

pExu:LALU: NOVO VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA ENTREGUE POR BACTÉRIAS COM PERFIL PROBIÓTICO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIAS GÊNICAS E VACINAS DE DNA

SANTOS, V. C. R.¹, AMÉRICO, F. M.^{1,3}, QUARESMA, S. L.¹, FREITAS, S. A.¹, SANTOS, C. S. J.², MAGALHÃES, D. M. L.¹, DE JESUS, L. C. L.^{1,3} e AZEVEDO, V.¹

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

²Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³Université Paris Saclay, INRAE, AgroParisTech, MICALIS, Jouy-en-Josas, France.

E-mail: rhayaneviegas@gmail.com

A produção de proteínas recombinantes representa um avanço na biotecnologia, com implicações para o desenvolvimento de vacinas e terapias gênicas. Entretanto, ainda existem desafios relacionados à eficiência da expressão de vacinas de DNA, bem como questões de biossegurança, o que limita a aprovação de vetores plasmidiais de expressão por agências regulatórias. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo vetor plasmidial de expressão eucariótica chamado pExu-LALU e avaliar sua entrega às células eucarióticas por diferentes linhagens bacterianas. Este novo vetor foi projetado a partir de dois vetores anteriores, o pExu e o pIDV-II, e incorporou elementos que otimizam a expressão e segurança do vetor, incluindo o promotor híbrido CAG (β -actina de galinha/ β -globina de coelho), o elemento de regulação pós-transcricional WPRE, o sinal de poliadenilação bGH poly(A) e um marcador de seleção (canamicina) aprovado pelo FDA. Além disso, o pExu-LALU apresenta múltiplas origens de replicação, ORI, repD e repE, possibilitando sua replicação em *Escherichia coli* e bactérias lácticas como *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus delbrueckii*, o que viabiliza sua entrega às células eucarióticas por bactérias com potencial probiótico que podem atuar como adjuvantes na indução da resposta imune. A funcionalidade do pExu-LALU foi avaliada *in vitro* por microscopia de fluorescência confocal e citometria de fluxo, utilizando os genes repórteres *egfp* e *mcherry*. Além disso, a eficiência de expressão do novo vetor foi comparada com o vetor de geração anterior (pExu). O pExu-LALU foi capaz de promover a expressão *in vitro* de eGFP e mCherry em células CHO, sendo que a expressão da proteína mCherry por pExu-LALU apresentou uma intensidade de fluorescência 122% superior ao pExu. Para avaliação *in vivo*, linhagens bacterianas contendo o pExu-LALU foram construídas, e serão utilizadas para investigar a expressão ao longo do trato gastrointestinal e a eficiência da entrega do vetor pelas diferentes espécies.

Apoio financeiro: CAPES, FAPEMIG.

Palavras-chave: Proteína recombinante; imunologia de mucosa; bactérias do ácido lático;