

R23 - CONSTRUÇÃO DE UM VETOR PARA RECOMBINAÇÃO DE INTEGRASES DO HIV-1

Bianca Duarte¹, Michelli de Oliveira¹, Bernard Piñeiro¹, Amilcar Tanuri¹

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro/Laboratório de Virologia Molecular Aplicada

Objetivo: Este trabalho visou desenvolver uma ferramenta molecular para a produção de HIV-1 recombinantes de Integrase através da construção de um vetor plasmidial contendo o genoma completo do vírus, para recombinação com Integrases (INs) geneticamente diversas de vírus circulantes na população. O vetor recombinante gerado permite o desenvolvimento de ensaio fenotípico clínico de Integrases de pacientes para análise de vírus susceptíveis/resistentes aos Inibidores de Integrase, como o atualmente utilizado para terapia de resgate – Raltegravir (FDA, 2007), uma vez que a análise fenotípica do padrão de resistência clínica frente à diversidade genética das Integrases (INs) demonstra possuir impacto clínico no tratamento de pacientes em falha terapêutica aos medicamentos de primeira linha.

Métodos: O vetor pNL4-3Luc foi utilizado por possuir o genoma completo do HIV-1 e conter o gene repórter de luciferase no lugar do gene nef. Foi realizada a deleção do gene de Integrase, gerando o vetor recombinação de Integrases, pNL4-3LucΔInt. Para estudar a capacidade de produção de vírus integrase recombinantes, realizou-se dois ensaios de transfecção em células 293-T. No primeiro ensaio utilizou-se o vetor pNL4-3LucΔInt linear e co-transfectou-se com amplicons do gene de integrase subtipo B ou C. No segundo ensaio de transfecção foi realizada recombinação homóloga *in vitro* (GIBSON, 2009) e estes vetores integrase específicos foram transfectados. Além disso, foi realizada a extração de RNA de vírus subtipos B, C e F susceptíveis e resistentes aos inibidores de Integrase em cultura para realização de RT-PCR. Os amplicons de Integrases gerados foram recombinados com o vetor pNL4-3LucΔInt linear por recombinação homóloga *in vitro*.

Resultados: Os vírus integrase recombinantes gerados, puderam ser avaliados quanto à eficiência de infecção após leitura de luminescência pós infecção em células MT-4 susceptíveis. Apenas o segundo ensaio foi capaz de produzir vírus recombinantes de

Integrases infecciosos, gerando o equivalente à 10^6 Sinais de Luz para os vírus recombinantes com Integrase do subtipo C e 10^5 Sinais de Luz para os do subtipo B. Diante da eficiente infecção pelos vírus recombinantes do segundo ensaio, foram realizadas reações de recombinação homóloga *in vitro* utilizando amplicons de Integrase de vírus susceptíveis e resistentes aos INIs subtipos B, C e F produzidos em cultura. Como resultado, obteve-se uma eficiência de produção de vetores corretamente recombinados de mínimo 15% e máximo de 85% com o uso da técnica.

Conclusões:

Diante do exposto, a observação da alta emissão de luz de células infectadas por vírus integrase recombinantes com gene repórter luciferase pode ser um método eficiente para avaliar a susceptibilidade destes vírus em presença de inibidores. Portanto, a recombinação homóloga *in vitro* demonstrou-se eficiente para a produção de vetores Integrase recombinantes com o objetivo de serem utilizados para produção viral em testes fenotípicos frente aos INIs.