

269

ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE PLASMÍDIOS LIPOFECTADOS EM CÉLULAS HUMANAS. *Lindolfo da Silva Meirelles, José Artur Bogo Chies, Nance Beyer Nardi* (Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS).

Pouco se sabe sobre o mecanismo de entrada na célula e posterior localização intracelular de construtos genéticos utilizados em vacinas de DNA. Este trabalho visa a analisar a localização intracelular de um plasmídeo quando este é introduzido em uma célula, investigando a hipótese de localização na mitocôndria. Para isso, a linhagem celular imortal CCRF-CEM foi mantida em cultura e transfectada com o plasmídeo pEGFP-N1, que codifica a proteína EGFP e confere resistência ao antibiótico neomicina, utilizando-se para isso um lipídio catiônico. As células transfectadas estão sendo selecionadas adicionando-se antibiótico ao meio de cultura. As mesmas serão ainda coletadas e rompidas com ultra-som, para que se possam isolar por centrifugação as frações nuclear e mitocondrial. De posse destas, os DNAs nuclear e mitocondrial serão extraídos e a presença ou ausência do plasmídeo nas duas frações será verificada por meio de PCR, usando-se primers para uma seqüência de DNA do plasmídeo (teste), uma seqüência de DNA nuclear e uma seqüência de DNA mitocondrial (controles). Os resultados nos possibilitarão verificar se o plasmídeo transfectado está localizado no núcleo, na mitocôndria, ou mesmo em ambos. Até o momento já foi estabelecida uma metodologia para o isolamento das frações celulares nuclear e mitocondrial, bem como para o isolamento de DNA dessas frações. A técnica de PCR já foi estabelecida para a amplificação das seqüências de DNA controle, e nesta ocasião verificou-se que a linhagem celular utilizada não possui ao menos uma porção do gene codificante do fator de coagulação V. A ocorrência da transfecção e a eficácia do processo de seleção das células transfectadas foram comprovadas por análise da fluorescência celular, decorrente da expressão de EGFP, em microscópio de fluorescência e em citômetro de fluxo. (CNPq-PIBIC/UFRGS, FINEP).