteravam a sua morfologia, observado por microscopia de contraste de fase (Figura 17) pois provavelmente sofreriam processos de activação celular (característicos das células imunológicas, ver secção 1.6.).

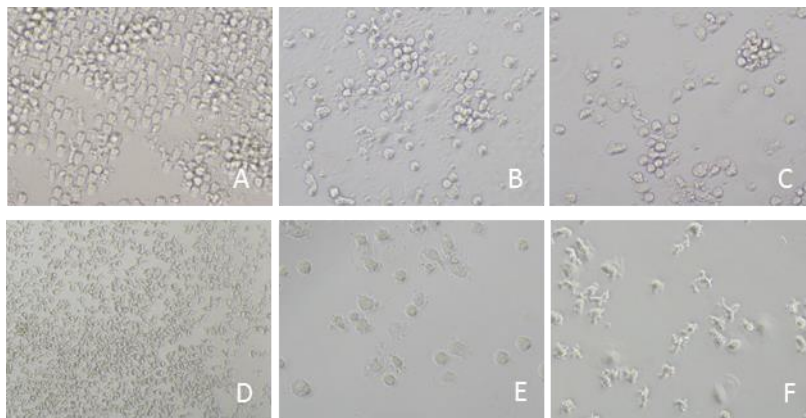


Figura 17 – Transdução com 10^6 partículas lentivirais resultantes da transfecção com os lipossomas PEI-pDNA do G1 em monócitos (D-F) e os respectivos controlos (A-C), 10º dia após transdução

Transduziram-se então estas células em várias fases da sua diferenciação em DC, nomeadamente no dia 0, no dia 3 (a meio do processo de diferenciação) e no dia 6, ou seja quando a diferenciação já se encontrava completa. Mais uma vez, não se detectou fluorescência em nenhum dos casos, mesmo ao final de 14 dias (dados não apresentados), sugerindo que de facto estas células não foram eficientemente transduzidas ou a proteína GFP não se expressou nestas células. Verificaram-se, contudo, alterações morfológicas ao longo da diferenciação, observadas por microscopia de contraste de fase (Figura 18). Estas alterações estão de acordo com o esperado para as células imunológicas deste tipo, pois em contacto com antígenos estranhos elas são activadas, entrando em processo de maturação.

Após vários ensaios de transdução de monócitos e DC com lentivírus sem obter resultados indicativos de que os lentivírus conseguiam ou não infectar as DC, os ensaios foram deixados para o futuro, uma vez que seria necessário explorar melhor o efeito deste procedimento nas células imunes testadas (como por exemplo a análises do estado de maturação das DC) não sendo este um objectivo imediato desta tese.

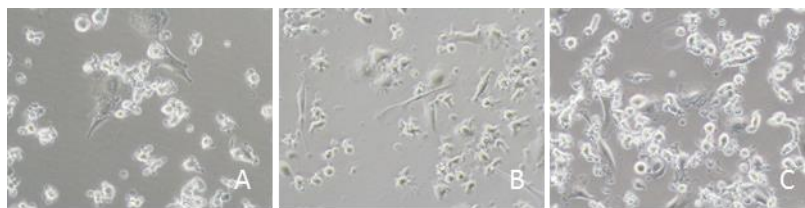


Figura 18 – Monócitos (A e B) e células dendríticas (C) transduzidos com 10^6 do G1 de pDNA no 0º, 3º e 6º (imagem recolhida no 14º dia)

3.4. Transdução dos tecidos

De modo a verificar se os lentivírus produzidos eram eficientes na transdução dos tecidos, ao longo das várias produções de lentivírus do G1, tanto com os genes que codificam a DsRed como a GFP, foram efectuadas administrações destes nos retalhos dos ratos, quer convencionais, quer nos venosos arterializados (secção 1.3.). Como referido anteriormente, os ensaios *in vivo* foram optimizados e efectuados pelo Doutor Diogo Casal.

Na Figura 19 estão representadas várias imagens adquiridas através de microscopia de fluorescência, tanto da zona operada (retalho), como de zonas que se encontram distantes à zona operada do rato *Wistar*, de modo a verificar se os lentivírus administrados ficavam contidos na veia do retalho, ou se difundia para outras zonas do rato. Apenas se encontram representadas as transduções com os lentivírus portadores do gene que codifica a GFP, assim como o respectivo controlo, uma vez que como referido anteriormente, não se obteve uma fluorescência relevante com a transdução com os lentivírus portadores dos genes que codificam a DsRed (dados não mostrados). Verificou-se através da análise das imagens do retalho operado no rato transduzido (E-L) que estes foram transduzidos com GFP. A GFP encontra-se expressa principalmente na veia do retalho operado, ou seja, onde os lentivírus foram incubados. As restantes zonas analisadas do rato transduzido, sugerem que os lentivírus podem ter-se difundido além da veia inoculada, pois verifica-se uma ligeira expressão de GFP, nomeadamente nas veias do Baço. A fluorescência que se verifica na imagem recolhida do tecido da orelha do rato deve-se à autofluorescência que os pelos do rato possuem. Para confirmar se a fluorescência nos tecidos recolhidos dos ratos transduzidos é devido à GFP e não a autofluorescência dos tecidos poderíamos ter procedido a imunoensaios aos tecidos para detectar a GFP, no entanto o objectivo principal era verificar se era possível transduzir os tecidos, o que foi confirmado. Estas imagens foram obtidas através da administração de lentivírus suplementado com VEGF, que como referido anteriormente, aumenta a neovascularização

do retalho permitindo obter melhores resultados tanto em termos de fluorescência, como de cicatrização dos retalhos.

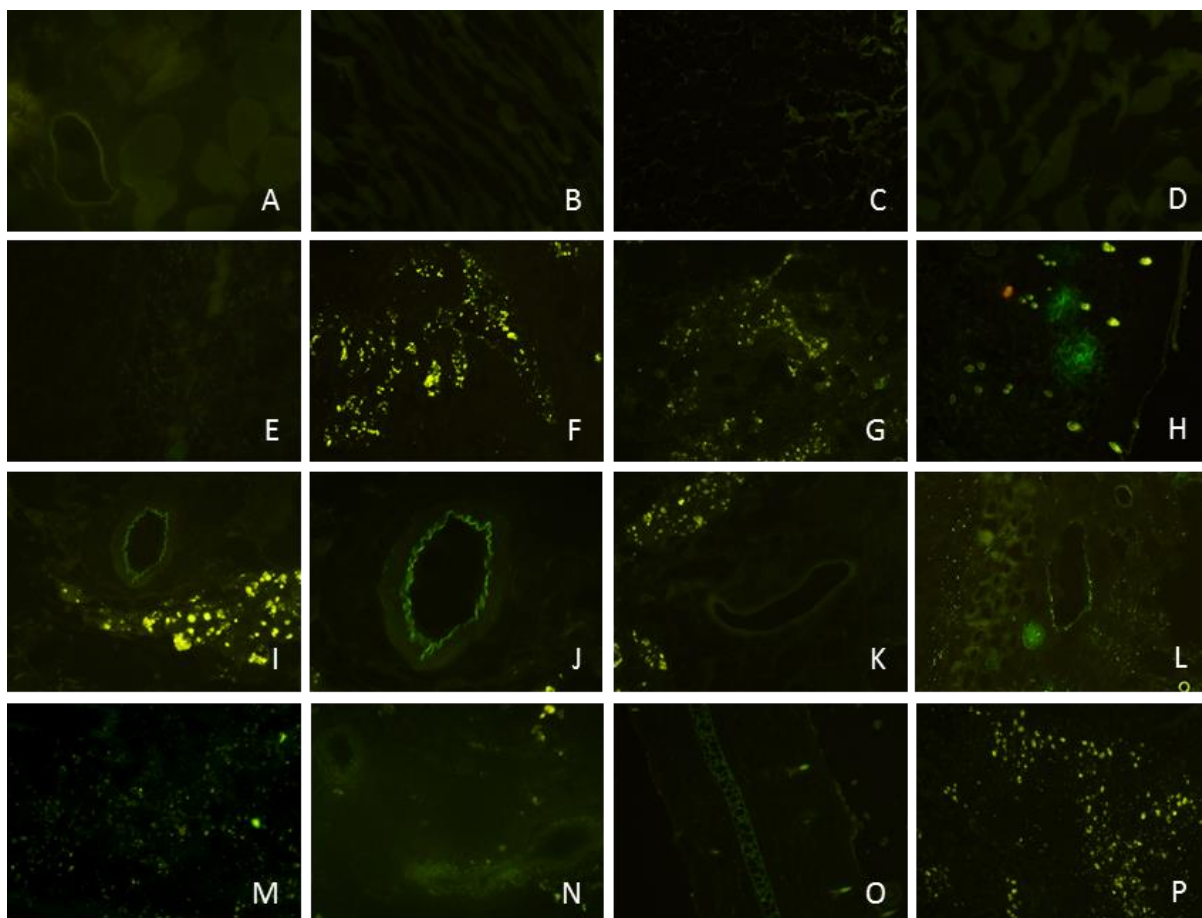


Figura 19 – Imagens de microscopia de fluorescência de tecidos transduzidos com GFP, utilizando lentivírus como vector de expressão e respectivo controlo, em ratos *Wistar*
Legenda: **Rato Controlo:** Retalho não trasduzido (A,B), Músculo infrajacente ao retalho (C) e Baço (D);
Rato Transduzido: Retalho transduzido (E-L), Baço (M, N), Orelha (O) e Timo (P).

3.5. Avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*

Após verificar-se que os retalhos foram transduzidos com sucesso, o próximo passo, foi verificar se os péptidos antimicrobianos escolhidos, nomeadamente as β -defensinas, possuíam actividade antimicrobiana contra os microorganismos seleccionados. Procederam-se então a diversos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.5.1. Avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro*

Os ensaios da sensibilidade antimicrobiana foram efectuados inicialmente com proteínas comerciais, utilizando-se as proteínas recombinantes β -defensinas 2 de rato (rr BD-4, ImmunoTools®) e β -defensina 3 de rato (rr BD-3, ImmunoTools®).

Para otimizar o ensaio começou-se por utilizar a gentamicina, um antibiótico cujo efeito era conhecido nas bactérias seleccionadas, como controlo nas concentrações de 12,5; 25 e 50 mg/mL, em placas de meio Müller-Hinton, com uma gota de 10 μ L de cada concentração. No entanto uma vez que os volumes adicionados se espalhavam pela placa formando halos não simétricos, optou-se por outro método, nomeadamente, à utilização de pedacinhos de papel de filtro esterilizados em forma de círculo, aos quais eram adicionados 20 μ L de cada concentração de antibiótico.

Obtiveram-se então halos inibitórios simétricos à volta dos círculos com as soluções às quais as bactérias possuem sensibilidade. O diâmetro dos halos foi no entanto muito elevado para as concentrações de gentamicina enunciada anteriormente tanto no caso da *Escherichia coli*, como no do *Staphylococcus aureus*. Como tal, procedeu-se ao ensaio com menores concentrações de gentamicina (0,025; 0,25; 2,5 e 5 mg/mL) e testou-se simultaneamente a sensibilidade das bactérias às proteínas comerciais rrBD-4 e rr BD-3 ressuspendidas em água desionizada, com uma concentração de 200 μ g/mL.

Nas Figuras 20 e 21 e Tabelas 5 e 6 pode verificar-se que as bactérias testadas eram sensíveis à gentamicina mas que a concentração utilizada das β -defensinas comerciais não induziu a inibição do crescimento bacteriano, que seria de esperar tendo em conta dados da literatura. De facto, estes dados referem que a *E.coli* é sensível à hBD-2 numa gama de concentração de 10 a 62 μ g/mL, e à hBD-3 em concentrações que variam entre 0,10 a 6 μ g/mL, enquanto o *S. aureus* é sensível a uma gama de concentrações de hBD-2 de 5 a 100 μ g/mL (Midorikawa *et al.*, 2003) e de hBD-3 entre 0,20 a 13 μ g/mL (Tabela 2, secção 1.4.4.) (Dhople *et al.*, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003) (Dhople, Krukemeyer, & Ramamoorthy, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003) (Dhople *et al.*, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003) (Dhople *et al.*, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003).

Assim, decidiu-se efectuar um ensaio semelhante descrito por Joly e colaboradores (Joly *et al.*, 2004), descrito na secção 2.7.2. Verificou-se, mais uma vez, que as bactérias possuíam sensibilidade à gentamicina mas não manifestavam sensibilidade às proteínas comerciais.

Tabela 5 – Ensaio de sensibilidade antimicrobiana à gentamicina, rr BD-4 e rr BD-3 em *Escherichia coli* ATCC 8739

	Concentração (mg/ml)	Densidade Óptica a 600 nm	Diâmetro do halo (cm)
Gentamicina	2,5	0,100	2,40
	5	0,100	2,90
	12,5	0,101	3,60
	25	0,101	3,60
	50	0,101	3,40
rr BD-4	0,2	0,100	0,00
rr BD-3	0,2	0,100	0,00

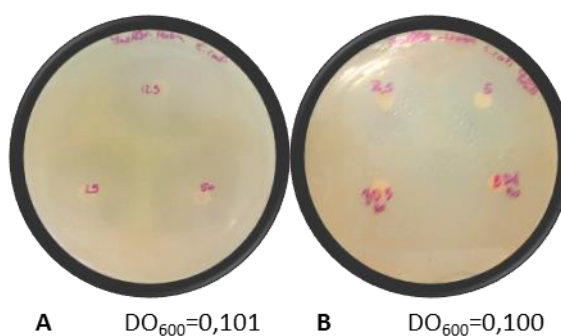


Figura 20 – Teste de sensibilidade microbiana em *Escherichia coli* ATCC 8739 (após 24h)
 Legenda: **A)** gentamicina nas concentrações de 12,5, 25 e 50mg/mL, **B)** gentamicina nas concentrações 2,5 e 5 mg/mL e a rr BD-3 e rr-BD-2 nas concentrações de 200µg/mL

Tabela 6 – Ensaio de sensibilidade antimicrobiana à gentamicina, rr BD-4 e rr BD-3 em *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA)

	Concentração (mg/ml)	Densidade Óptica a 600 nm	Diâmetro do halo (cm)
Gentamicina	0,025	0,102	2,30
	0,25	0,102	3,20
	2,5	0,102	±4,3*
	12,5	0,105	±5,5*
	25	0,105	±5,5*
	50	0,105	±5,5*
rr BD-4	0,2	0,100	0,00
rr BD-3	0,2	0,100	0,00

*Os halos encontravam-se sobrepostos, os valores não são exemplificativos

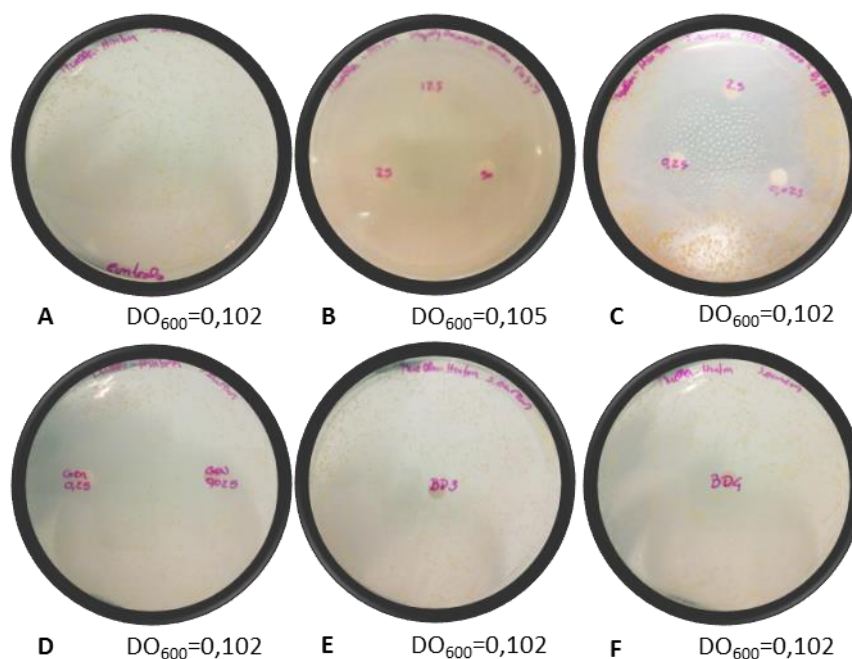


Figura 21 – Teste de sensibilidade microbiana em *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA) (após 24h)

Legenda: **A)** Controlo, **B)** gentamicina nas concentrações 12,5, 25 e 50 mg/mL, **C)** gentamicina nas concentrações 0,025, 0,25 e 2,5 mg/mL, **D)** gentamicina nas concentrações 0,25 e 0,025 mg/mL, **E)** rr BD-3 na concentração 200 µg/mL e **F)** rr BD-2 na concentração 200 µg/mL

Também foram efectuados ensaios de sensibilidade com as *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, mais uma vez não, não se verificou sensibilidade às β -defensinas comerciais (resultados não apresentados), apesar de estar descrito que estas bactérias são sensíveis a concentrações de hBD-2 de 0,10 a 10 e de hBD-3 de 0,39 a 13 µg/mL (Tabela 2, secção 1.4.4.) (Dhople *et al.*, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003) (Dhople *et al.*, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003) (Dhople *et al.*, 2006; Harder *et al.*, 2001; Midorikawa *et al.*, 2003).

Em conjunto estes resultados sugerem que a actividade antimicrobiana destas proteínas comerciais recombinantes não é de facto a esperada. Tal pode dever-se ao facto não possuírem exactamente a mesma sequência de aminoácidos que as β -defensinas humanas, o que pode afectar a sua eficácia como proteínas antimicrobianas.

No entanto os ensaios foram otimizados para o antibiótico controlo e em curso estão agora testes de sensibilidade antimicrobiana usando os sobrenadantes das culturas HEK293A transduzidas com os lentivírus contendo as sequências para codificação dos péptidos hBD-2 e hBD-3. Espera-se que estes sobrenadantes contenham estes péptidos que entretanto terão sido secretados pelas células. Sobrenadantes de células HEK293A não transduzidas são utilizados como controlo, para garantir que, a verificar-se um efeito

antimicrobiano do sobrenadante, este se deve realmente à presença das β -defensinas humanas, no entanto deferia-se utilizar sobrenadantes de HEK293A transduzidas com lentivírus contendo pDNA sem gene de interesse, uma vez que a integração de genes, e mesmo a própria transdução pode afectar as células, alterando o seu metabolismo.

3.6. Avaliação da actividade antimicrobiana das β -defensinas no modelo *in vivo*

Tendo em conta os resultados que mostraram que os retalhos dos ratos *Wistar* eram eficientemente transduzidos (secção 3.4) procedeu-se à transdução destes com os lentivírus (produzidos nas células HEK293FT) contendo os genes para as β -defensinas humanas e assim avaliar a eficiência desta estratégia para debelar as infecções dos locais cirúrgicos.

Os lentivírus foram então administrados na veia dos RVA, em ratos *Wistar*, e uma suspensão de bactérias, nomeadamente *P. aeruginosa*, marcadas com fluorescência, foi inoculada utilizando-se um cateter que foi mantido no retalho (Figura 2, secção 1.3.). Este procedimento foi efectuado pelo Doutor Diogo Casal

A quantidade de bactérias a inocular nos ratos de modo a causar infecção, mas não a sua morte, foi determinada previamente, sendo que se experimentaram suspensões com DO_{600} igual 0,7; 0,07 e 0,007. Optou-se por realizar os ensaios com suspensões bacterianas com DO_{600} igual 0,007, pois a inoculação do rato com as DO_{600} de 0,7 ou 0,07 resultava na sua morte em menos de 24 h e 72 h, respectivamente. Segundo a literatura a DO_{600} igual 0,007 corresponderia a cerca de 10^5 UFC (Heo *et al.*, 2009), sendo que 10^3 UFC já causam uma infecção nestes ratos.

Para confirmar o número de UFC viáveis que estão de facto na suspensão inoculada, tendo em conta, o facto de que a marcação das bactérias com FITC afecta a sua viabilidade, foram efectuados em paralelo espalhamentos em meio LB sólido das bactérias inoculadas (bactérias marcadas), bactérias não marcadas, foram também espalhadas para testar o efeito da incubação com FITC (controlo). Quando comparadas com as bactérias não marcadas, verificou-se uma diminuição da viabilidade de cerca de dez vezes das bactérias marcadas, logo o inóculo, terá cerca de 10^4 UFC/mL.

Após a e a transdução e infecção dos retalhos várias amostras foram recolhidas para avaliação de características macroscópicas/microscópicas deste e quantificação das bactérias, como descrito na secção 2.8. Foram também recolhidas amostras de ratos

controlo, em que o retalho foi infectado mas não transduzido para comparação do efeito antimicrobiano das HBD.

Na Figura 22 encontra-se o resultado de um ensaio preliminar em que se determinou o número de UFC obtidas após a maceração dos fragmentos recolhidos de retalhos tratados com os lentivírus. Neste ensaio preliminar, parece existir uma actividade antimicrobiana por parte das HBD, uma vez que se verificou uma diferença de dez vezes entre o número de UFC da amostra do retalho controlo em comparação com a amostra do retalho inoculado com os lentivírus. Na Figura 23 estão representados alguns dos ratos *Wistar* operados, sendo a imagem A e B encontram-se se os ratos, referidos na Figura 22. Podendo-se verificar que a aceitação do retalho é maior no caso dos ratos aos quais foram administrados o tratamento com os lentivírus (B, C e D) comparando com o controlo (A) onde o retalho não foi aceite, é importante referir que os ratos presentes na Figura 23 foram inoculados com 10^4 UFC/mL de *P. aeruginosa* CECT 110⁺, sendo que o rato A não é representativo de uma cirurgia do tipo RVA. Na Figura 23 o rato (C) é o que apresenta uma maior aceitação do retalho, ou seja, menor necrose, no entanto encontra-se um pouco exsudado.

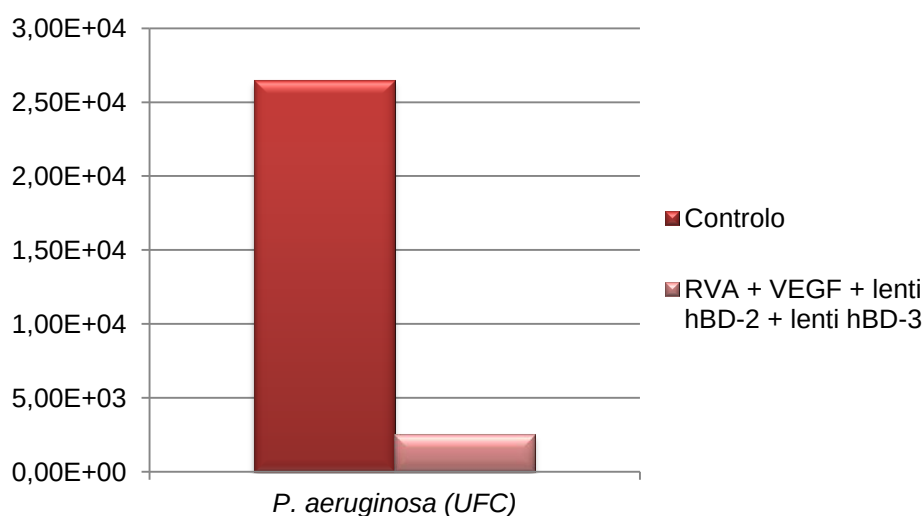


Figura 22 – Gráfico representativo do número de UFC obtidas através da maceração dos RVA nos ratos *Wistar* (10 dias após inoculação)

Legenda: RVA – retalhos venosos arterializados; VEGF – factor de crescimento vascular epidérmico; lenti hBD-2 – lentivírus que possui o gene que codifica a β -defensina 2; hBD-3 – lentivírus que possui o gene que codifica a β -defensina 3

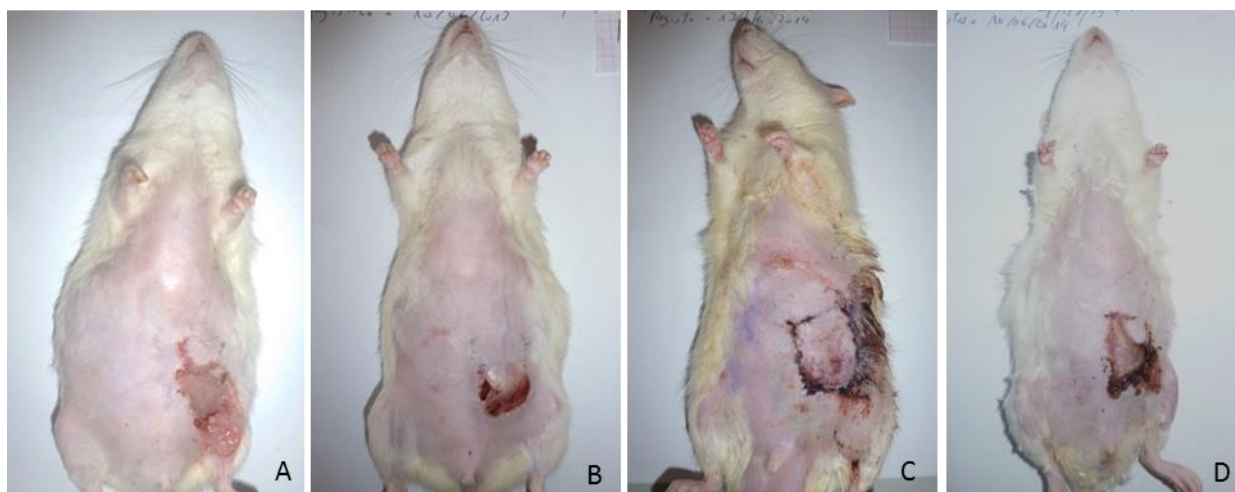


Figura 23 – Ratos *Wistar* submetidos à operação por RVA e inoculados com 10^4 UFC/mL de *P. aeruginosa* CECT 110⁺

Legenda: Rato não transduzido – Controlo (A); Rato transduzido simultaneamente com os lentivírus que codificam a hBD-2 e hBD-3 (B); Rato transduzido com o lentivírus que codifica a hBD-2 (C); Rato transduzido com o lentivírus que codifica a hBD-2 (D)

No entanto, para confirmar estes resultados são necessários mais ensaios do mesmo tipo, que estão presentemente em curso, bem como a quantificação das bactérias nos dois tipos de amostra por outras técnicas, nomeadamente, por observação microscópica (uma vez que as bactérias estão marcadas com fluorescência) e pela técnica de RT-PCR com sondas para o RNA ribossomal 23S e 18S (exclusivo das bactérias).

4. Conclusões e Perspectivas Futuras

Os ensaios realizados no decorrer desta tese permitiram obter dados sobre a utilização de vectores lentivirais para introdução e expressão de genes de interesse em tecidos. Num futuro próximo, poderão ser realizados outros estudos mais complexos, de modo a comprovar as hipóteses que foram levantadas ao longo desta dissertação. Nomeadamente, quanto à actividade antimicrobiana dos β -defensinas humanas 2 (hBD-2) e 3 (hBD-3) tanto em ensaio *in vitro* como *in vivo*, a importância da sua sobreexpressão no local cirúrgico. Encontram-se em estudo outros ensaios de actividade antimicrobiana *in vitro*, de modo a verificar a actividade das HBD, pois mesmo que não se consiga obter um efeito bactericida por parte destes péptidos às bactérias seleccionadas, um efeito bacteriostático já é um resultado muito promissor com vista a aplicação na área clínica.

Alguns dos ensaios previstos já se encontram a ser realizados, nomeadamente, os ensaios funcionais *in vitro*, a quantificação da concentração das HBD nos sobrenadantes das HEK293A e a quantificação bacteriana nos retalhos cirúrgicos por RT-PCR.

Com base nos resultados obtidos até à data, e com o que se encontra relatado na literatura, possivelmente, nos próximos ensaios irá se apostar mais na hBD-3, uma vez que segundo a literatura encontra-se relatado como um péptido com maiores capacidades antimicrobianas, quando comparado com a hBD-2. Após se conseguir obter resultados da eficiência das HBD no modelo *in vivo* com *P. aeruginosa*, tem-se como perspectivas futuras a execução de ensaios similares para o *S. aureus*, uma vez que este também representa um dos principais microorganismos responsáveis pelas infecções no local cirúrgico.

Considera-se ainda no futuro a alteração dos vectores de expressão das HBD, nomeadamente, de lentivírus para adenovírus, devido ao facto deste último não se integrar no genoma e possuir uma maior expressão num curto espaço de tempo, o que pode facilitar a aceitação desta terapia na área clínica.

Referências

- Andreu, D. Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**, 415-33.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., *et al.* (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* **102**, 874-80.
- Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P. & Forssmann, W. G. (1995). hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**, 331-5.
- Bett, A. J., Prevec, L. & Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* **67**, 5911-21.
- Beyer, T., Herrmann, M., Reiser, C., Bertling, W. & Hess, J. (2001). Bacterial carriers and virus-like-particles as antigen delivery devices: role of dendritic cells in antigen presentation. *Curr Drug Targets Infect Disord* **1**, 287-302.
- Bhullar, K., Wagglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., *et al.* (2014). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PlosOne*.
- Biragyn, A., Ruffini, P. A., Leifer, C. A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., *et al.* (2002). Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* **298**, 1025-9.
- Bouard, D., Alazard-Dany, D. & Cosset, F. L. (2009). Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* **157**, 153-65.
- Breckpot, K. Escors, D. (2009). Dendritic cells for active anti-cancer immunotherapy: targeting activation pathways through genetic modification. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **9**, 328-43.
- Brown, K. L. Hancock, R. E. (2006). Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* **18**, 24-30.
- Burke, J. P. (2001). Maximizing appropriate antibiotic prophylaxis for surgical patients: an update from LDS Hospital, Salt Lake City. *Clin Infect Dis* **33 Suppl 2**, S78-83.
- Butel, J. S. (2013). Adenoviruses. 26 ed. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Lange.
- Caldeira, L., Teixeira, I., Vieira, I., Batel-Marques, F., Santiago, L., Rodrigues, V., *et al.* (2006). Monitorização do Consumo de Antibióticos nos Serviços de Cirurgia e de Ortopedia de Seis Hospitais SA.
- Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., *et al.* (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer seminars in immunopathology* **22**, 345-369.
- Chen, C. L., Chiu, H. Y., Lee, J. W. & Yang, J. T. (1994). Arterialized tendocutaneous venous flap for dorsal finger reconstruction. *Microsurgery* **15**, 886-90.
- Chen, H. C., Tang, Y. B. & Noordhoff, M. S. (1991). Four types of venous flaps for wound coverage: a clinical appraisal. *J Trauma* **31**, 1286-93.
- Cho, B. C., Byun, J. S. & Baik, B. S. (1999). Dorsalis pedis tendocutaneous delayed arterialized venous flap in hand reconstruction. *Plast Reconstr Surg* **104**, 2138-44.
- Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A. & Letellier, L. (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J Biol Chem* **268**, 19239-45.
- Dale, B. A., Kimball, J. R., Krisanaprakornkit, S., Roberts, F., Robinovitch, M., O'Neal, R., *et al.* (2001). Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* **36**, 285-94.
- Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A. & Seymour, L. W. (1999). Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther* **6**, 643-50.
- Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R. & Yarmush, M. L. (2004). Charged Polymers Modulate Retrovirus Transduction via Membrane Charge Neutralization and Virus Aggregation. *Biophys J* **86**, 1234-42.

- Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S125-38.
- Dhople, V., Krukemeyer, A. & Ramamoorthy, A. (2006). The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1499-512.
- Dubos, R. J. (1939). Studies on a bactericidal agent extracted from a soil Bacillus: I. Preparation of the agent . Its activity in vitro. *J Exp Med* **70**, 1-10.
- Duits, L. A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P. S. & Nibbering, P. H. (2002). Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **106**, 517-25.
- Durand, S. & Cimarelli, A. (2011). The inside out of lentiviral vectors. *Viruses* **3**, 132-59.
- Dutton, C. J., Haxell, M. A., McArthur, H. A. I. & Wax, R. G. (2002). Mammalian Antimicrobial Peptides. 1 ed. Peptide Antibiotics, pp. 145-192, New York, New York.
- Elouahabi, A. & Ruyschaert, J. M. (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* **11**, 336-47.
- Farkhani, S. M., Valizadeh, A., Karami, H., Mohammadi, S., Sohrabi, N. & Badrzadeh, F. (2014). Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides*.
- Fasika, O. M. & Stilwell, J. H. (1993). Arterialized venous flap for covering and revascularizing finger injury. *Injury* **24**, 67-8.
- Fleming, A. & Allison, V. D. (1922). Observations on a Bacteriolytic Substance ("Lysozyme") Found in Secretions and Tissues. *Br J Exp Pathol* **3**, 252-60.
- Flores-Romo, L. (2001). In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* **102**, 255-62.
- Garcia, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F. J., Kluver, E., Adermann, K., *et al.* (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *Faseb J.* **15**, 1819-21.
- Gause, G. F. a. B., M. G. (1944). Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. *Nature* **154**.
- Ghali, S., Bhatt, K. A., Dempsey, M. P., Jones, D. M., Singh, S., Aarabi, S., *et al.* (2009). Treating chronic wound infections with genetically modified free flaps. *Plast Reconstr Surg* **123**, 1157-68.
- Goold, H. D., Escors, D., Conlan, T. J., Chakraverty, R. & Bennett, C. L. (2011). Conventional dendritic cells are required for the activation of helper-dependent CD8 T cell responses to a model antigen after cutaneous vaccination with lentiviral vectors. *J Immunol* **186**, 4565-72.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Hancock, R. E. & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**, 1551-7.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**, 861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**, 5707-13.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., *et al.* (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* **194**, 769-779.
- Heo, Y. J., Lee, Y. R., Jung, H. H., Lee, J., Ko, G. & Cho, Y. H. (2009). Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2469-74.
- Huang, W. M., Gibson, S. J., Facer, P., Gu, J. & Polak, J. M. (1983). Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry* **77**, 275-9.
- Invitrogen (2006). Growth and maintenance of the 293FT cell line. R700-07 vols.

- Joly, S., Maze, C., McCray, P. B., Jr. & Guthmiller, J. M. (2004). Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* **42**, 1024-9.
- Jones, D. E. Bevens, C. L. (1993). Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* **315**, 187-92.
- Kawakatsu, M., Ishikawa, K. & Sawabe, K. (2013). Free arterialised flow-through venous flap with venous anastomosis as the outflow (A-A-V flap) for reconstruction after severe finger injuries. *J Plast Surg Hand Surg* **47**, 66-9.
- Khan, K. H. (2013). Gene expression in Mammalian cells and its applications. *Adv Pharm Bull* **3**, 257-63.
- Krisanaprakornkit, S., Weinberg, A., Perez, C. N. & Dale, B. A. (1998). Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* **66**, 4222-8.
- Lai, Y. Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* **30**, 131-41.
- Liechtenstein, T., Perez-Janices, N., Bricogne, C., Lanna, A., Dufait, I., Goyvaerts, C., *et al.* (2013). Immune modulation by genetic modification of dendritic cells with lentiviral vectors. *Virus Res* **176**, 1-15.
- Linzmeier, R., Ho, C. H., Hoang, B. V. & Ganz, T. (1999). A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* **233**, 205-11.
- Lodish, H., Matsudaira, P., Berk, A., Zipursky, S. L., Darnell, J. & Baltimore, D. (2000). Biomembranes: Structural Organization and Basic Functions. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman & Co, New York.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery **114**, 100-109.
- Marr, A. K., Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 468-72.
- Midorikawa, K., Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Fujiwara, T., *et al.* (2003). Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect Immun* **71**, 3730-9.
- Nakatsuji, T. Gallo, R. L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol* **132**, 887-95.
- Nakayama, Y., Soeda, S. & Kasai, Y. (1981). Flaps nourished by arterial inflow through the venous system: an experimental investigation. *Plast Reconstr Surg* **67**, 328-34.
- Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 457-63.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. & Verma, I. M. (1996a). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11382-8.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., *et al.* (1996b). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-7.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F. & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* **29**, 464-72.
- Nishi, G., Shibata, Y., Kumabe, Y., Hattori, S. & Okuda, T. (1989). Arterialized venous skin flaps for the injured finger. *J Reconstr Microsurg* **5**, 357-65.
- Nizet, V. (2006). Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* **8**, 11-26.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R. A., *et al.* (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**, 454-7.
- Osswald, W., Caramona, M., Esteves, A. P., Gonçalves, J., Macedo, T., Mendonça, J., *et al.* (2012). *Prontuário Terapêutico* - 11.

- Pazgier, M., Hoover, D. M., Yang, D., Lu, W. & Lubkowski, J. (2006). Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1294-313.
- Pina, E., Maia, M. J. & Pereira, L. G. (2012). *Vigilância das infecções do local cirúrgico: HELICS - cirurgia, Relatório 2006-2010*.
- Pina, E., Silva, G. & Ferreira, E. (2010). *Relatório Inquérito de Prevalência de Infecção 2010, Programa Nacional de Prevenção e Controlo de Infecção Associada aos Cuidados de Saúde*.
- Qu, W., Qin, S. Y., Ren, S., Jiang, X. J., Zhuo, R. X. & Zhang, X. Z. (2013). Peptide-based vector of VEGF plasmid for efficient gene delivery in vitro and vessel formation in vivo. *Bioconjug Chem* **24**, 960-7.
- Ryan, L. K., Dai, J., Yin, Z., Megjugorac, N., Uhlhorn, V., Yim, S., et al. (2011). Modulation of human beta-defensin-1 (hBD-1) in plasmacytoid dendritic cells (PDC), monocytes, and epithelial cells by influenza virus, Herpes simplex virus, and Sendai virus and its possible role in innate immunity. *J Leukoc Biol* **90**, 343-56.
- Sahly, H., Schubert, S., Harder, J., Rautenberg, P., Ullmann, U., Schroder, J., et al. (2003). Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1739-41.
- Sakuma, T., Barry, M. A. & Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* **443**, 603-18.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-18.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* **177**, 134-40.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Negre, D., Le Grand, R., et al. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**, 823-32.
- Schirmer, S., Ritter, R. G. & Fansa, H. (2013). Vascular surgery, microsurgery and supramicrosurgery for treatment of chronic diabetic foot ulcers to prevent amputations. *PLoS One* **8**, e74704.
- Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J. W. & Lehrer, R. I. (1985). Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* **76**, 1436-9.
- Singh, P. K., Jia, H. P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B. A. D., et al. (1998). Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14961-6.
- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F. C., et al. (1997). Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1738-42.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., et al. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502.
- Tarbell, K. V., Yamazaki, S. & Steinman, R. M. (2006). The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity. *Semin Immunol* **18**, 93-102.
- Tunzi, C. R., Harper, P. A., Bar-Oz, B., Valore, E. V., Semple, J. L., Watson-MacDonell, J., et al. (2000). Beta-defensin expression in human mammary gland epithelia. *Pediatr Res* **48**, 30-5.
- Underwood, M. A. & Bevins, C. L. (2010). Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics* **125**, 1237-47.
- Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B. & Ganz, T. (1998). Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* **101**, 1633-42.
- Wang, X. T., Liu, P. Y. & Tang, J. B. (2006). PDGF gene therapy enhances expression of VEGF and bFGF genes and activates the NF-kappaB gene in signal pathways in ischemic flaps. *Plast Reconstr Surg* **117**, 129-37; discussion 138-9.
- Wong, C. M., McFall, E. R., Burns, J. K. & Parks, R. J. (2013). The role of chromatin in adenoviral vector function. *Viruses* **5**, 1500-15.

- Woo, S. H., Kim, K. C., Lee, G. J., Ha, S. H., Kim, K. H., Dhawan, V., *et al.* (2007). A retrospective analysis of 154 arterialized venous flaps for hand reconstruction: an 11-year experience. *Plast Reconstr Surg* **119**, 1823-38.
- Wright, G. D. (2013). Q&A: antibiotic resistance: what more do we know and what more can we do? *BMC Biol*, pp. 51, England.
- Wungcharoen, B., Pradidarcheep, W., Santidhananon, Y. & Chongchet, V. (2001). Pre-arterialisation of the arterialised venous flap: an experimental study in the rat. *Br J Plast Surg* **54**, 621-30.
- Yan, H., Zhang, F., Akdemir, O., Songcharoen, S., Jones, N. I., Angel, M., *et al.* (2011). Clinical applications of venous flaps in the reconstruction of hands and fingers. *Arch Orthop Trauma Surg* **131**, 65-74.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-95.
- Zasloff, M. (2007). Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2810-6.
- Zhang, L., Parente, J., Harris, S. M., Woods, D. E., Hancock, R. E. W. & Falla, T. J. (2005). Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2921-7.

Apêndices

Apêndice I – Composição das soluções utilizadas

Em todas as soluções que requereram acerto de pH, utilizou-se NaOH (Hidróxido de Sódio, r.g., Sigma-Aldrich®) como reagente básico e HCl (Ácido Clorídrico a 37%, p.a., Merck®) como reagente ácido, sendo, para tal, utilizado o potenciômetro Schott® CG842 pH-Meter.

As soluções que necessitaram de esterilização foram ou autoclavadas ou por filtração a vácuo (Millipore®).

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo

- 86% (v/v) *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Sigma-Aldrich®
- 10% (v/v) Soro bovino fetal (FBS), Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Piruvato de sódio 100mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) MEM aminoácidos não essenciais, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) L-Glutamina 200mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich®

Não necessita de esterilização. As soluções utilizadas na sua composição são estéreis.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) incompleto I

- 97% (v/v) *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Piruvato de sódio 100mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) MEM aminoácidos não essenciais, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) L-Glutamina 200mM, Sigma-Aldrich®

Não necessita de esterilização. As soluções utilizadas na sua composição são estéreis.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) incompleto II

- 87% (v/v) *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), Sigma-Aldrich®
- 10% (v/v) Soro bovino fetal (FBS), Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Piruvato de sódio 100mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) MEM aminoácidos não essenciais, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) L-Glutamina 200mM, Sigma-Aldrich®

Não necessita de esterilização. As soluções utilizadas na sua composição são estéreis.

Meio Luria-Bertani (LB), Líquido

- 1,0% (m/v) Peptona de Caseína obtida por digestão pancreática, Merck®
- 0,5% (m/v) Extracto de Levedura Autolítica, Biokar Diagnostics®
- 0,5% (m/v) Cloreto de Sódio, p.a., Merk®

Esterilizado por autoclave.

Meio Luria-Bertani (LB), Líquido suplementado com Ampicilina

- 1,0% (m/v) Peptona de Caseína obtida por digestão pancreática, Merck®
- 0,5% (m/v) Extracto de Levedura Autolítica, Biokar Diagnostics®
- 0,5% (m/v) Cloreto de Sódio, p.a., Merk®

Esterilizado por autoclave.

- 0,001% (v/v) Ampicilina, 100 mg/ml, Bioline®

Meio Luria-Bertani (LB), Sólido

- 1,0% (m/v) Peptona de Caseína obtida por digestão pancreática, Merck®
- 0,5% (m/v) Extracto de Levedura Autolítica, Biokar Diagnostics®
- 0,5% (m/v) Cloreto de Sódio, p.a., Merk®
- 1,5% (m/v) Agar-Agar, Fagron®

Esterilizado por autoclave.

Meio Luria-Bertani (LB), Sólido suplementado com Ampicilina

- 1,0% (m/v) Peptona de Caseína obtida por digestão pancreática, Merck®
- 0,5% (m/v) Extracto de Levedura Autolítica, Biokar Diagnostics®
- 0,5% (m/v) Cloreto de Sódio, p.a., Merk®
- 1,5% (m/v) Agar-Agar, Fagron®

Esterilizado por autoclave.

- 0,001% (v/v) Ampicilina, 100 mg/ml, Bioline®

Nota: A Ampicilina só pode ser adicionada quando o meio LB estiver a uma temperatura inferior a 56 °C, para não haver degradação do antibiótico.

Minimum Essencial Media (MEM) completo

- 87% (v/v) *Minimum Essencial Media* (MEM), Sigma-Aldrich®
- 10% (v/v) Soro bovino fetal (FBS), Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) MEM aminoácidos não essenciais, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) L-Glutamina 200mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich®

Não necessita de esterilização. As soluções utilizadas na sua composição são estéreis.

Roswell Park Memorial Institute - 1640 (RPMI-1640) completo

- 86% (v/v) *Roswell Park Memorial Institute* – 1640 (RPMI-1640), Sigma-Aldrich®
- 10% (v/v) Soro bovino fetal (FBS), Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Piruvato de sódio 100mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) MEM aminoácidos não essenciais, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) L-Glutamina 200mM, Sigma-Aldrich®
- 1% (v/v) Solução de penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich®

Não necessita de esterilização. As soluções utilizadas na sua composição são estéreis.

Solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9%

- 0,9% (m/v) de NaCl - Cloreto de Sódio, p.a., Merck®

Esterilizado por autoclave.

Solução de Fosfato de Sódio a 10mM, pH 7,4

- 10 mM de Fosfato de Sódio, Sigma-Aldrich®

Esterilizado por autoclave.

Solução de Fosfato de Sódio a 10mM, sólido pH 7,4

- 10 mM de Fosfato de Sódio, Sigma-Aldrich®
- 1% (m/v) de Agarose, molecular grade, Bioline®

Esterilizado por autoclave.

Tampão 'Beads'

- PBS 1x suplementado com:
 - 0,5% (m/v) de BSA – Albumina Bovina Sérica, Sigma-Aldrich®
 - 2 mM de EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, Merck®

Esterilizado por sistema de vácuo.

Tampão Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) a 0,5 M, pH=9,2

- 0,5 M de Na_2CO_3 – Carbonato de Sódio, Sigma-Aldrich®

Esterilizado por sistema de vácuo.

Tampão Fosfato de Sódio 10x (PBS 10x), 1L, pH=7,4

- 1,4 mM KH_2PO_4 - Dihidrogenofosfato de Potássio, p.a., Merck®
- 4,29 mM de Na_2HPO_4 - Fosfato de Sódio Dibásico Anidro, p.a., Sigma-Aldrich®
- 13,7 mM de NaCl - Cloreto de Sódio, p.a., Merck®
- 2,68 mM de KCl - Cloreto de Potássio, p.a., Merck®

Esterilizado por autoclave.

Tampão Tris-Borato-EDTA 10x (TBE 10x), 1L

- 1 M Tris base, Sigma-Aldrich®
- 1 M Ácido Bórico , Merck®
- 0,02 M EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, Merck®

Esterilizado por sistema de vácuo.

Apêndice II – DNA plasmídico portadores DNA complementar que codifica as proteínas hBD-2 e hBD-3

A sequência dos DNA complementar que codificam as proteínas β -defensina humana 2 (hBD-2) e 3 (hBD-3) foi desenhado pelo Doutor José Ramalho (Figura I). Esta sequência foi encomendada num plasmídeo, sendo que continha as sequências de restrição de modo a poder-se clonar os genes das HBD em pDNA lentivirais. Como tal, os genes foram transferidos para o pcDNA ENTR BP #1848c25, separadamente, e posteriormente foram transferidos para pLenti6, por recombinação BP-LR, pelo sistema Gateway Cloning vectors (Life Technologies).

As sequências de DNA complementar utilizadas para a clonagem dos genes responsáveis pela informação que codifica as proteínas hBD-2 e hBD-3 foi obtida através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a *database* Gene.

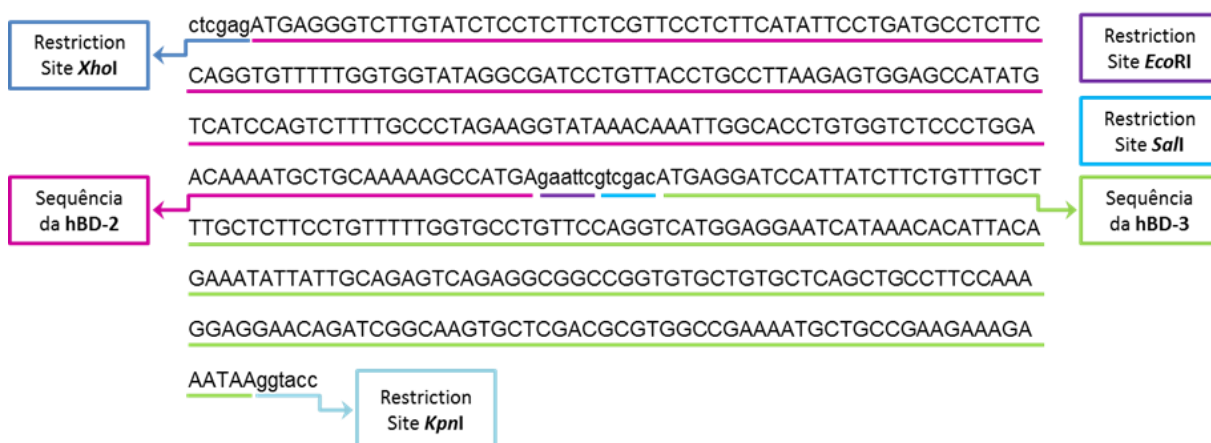


Figura I – Sequência de nucleótidos contendo os DNA complementares com as hBD-2 e hBD-3 e as enzimas de restrição

Apêndice III – Curvas de crescimento bacteriano da *Escherichia coli* ATCC 8739

Curvas de crescimento da *Escherichia coli* ATCC 8739 ao longo de 48 h (Tabelas I), na Figuras I apenas se encontra o crescimento ao longo de 12 h.

Tabela I – Absorvâncias a DO600 ao longo da curva de crescimento da *Escherichia coli* ATCC 8739

Tempo (h)	DO ₆₀₀	
0	0,057	0,057
1	0,214	0,196
2	0,714	0,718
4	1,760	1,737
6	2,380	2,367
8	3,037	3,010
10	3,270	3,270
12	3,630	3,763
24	3,760	4,200
48	3,307	3,908

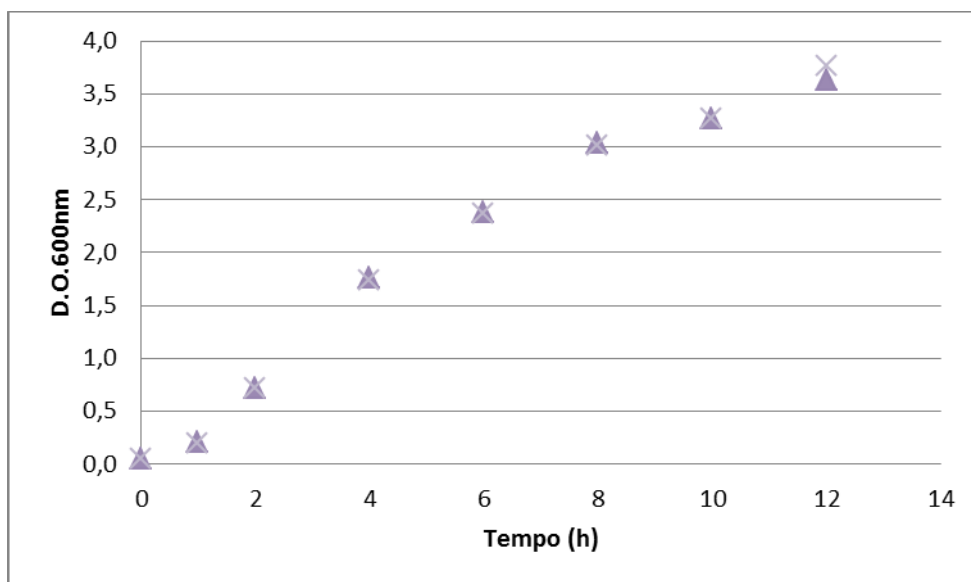


Figura I – Curva de crescimento da *Escherichia coli* ATCC 8739 (ensaio em duplicado)

Apêndice IV – Curvas de crescimento bacteriano do *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA)

Curvas de crescimento do *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA) ao longo de 48 h (Tabelas II), na Figuras II apenas se encontra o crescimento ao longo de 12 h.

Tabela I – Absorvâncias a DO₆₀₀ ao longo da curva de crescimento da *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA)

Tempo (h)	DO ₆₀₀	
0	0,204	0,204
1	0,696	0,729
2	1,8	1,81
4	3,06	2,8
6	3,93	3,782
8	5,095	4,425
10	5,64	5,55
12	6,77	6,98
24	8,143	9,493
48	8,113	7,93

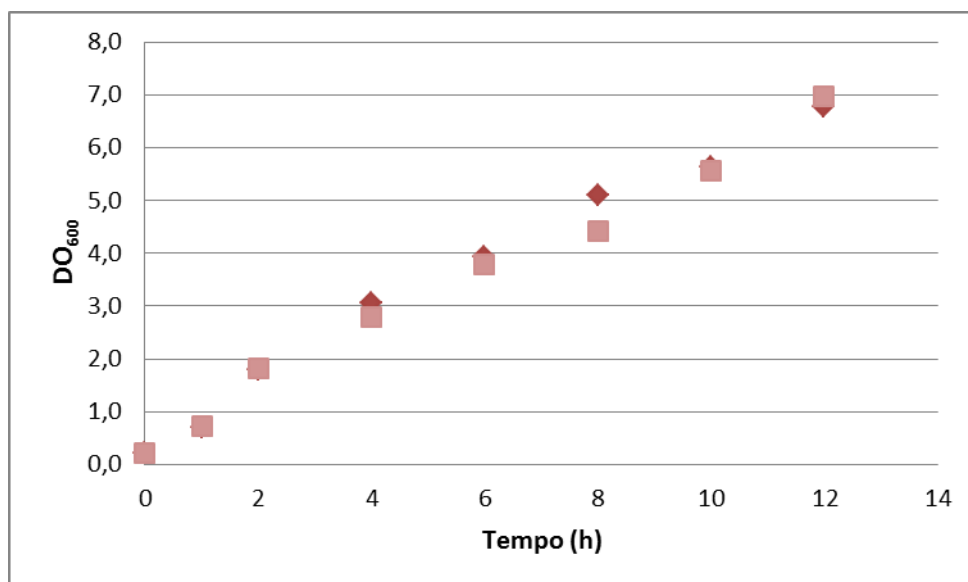


Figura I – Curva de crescimento da *Staphylococcus aureus* (CIP 106760) (MRSA) (ensaio em duplicado)

Apêndice V – Sensibilidade antimicrobiana

Os ensaios de sensibilidade antimicrobianos a fármacos foram efectuados pelo Professor Doutor Paulo Paixão, grupo de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Nova de Lisboa.

Escherichia coli ATCC 8739:

Sensível: amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, ampicilina, ciprofloxacina, levofloxacina, nitrofurantoína, trimetoprim/sulfametoxazol

Intermédio: ampicilina

Resistente: cefalotina, cefuroxima

Staphylococcus aureus (CIP 106760) (MRSA):

Sensível: benzilpenicilina, oxacilina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, mupirocina, ácido fusídico, fosfomicina, tetraciclina, tigeciclina, ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, nitrofurantoína, trimetoprim/sulfametoxazol, vancomicina, linezolida, daptomicina

Anexos

Anexo I – Informação sobre a hBD-2

A sequência de cDNA utilizada para a clonagem do gene responsável que codifica a proteína β -defensina humana 2 (hBD-2) foi obtida através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a *database* Gene.

Quadro I – Algumas características e nomenclatura da hBD-2

		Base de dados
Nome Aprovado do Gene	Defensina, beta 4A	HGNC
Nome (s) Alternativo (s) do Gene	Defensina, beta 2	HGNC
	Defensina, beta 4	HGNC
Símbolo Aprovado do Gene	DEFB4A	HGNC, NCBI, UniProt
Símbolo (s) Alternativo (s) do Gene	<i>BD-2</i>	NCBI
	<i>DEFB102</i>	NCBI, UniProt
	<i>DEFB2</i>	NCBI, UniProt
	<i>DEFB-2</i>	HGNC, NCBI
	<i>DEFB4</i>	NCBI, UniProt
	<i>HBD-2</i>	HGNC, NCBI
	<i>SAP1</i>	HGNC, NCBI
Referência da Sequência do mRNA	NM_004942.3	NCBI
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	NCBI
Localização do Gene nos cromossomas	8p23.1	NCBI
Nome da Proteína Recomendado	Beta-defensina 4A	NCBI
Símbolo da Proteína	BD-2	UniProt
	hBD-2	UniProt
	SAP1	UniProt
Outro (s) Nome (s) da Proteína	Defensina, Beta 2	NCBI, UniProt
	Defensina, Beta 4	NCBI, UniProt
	Skin-antimicrobial peptide 1	NCBI, UniProt
Referência da Sequência da proteína	NP_004933.1	NCBI

HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>); NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); UniProt - Universal Protein Resource (<http://www.uniprot.org/>)

Sequência de aminoácidos hBD-2 (NCBI)

MRVLYLLFSF LFIFLMPLPG VFGGIGDPVT CLKSGAICHP VFCPRRYKQI GTCGLPGTKC
 CKKP

Anexo II – Informação sobre a hBD-3

A sequência de cDNA utilizada para a clonagem do gene responsável que codifica a proteína β -defensina humana 3 (hBD-3) foi obtida através do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a *database* Gene.

Quadro 2 - Algumas características e nomenclatura da hBD-3

		Base de dados
Nome Aprovado do Gene	<i>Defensina, beta 103A</i>	HGNC
Nome (s) Alternativo (s) do Gene	<i>Defensina, beta 3</i>	HGNC
Símbolo Aprovado do Gene	<i>DEFB103A</i>	HGNC, NCBI, UniProt
Símbolo (s) Alternativo (s) do Gene	BD-3 BD3 DEFB103 DEFB3 DEFB-3 DEFB3 hBD-3 HBD3 HBD-3 HBP3 HBP-3	NCBI UniProt HGNC, NCBI, UniProt NCBI, UniProt HGNC, NCBI NCBI, UniProt NCBI HGNC, NCBI HGNC, NCBI HGNC, NCBI HGNC, NCBI
Referência da Sequência do mRNA	NM_001081551.3	NCBI
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	NCBI
Localização do Gene nos cromossomas	8p23.1	NCBI
Nome da Proteína Recomendado	Beta-defensina 103A	NCBI
Símbolo da Proteína	BD-3 DEFB-3 hBD-3 HBD3	UniProt UniProt UniProt UniProt
Outro (s) Nome (s) da Proteína	Defensina, Beta 3 Defensina, Beta 103	UniProt UniProt
Referência da Sequência da proteína	NP_001075020.1	NCBI

HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>); NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); UniProt - Universal Protein Resource (<http://www.uniprot.org/>)

Sequência aminoácidos hBD-3 NCBI

MRIHYLLFAL LFLFLVPVPG HGGIINTLQK YYCRVRGGRC AVLSCLPKEE QIGKCSTRGR
KCCRKK

Anexo III – DNA plasmídico pMD2.G

Plasmídeo 12259: pMD2.G (Addgene)

Nome do gene inserido: VSV G

Vector backbone: pMD2.G

Tipo de vector: Expressão em mamíferos

Tipo de vector (outro): Envelope

Tamanho (bp): 5824

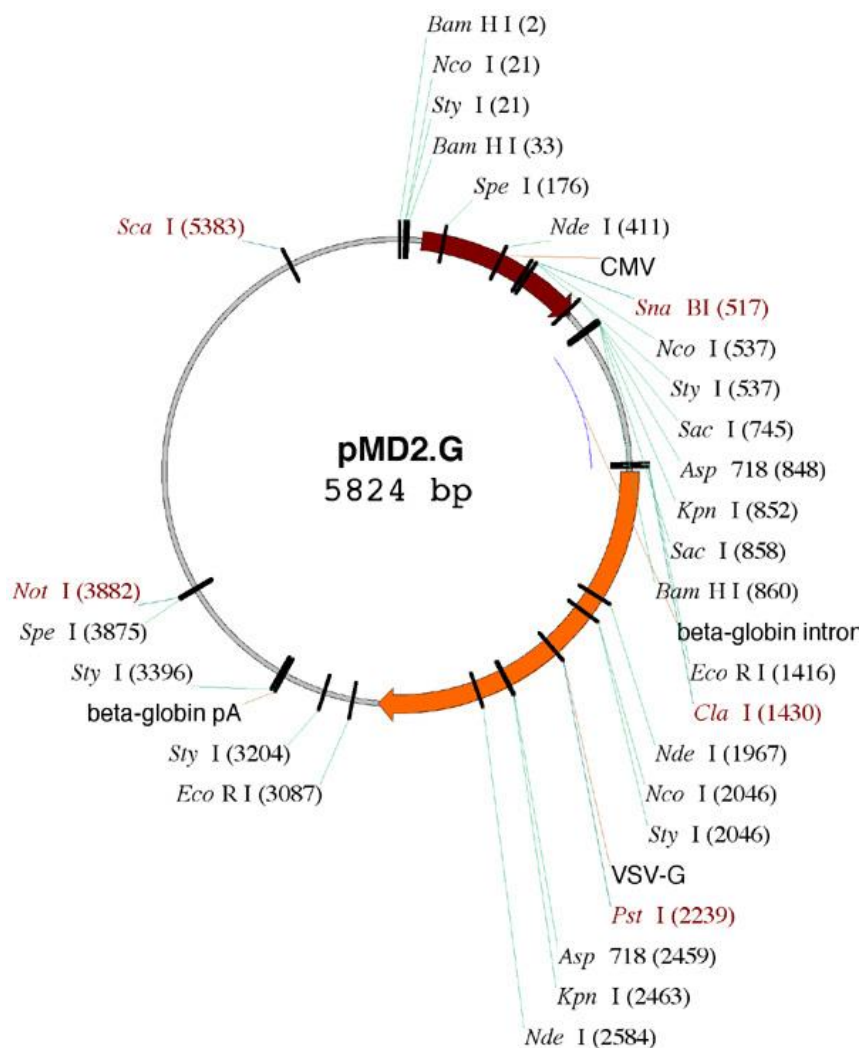
Resistência bacteriana: Ampicilina

Estirpe para crescimento: DH5alpha

Temperatura de crescimento (°C): 37

Número de cópias alta ou baixa: Alta

Mapa:



Anexo IV – DNA plasmídico psPAX2

Plasmídeo 12260: psPAX2 (Addgene)

Nome do gene inserido: nenhum

Vector backbone: psPAX2

Tipo de vector: Expressão em mamíferos, lentiviral

Tipo de vector (outro): Empacotamento

Tamanho (bp): 10703

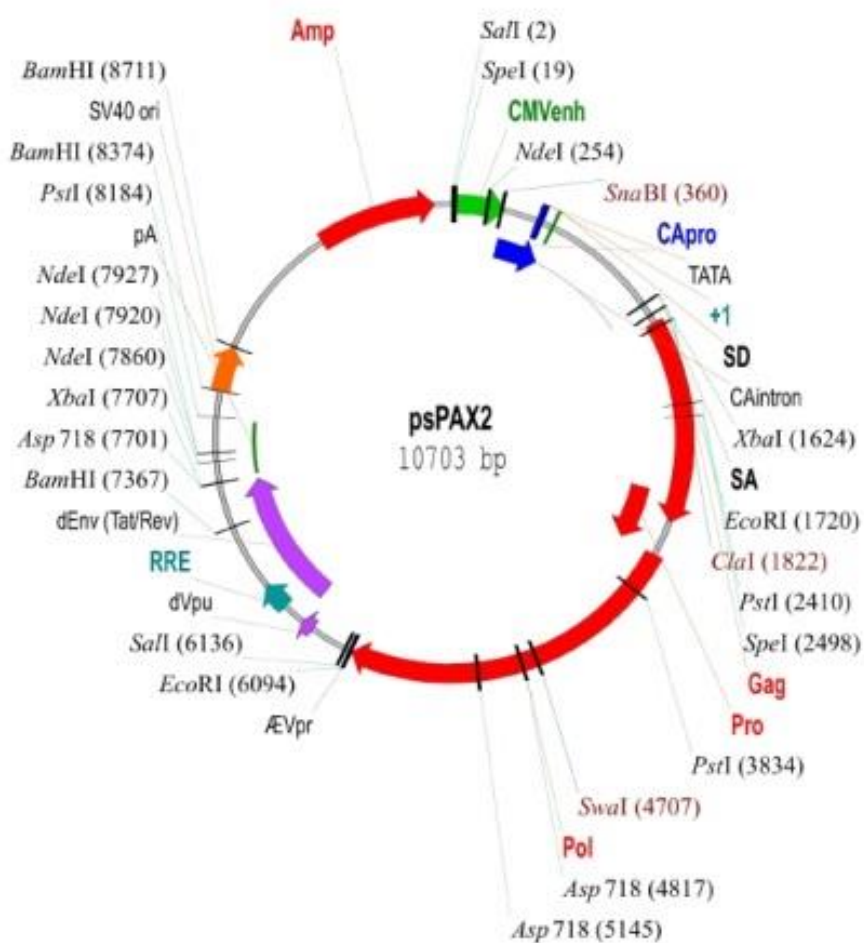
Resistência bacteriana: Ampicilina

Estirpe para crescimento: DH5alpha

Temperatura de crescimento (°C): 37

Número de cópias alta ou baixa: Alta

Mapa:



Anexo V – DNA plasmídico pMDLg/pRRE

Plasmídeo 12251: pMDLg/pRRE (Addgene)

Nome do gene inserido: HIV-1 GAG/POL

Vector *backbone*: pMD

Tipo de vector: Expressão em mamíferos, lentiviral

Tipo de vector (outro): Empacotamento

Tamanho (bp): 8895

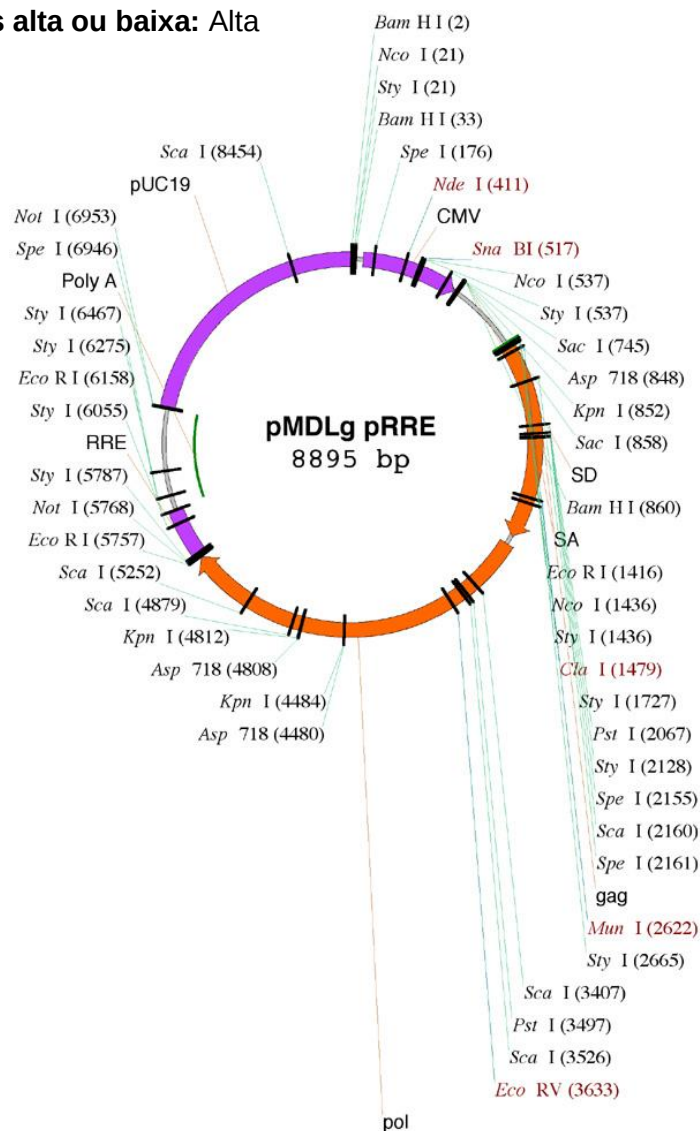
Resistência bacteriana: Ampicilina

Estirpe para crescimento: DH5alpha

Temperatura de crescimento (°C): 37

Número de cópias alta ou baixa: Alta

Mapa:



Anexo VI – DNA plasmídico pRSV-Rev

Plasmídeo 12253: pRSV-Rev (Addgene)

Nome do gene inserido: Rev

Vector *backbone*: pRSV-Rev

Tipo de vector: Expressão em mamíferos, lentiviral

Tipo de vector (outro): Empacotamento

Tamanho (bp): 4174

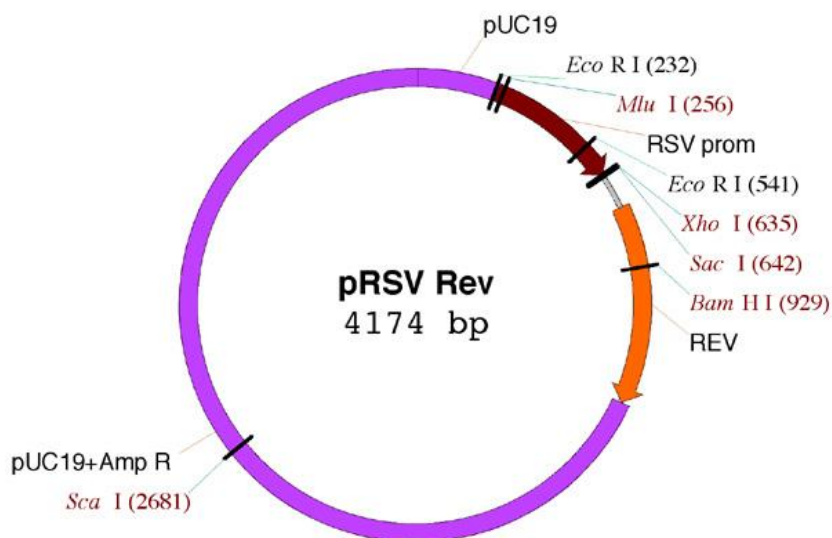
Resistência bacteriana: Ampicilina

Estirpe para crescimento: DH5alpha

Temperatura de crescimento (°C): 37

Número de cópias alta ou baixa: Alta

Mapa:



Anexo VII – DNA plasmídico pLL3.7

Plasmídeo 11795: pLL3.7G (Addgene)

Nome do gene inserido: Nenhum

Vector backbone: pLL3.7

Tipo de vector: Expressão em mamíferos, lentiviral, RNAi, Cre/Lox

Tamanho (bp): 7650

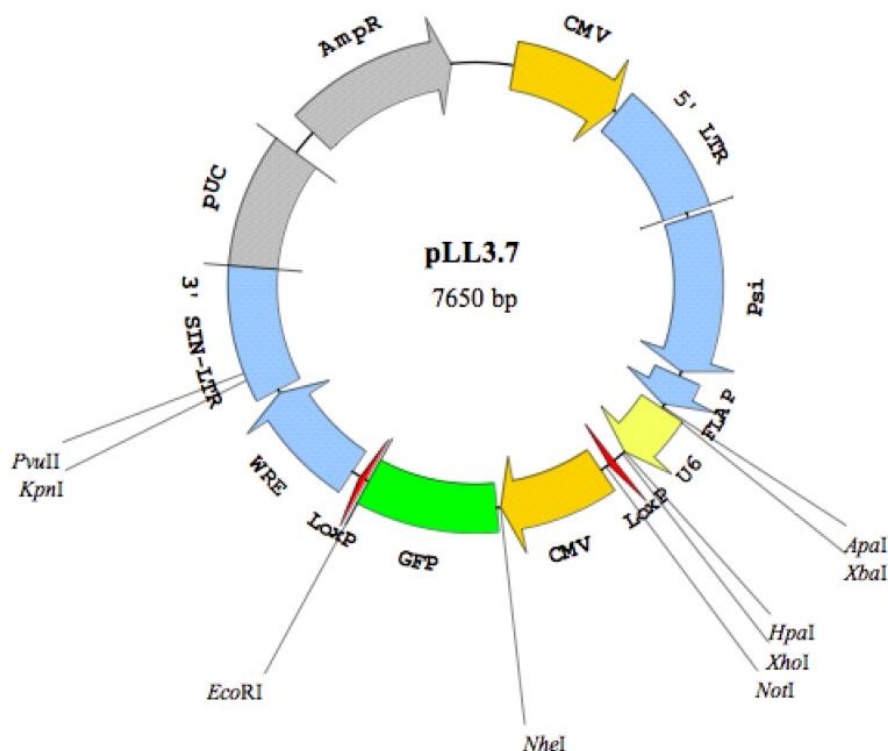
Resistência bacteriana: Ampicilina

Estirpe para crescimento: DH5alpha

Temperatura de crescimento (°C): 30 (Embora este DNA plasmídeo cresça em bactérias normais, para reduzir a possibilidade de recombinação recomenda-se que seja crescido a 30 ° em células Stbl3)

Número de cópias alta ou baixa: Alta

Mapa:



Anexo VIII – DNA plasmídico pLKO.1_TRC005

Plasmídeo: PLKO.1_TRC005

Nome do gene inserido: DsRed

Tipo de vector: Expressão em mamíferos, lentiviral

Tamanho (bp): 9335

Resistência bacteriana: Ampicilina

Estirpe para crescimento: DH5alpha

Temperatura de crescimento (°C): 37

Número de cópias alta ou baixa: Alta

Mapa:

