

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**UTILIZAÇÃO DE LIPÍDIO CATIÔNICO PARA
NEUTRALIZAÇÃO DA CARGA DE DNA E APLICAÇÃO DO
COMPLEXO NA IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS**

**AUTOR: ELIANA FRANCO LOPES
ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA PAULA RAVAZZOLO**

**PORTO ALEGRE
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

UTILIZAÇÃO DE LIPÍDIO CATIÔNICO PARA NEUTRALIZAÇÃO DA
CARGA DE DNA E APLICAÇÃO DO COMPLEXO NA IMUNIZAÇÃO DE
CAMUNDONGOS

Autor: ELIANA FRANCO LOPES

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias na
área de Microbiologia Veterinária,
especialidade Imunologia.

Orientadora: Profª. Dra. ANA PAULA
RAVAZZOLO

PORTO ALEGRE
2008

Este trabalho foi realizado no:

- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária, UFRGS.
- Laboratório de Virologia Clínica Veterinária do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária, UFRGS.
- Biotério do Centro de Biotecnologia do Rio Grande do Sul, UFRGS.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profª. Dra. Ana Paula Ravazzolo, pela orientação, pelo companheirismo, e por ser um exemplo de dedicação e determinação.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da FAVET/UFRGS, pela inestimável ajuda nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Laerte Ferreira e a Edna Maria Sanches pelo incentivo e amizade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Virologia da FAVET / UFRGS, pela hora da “chacinha” na cozinha e pela ajuda técnica na execução dos experimentos e, em especial, ao Prof. Dr. Cláudio W. Canal por ter aberto as portas do Laboratório para que eu pudesse desenvolver parte do meu trabalho.

À Prof. Dra. Sandra Estrazulas Farias do Laboratório de Imunologia do Centro de Biotecnologia / UFRGS pela doação das células e dos camundongos, de importância total para a execução dos experimentos.

A Hans-Rudolf Vogt e Giuseppe Bertoni do Instituto de Virologia Veterinária, Universidade de Berna, Suíça, pela realização dos ensaios de ELISA.

À minha mãe por ter me mostrado a importância do estudo e à minha irmã por acreditar mais em mim, do que eu mesma.

Aos amigos Fernanda Araújo de Britto Velho, Ubirajara Maciel da Costa e Fabiana Forell por sempre estarem dispostos a tirar dúvidas.

E em especial ao meu marido Alexandre Tavares Duarte de Oliveira, por todo amor, apoio e também pelas discussões referente ao meu trabalho. À minha linda filha Rafaela, por ter iluminado meus dias e que anseia pelo final desta etapa para poder mamar tranquila.

E a DEUS, um Cara que, apesar de toda minha dúvida em sua existência, nunca desistiu de mim.

RESUMO

Embora a imunização gênica apresente vantagens sobre as vacinas convencionais, nem sempre a produção de anticorpos e a conseqüente proteção conferida pelo sistema imune contra o antígeno de interesse são satisfatórias. As causas da baixa eficácia da imunização gênica, nestes casos, ainda são pouco conhecidas, porém um dos pontos mais relevantes em todo o processo é a eficiência da transfecção do DNA. O sucesso desta metodologia depende do estabelecimento de um sistema de entrega de gene eficiente e seguro. De acordo com a teoria proposta de Kuhn *et al.* (1999), baixas concentrações de moléculas anfífilas podem ser usadas para neutralizar a carga do DNA, sem a formação de lipossomos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso do lipídio catiônico dimetildioctadecil brometo de amônio (DDAB) como neutralizador da carga do DNA para a imunização de camundongos. Para a realização dos experimentos, um plasmídeo expressando a proteína do capsídeo (CA) do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), sob o comando do promotor citomegalovírus humano (CMV), foi utilizado nas imunizações. Os camundongos foram divididos em cinco grupos e receberam, via subcutânea, três inoculações de 10 µg de DNA linear (grupo 1), DNA linear mínimo (grupo 2), DNA circular (grupo 3) associados a 2,7 µg de DDAB ou DNA circular nu (grupo 4). O grupo controle foi inoculado com 2,7 µg de DDAB em solução fisiológica. Os camundongos imunizados com o plasmídeo na forma linear associado ao DDAB apresentaram maiores títulos de anticorpos CA que os inoculados com a forma circular ou linear mínima. Os dados sugerem que o lipídio catiônico DDAB tem potencial de uso como veículo de transfecção gênica em animais.

Palavras-chave: transfecção, imunização gênica, DNA linear mínimo, DDAB

ABSTRACT

Genetic immunization has several advantages over conventional vaccines. However, antibody production and protection against the antigen of interest are often not satisfactory. In these cases, the causes of the low effectiveness of the genetic immunization are still poorly understood. One of the most relevant points in the immunization process is the DNA delivery. A successful DNA vaccine depends on the establishment of an efficient and safe gene delivery system. In accordance with Kuhn et al. (1999), low concentrations of amphiphilic molecules can be used to neutralize the DNA charge without the formation of liposomes. The aim of this study was to examine the effect of cationic lipid dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB) as a charge neutralizer for DNA for the immunization in mice. A plasmid expressing the capsid protein (CA) of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) under the control of the human cytomegalovirus immediate early promoter (hCMVie1) was used in the immunization. Mice were grouped and immunized with three injections of either 10 µg of linear DNA (group 1), minimal linear DNA (group 2) or circular DNA (group 3) associated with 2,7 µg of DDAB or naked circular DNA (group 4). The control group received 2,7 µg of DDAB diluted in physiologic solution. Mice immunized with DNA in linear form associated with DDAB developed higher titers of antibodies against CA than the animals immunized with the circular or minimal linear form. The data suggest that lipidic cationic DDAB could be a useful delivery system for genetic immunization.

Key words: transfection, genetic immunization, minimal linear DNA, DDAB

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGID	ágar-gel imunodifusão
AFM	microscopia de força atômica
APC	células apresentadoras de antígeno
APS	persulfato de amônio
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
β-gal	β-galactosidase
CA	proteína do capsídeo
CAEV	vírus da artrite encefalite caprina
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV	citomegalovírus humano
COS-1	células provenientes de rim de macaco verde africano
CpG	seqüência de nucleotídeos C e G
CTL	linfócito T citotóxico
DDAB	dimetildioctadecil brometo de amônio
D-MEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo-5' trifosfatado
DOPE	<i>dioleoylphosphatidylethanolamine</i>
DOSPA	<i>2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium</i>
DOTAP	<i>1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane</i>
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>env</i>	gene codificante das proteínas do envelope viral
FAVET	Faculdade de Veterinária
FeLV	vírus da leucemia felina
FIV	vírus da imunodeficiência felina
g	unidade de força centrífuga relativa

<i>gag</i>	gene codificante das proteínas do antígeno grupo específico
Gag	proteína precursora das proteínas do capsídeo
gp	glicoproteína
GM-CSF	fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos
BHV	herpes virus bovino
hCMVie1	human cytomegalovirus immediate early
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFA	imunofluorescência indireta
IFN	interferon
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
IM	intramuscular
LB	Luria-Bertani
LCMV	vírus da coriomeningite linfocítica
LTR	seqüências longas repetidas (<i>long terminal repeat</i>)
M	molar
mA	miliampéres
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MLV	Vírus da Leucemia Murina
μ CE-LIF	fluorescência induzida por laser
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MVV	vírus Maedi-Visna
ng	nanogramas
°C	graus Celsius
pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PCR	reação em cadeia da polimerase

PEI	polietilenoamina
pH	potencial de hidrogênio
PLL	poly-L-lisina
<i>pol</i>	gene codificante das enzimas virais
RNA	ácido ribonucléico
RSV	vírus Sarcoma Rous
SC	subcutâneo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SV40	vírus símio 40
TE	Tris-EDTA
Th	células T <i>helper</i>
TNF	fator de necrose tumoral
tRNA	RNA transportador
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	unidades internacionais
V	volts
X-gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>
μ g	microgramas
μ L	microlitros

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 2,6µL de Lipofectamine e 350 ng de pCH110 circular.....	32
FIGURA 2 - Representação esquemática da estrutura dos plasmídeos utilizados nos experimentos.....	40
FIGURA 3 - Representação esquemática mostrando em (a) a região complementar dos primers senso e anti-senso utilizados para a construção do DNA linear mínimo obtido por PCR e em (b) o produto de amplificação contendo somente o promotor CMV, o gene gag CAEV e a cauda de Poli-A.....	45
FIGURA 4 - Células COS-1 transfectadas com o plasmídeo pCH110 (A).....	52
FIGURA 5- Análise de <i>Western blot</i> de pellet obtido a partir de células transfectadas com o plasmídeo pC22-1(linha 1), com o pC28-3 (linha 2) e de células não transfectadas (linha 3). Como controle positivo (linha 4) foi utilizado o antígeno p28.....	53
FIGURA 6 - Imagem de um gel de eletroforese mostrando a digestão com a endonuclease de restrição <i>ScaI</i>	54
FIGURA 7 - Imagem do gel de eletroforese mostrando a construção linear mínima obtida por PCR.	55
FIGURA 8- Nível de anticorpos Gag-CAEV 5 semanas após a última inoculação nos diferentes grupos.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Diferentes tratamentos realizados para a etapa de transfecção <i>in vitro</i>	46
TABELA 2 - Grupos de camundongos imunizados com as diferentes formas de DNA, via subcutânea.....	50
TABELA 3 - Animais com anticorpos positivos contra Gag/CA através da técnica de <i>Dot blot</i>	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Transferência Gênica	17
2.1.1	Terapia Gênica	17
2.1.2	Imunização Gênica.....	18
2.2	Vacinas de DNA	19
2.2.1	Plasmídeo	20
2.2.1.1	Promotor	20
2.2.1.2	Gene	21
2.2.1.3	Seqüências Estruturais do Plasmídeo	22
2.2.2	Sistemas de Entrega	26
2.2.2.1	Vetores Virais	26
2.2.2.2	Vetores não Virais	27
2.2.2.2.1	Mecânicos	27
2.2.2.2.2	Elétricos	28
2.2.2.2.3	Químicos	29
2.2.3	Mecanismos Celulares de Interação com o DNA	32
2.2.4	Resposta Imune.....	34
2.3	Genoma do CAEV e MVV	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Cultivo Celular	39
3.2	Animais	39
3.3	DDAB	39
3.4	DNA Viral	40
3.4.1	Plasmídeo Circular	41
3.4.1.1	Obtenção das <i>E. coli</i> XL-1 Competentes.....	41
3.4.1.2	Transformação das XL-1	41
3.4.1.3	Minipreparação Plasmideal	42
3.4.1.4	Midipreparação e Purificação do DNA Plasmideal.....	43
3.4.2	Plasmídeo Linear	43
3.4.3	DNA Linear Mínimo	44

3.5	Transfecção das Células com Lipofectamine®	45
3.5.1	Coloração com X-Gal	47
3.5.2	Detecção de Antígeno-Específico	47
3.6.2.1	Extrato Protéico	47
3.6.2.2	<i>Dot Blot</i> para Detecção da Proteína Viral Gag	48
3.6.2.3	<i>Western Blot</i>	48
3.7	Inoculação em Camundongos	49
3.7.1	Protocolo de Imunizações	49
3.7.2	Detecção de Anticorpos para <i>Gag-CAEV</i>	50
3.7.2.1	Obtenção do Soro.....	50
3.7.2.2	<i>Dot Blot</i> para Detecção de Anticorpos contra a Proteína Viral	51
3.7.2.3	ELISA	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Atividade dos Plasmídeos Codificando para a Proteína <i>Gag/CA</i>	52
4.1.1	Detecção de Antígeno-Específico	53
4.2	Obtenção do DNA Viral	54
4.4	Resposta Imune à Proteína <i>Gag/CA CAEV</i>	55
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	62
7	PERSPECTIVAS	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO 1	71
	ANEXO 2.....	72
	ANEXO 3.....	74
	ANEXO 4.....	75
	ANEXO 5.....	76

1 INTRODUÇÃO

A introdução de seqüências de DNA em células-alvo tem sido empregada como uma nova estratégia para o tratamento de doenças ou para a imunização contra antígenos de interesse. O sucesso desta metodologia depende da passagem das moléculas de ácido nucléico através das membranas plasmáticas e nuclear, da transcrição em RNA mensageiro e da posterior produção da proteína correspondente dentro da célula (BABIUK *et al.*, 2003b). Em condições normais o DNA tem dificuldade em atravessar a membrana plasmática. As cargas elétricas negativas de ambos produzem um fenômeno de repulsão eletrostática (KUHN *et al.*, 1999). Portanto, um dos problemas da terapia gênica está no estabelecimento de sistemas de entrega de genes eficientes e seguros, que auxiliem o material gênico a ultrapassar as barreiras biológicas. Assim, a formação de um complexo entre DNA e lipídio catiônico poderia facilitar a transferência gênica (GREGORIADIS *et al.*, 2002). Além do uso de substâncias capazes de favorecer a passagem do DNA para o interior da célula, os vetores virais têm sido igualmente utilizados, embora tenham sido apontados riscos associados, tais como a infecção, latência e imunidade contra o vetor (WASHBOURNE e MC ALLISTER, 2002; SMITH, 2003).

Outra característica que poderia influenciar na transfecção e posterior expressão é a conformação molecular do DNA. A linearização do DNA mostrou produzir maiores níveis de expressão e estabilidade em comparação com plasmídeos de DNA circular (CHEN *et al.*, 2001).

Entre as vantagens da imunização gênica sobre vacinas convencionais podemos citar a produção endógena de antígeno, o que resulta em uma resposta imune celular e humoral devido à apresentação do antígeno via complexo MHC classe I e II e, em neonatos, indução de resposta imune mesmo na presença de anticorpos passivos, diminuindo o risco de infecções neonatais. Além disso, dispensa o uso de métodos de

purificação de proteínas para a imunização, já que o hospedeiro atua como um bioreator (BABIUK *et al.*, 2003a).

Atualmente, existem centenas de relatos envolvendo imunização através de plasmídeos em quase todas as espécies, contra muitos agentes virais, bacterianos e parasitários (BABIUK, 2002). Contudo, desconhece-se até o momento, na maioria dos mamíferos, um modelo de vacina de DNA que promova expressão *in vivo* e resposta imunológica desejadas através da transfecção das células-alvo com alta eficiência, baixa toxicidade e de forma segura.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo (VON GROLL *et al.*, 2006), foi demonstrado que a utilização de uma concentração mínima do lipídio catiônico DDAB era eficiente para transfectar células com DNA linear e com uma baixa toxicidade. A estratégia foi empregada baseando-se na teoria proposta por Kuhn *et al.* (1999) onde moléculas anfifílicas, que são hidrofóbicas, seriam capazes de neutralizar ou até mesmo inverter a carga do complexo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de anticorpos para o gene *gag* do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em camundongos inoculados com três formas de DNA: plasmídeo circular, plasmídeo linear e DNA linear mínimo, contendo o gene que codifica para a proteína Gag/CA, associados ou não ao lipídio catiônico DDAB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transfecção Gênica

Durante os últimos 30 anos, a transfecção gênica (entrega de DNA para uma célula-alvo) se tornou uma poderosa ferramenta de pesquisa utilizada para conhecer a estrutura, a regulação e a função dos genes. A transferência gênica também tem sido um pivô para o desenvolvimento de novas técnicas (como a terapia e a imunização gênica) com o potencial de tratar e controlar doenças de impacto clínico e biotecnológico nos próximos anos (LUO e SALTZMAN, 2000), tanto na medicina veterinária (MUTWIRI *et al.*, 2003; BABIUK, 2002; BABIUK *et al.*, 2003a) quanto na humana (REED e CAMPOS-NETO, 2003).

2.1.1 Terapia Gênica

Terapia gênica pode ser definida como uma estratégia usada para transferir polinucleotídeos para células com o propósito de redução ou eliminação de uma determinada doença. O conceito é simples e envolve a entrega de ácidos nucleicos para células-alvo na tentativa de alterar a produção de uma proteína específica, levando a modificações na sua expressão e como consequência resultar num benefício terapêutico (BALLY *et al.*, 1999).

Geralmente, para que uma substância faça seu efeito terapêutico é necessário que ela atinja seu local de ação. Se isso não ocorrer, a droga além de não exercer o efeito desejado, pode causar efeitos não específicos através de interações com alvos não desejados. O problema de entrega de substâncias é mais complicado quando moléculas carregadas, tais como o DNA, são usadas em tratamentos, o que ocorre na terapia gênica (KHALIL *et al.*, 2006). Para fazer o efeito desejado, é necessário, ainda, que as moléculas de ácido nucleico atravessem a membrana plasmática e alcancem seu alvo: o

interior das células (BALLY *et al.*, 1999). A membrana plasmática de células vivas é uma estrutura dinâmica com característica lipofílica. Como resultado, ela restringe a entrada de moléculas grandes, hidrofílicas e carregadas. Exatamente como as moléculas de DNA, grandes e carregadas, o que faz com que a passagem pela membrana se torne um processo difícil (KHALIL *et al.*, 2006). Portanto, o sucesso da terapia gênica é dependente de uma eficiente entrega e expressão do agente terapêutico nas células-alvo dentro dos tecidos ou órgãos, similar a outras estratégias terapêuticas que envolvem a administração de moléculas biológicas ativas, (BALLY *et al.*, 1999). Desta forma, é fundamental para esta metodologia o desenvolvimento de um vetor que garanta especificidade com célula-alvo, além de eficiência e expressão prolongada após administração (HATTORI *et al.*, 2006).

Inicialmente, a terapia gênica foi desenvolvida para corrigir permanentemente um gene em desordens genéticas, tais como a fibrose cística, a imunodeficiência combinada severa e a distrofia muscular. Entretanto, os alvos para a terapia gênica foram ampliados e incluem métodos para eliminar ou modificar células malignas, para modificar a defesa do hospedeiro ou para recuperar a função de órgãos (WORGALL, 2005).

2.1.2 Imunização Gênica

A vacinação de DNA teve maior impulso a partir da década de 90 (TANG *et al.*, 1992). Atualmente, existem centenas de relatos envolvendo imunização através de plasmídeos em quase todas as espécies, contra muitos agentes virais, bacterianos e parasitários (BABIUK, 2002).

A vacinação constitui uma das mais efetivas intervenções para reduzir doenças e perdas econômicas devido a doenças infecciosas, tanto em humanos como na medicina veterinária (WILLADSEN, 2001). Além disso, a vacinação também tem sido apontada como método de controle de ectoparasitas, o que tem um impacto significativo na produção de leite, de carne e na qualidade do couro (WILLADSEN, 2001). Entretanto, apesar do sucesso no desenvolvimento de vacinas para um grande número de doenças, ainda existem muitos patógenos para os quais não existe vacina efetiva. Essas são, provavelmente, algumas das razões para o entusiasmo com a vacinação gênica (VAN DRUNEN *et al.*, 2001).

Imunização gênica é acompanhada pela entrada e expressão de DNA exógeno em células do hospedeiro. O gene de interesse será transcrito em RNA mensageiro e traduzido em proteína, a qual será reconhecida como estranha pelo hospedeiro e estimulará o sistema imune (VAN DRUNEN *et al.*, 2004).

Os plasmídeos usados para imunização gênica consistem de uma unidade de transcrição composta por um promotor eucariótico, um gene codificando para o antígeno de interesse e uma sequência de poliadenilação, e sequências do vetor contendo um gene de seleção de resistência a antimicrobiano, necessário para a manipulação e a seleção *in vitro* (SCHIRMBECK *et al.*, 2001).

2.2 Vacinas de DNA

As vacinas de DNA apresentam inúmeras vantagens sobre vacinas convencionais. Entre elas podemos citar a geração de resposta CTL sem o uso de um vetor replicante ou organismos vivos (VAN DRUNEN *et al.*, 2004); a persistência da expressão de transgenes (CHEN *et al.*, 2001); a relativa estabilidade em temperaturas ambientes, potencialmente eliminando a necessidade de armazenamento sob o frio e a indução de resposta imune em neonatos (HASSET *et al.*, 2000) e *in utero* (GERDTS *et al.*, 2000). Além disso, como o hospedeiro atua como um biorreator, não é necessário o desenvolvimento de métodos de purificação de proteínas para a imunização (VAN DRUNEN *et al.*, 2004). No entanto, a maioria das demonstrações da eficácia das vacinas de DNA tem sido obtida em camundongos. Quando técnicas similares são realizadas em grandes animais ou humanos, há uma baixa eficiência dessas vacinas (VAN DRUNEN *et al.*, 2004). As razões para a baixa eficácia da imunização gênica permanecem desconhecidas, mas podem ser correlacionadas com a eficiência da transfecção do DNA (LUO e SALTZMAN, 2000). Assim, aumentar a transfecção dos plasmídeos e, subsequentemente, a expressão das proteínas pode ser um fator crítico para esta tecnologia alcançar seu potencial (BABIUK *et al.*, 2003b).

De acordo com Babiuk *et al.* (2003a), o próprio conceito da vacina de DNA, composta de um promotor, de um gene de interesse e de outras sequências estruturais do vetor, sugere que a manipulação de qualquer um desses componentes pode alterar a eficácia da vacinação de DNA. Geralmente, partimos do pressuposto de que o nível de expressão do gene de interesse está correlacionado com o nível de imunidade alcançada.

Portanto, qualquer aumento na eficiência de transfecção, bem como no nível de expressão em cada célula promoveria um concomitante aumento na magnitude da resposta imune. As maneiras que atualmente estão sendo empregadas para a obtenção de resposta imune mais efetiva envolvem a manipulação do plasmídeo para aumentar o nível de expressão do gene por célula transfectada (modificação no plasmídeo) ou o aumento do número de células transfectadas através do estabelecimento de sistemas de entrega mais eficazes (BABIUK *et al.*, 2003a).

2.2.1 Plasmídeo

Para Babiuk *et al.* (2003a), a otimização da expressão gênica pode ser alcançada através da modificação de qualquer um dos elementos essenciais do plasmídeo, que incluem o promotor, o gene e outras seqüências estruturais.

2.2.1.1 Promotor

Os vetores de expressão usados para vacinação devem ter propriedades adjuvantes e uma unidade de transcrição capaz de expressar o antígeno de interesse em altos níveis (BABIUK *et al.*, 2003). Conforme Galvin *et al.* (2000), o nível da imunidade celular e humoral induzida por uma vacina de DNA está diretamente correlacionado com a força do promotor. Os autores imunizaram macacos com um plasmídeo sob o comando do promotor citomegalovírus humano (CMV) ou do promotor da LTR (*Long Terminal Repeat*) do vírus da leucemia murina (MLV). Houve geração de resposta imune anti-HIV-1 superior nos animais vacinados com a construção contendo o promotor CMV comparado à resposta obtida com um plasmídeo contendo o promotor da LTR do MLV. Além disso, não houve aumento da resposta imune quando a dose do plasmídeo foi aumentada nas construções envolvendo promotores fracos.

Embora a maioria dos estudos de imunização gênica envolva os promotores virais, tais como o promotor da LTR do vírus Sarcoma Rous (RSV), o promotor do vírus símio 40 (SV40) e o promotor CMV para direcionar a expressão do antígeno (GALVIN *et al.*, 2000), a segurança de tal procedimento tem sido questionada (BABIUK *et al.* 2003a). Além disso, a presença de linfocinas que são liberadas durante a resposta imune, tais como TNF α e particularmente IFN γ , podem diminuir a ação dos

promotores virais em nível transcricional e pós-transcricional (GRIBAUDO *et al.*, 1993).

Produtos de lise de células transfectadas com o plasmídeo expressando o gene *lacZ*, sob o comando do promotor SV40, com e sem tratamento por $\text{INF}\gamma$ foram submetidas a teste de β -galactosidase. Os resultados mostraram que a atividade do promotor SV40 foi significativamente comprometida na presença da citocina $\text{INF}\gamma$. Quando aumentaram as doses de $\text{INF}\gamma$, houve uma diminuição correspondente no nível da expressão da β -galactosidase provavelmente devido à interferência do promotor viral (VANNIASINKAM *et al.*, 2006).

Para testar o uso de promotores mais ativos na presença de $\text{INF}\gamma$, uma alternativa para promotores virais, Vanniasinkam *et al.* (2006) desenvolveram vacinas de DNA contendo o promotor do gene MHC II. O promotor não viral MHC II necessita da indução pelo transativador CIITA, que pode ser regulado de modo positivo pelo $\text{INF}\gamma$. Os autores mostraram que vacinas de DNA sob o controle do promotor MHC II combinadas com o vetor que codifica para o CIITA podem induzir resposta imune específica para o transgene em camundongos.

2.2.1.2 Gene

De acordo com Babiuk *et al.*, (2003a) um dos problemas enfrentados para a síntese protéica eficaz, a partir de vetores plasmídeos, é a tradução do RNA mensageiro. O mecanismo molecular responsável por dificultar a síntese da proteína de interesse está relacionado com a lenta tradução de códons iniciais para os quais existem poucos RNAs transportadores nas células eucarióticas. Códons no mRNA que possuem raros tRNA podem ser modificados para códons com tRNA abundantes através de mutagênese direcionada para o códon do gene contido no plasmídeo ou pela criação de genes sintéticos. Contudo, a maioria dos vírus e parasitas, que utilizam a maquinaria celular, não necessita códons otimizados para se replicarem nas células do hospedeiro. Isso pode ser possível devido a uma diferente regulação da síntese protéica. Porém, esse conhecimento pode ser usado ao reconstruir genes de interesse e para aperfeiçoar os códons, na tentativa que haja aumento no nível de produção da proteína. Cada espécie animal e tecido tem um grupo de tRNAs que predomina para a tradução do mRNA nas células. O aperfeiçoamento dos códons é um trabalho intenso e consome muito tempo.

Porém, em circunstâncias onde a expressão dos genes é muito baixa, pode ser necessário otimizar esses códons para a obtenção de uma expressão mais efetiva. Uchijima *et al.* (1998) construíram plasmídeos substituindo os códons nativos por códons freqüentemente encontrados em genes altamente expressos. Houve obtenção de resposta imune específica para o transgene, o que não havia sido obtido quando os autores utilizaram o plasmídeo com os códons originais. Resultados semelhantes foram obtidos por Ternete *et al.* (2007), onde a otimização dos códons aumentou a imunogenicidade e a eficácia de uma vacina de DNA. Somente o plasmídeo contendo os códons otimizados foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos e controlar a replicação viral após o desafio.

2.2.1.3 Seqüências Estruturais do Plasmídeo

Mesmo que se obtenha a otimização da transfecção pelos vetores plasmídeos, a quantidade de proteína produzida é ainda muito baixa (BABIUK, *et al.*, 2003a). Deste modo, algumas vacinas incorporam seqüências ou genes imunomoduladores que podem criar um microambiente para atrair as células apresentadoras de antígeno, bem como estimular a expansão clonal (KRIEG, 2007).

No DNA bacteriano, os dinucleotídeos CpG são seqüências não metiladas e presentes numa freqüência de 1/16 bases, enquanto no genoma de vertebrados eles representam 1/50-1/60 bases e são seletivamente metilados (VAN DRUNEN *et al.*, 2004). Há evidências demonstrando que a incorporação de tais seqüências no vetor aumenta a resposta imune induzida por uma vacina de DNA (LEUTENEGGER *et al.*, 2000; ZIMMERMANN *et al.*, 2008). Uma das evidências foi obtida com a imunização de gatos com um vetor codificando para a gp140 do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) combinado com uma seqüência CpG que causou uma significativa redução da carga viral nos gatos desafiados, quando comparado com a vacinação através de plasmídeos sem esses CpGs (LEUTENEGGER *et al.*, 2000).

De acordo com Krieg (2000) a imunidade inata induzida pelo CpG é exemplificada pela rápida ativação de células NK, macrófagos e maturação das células dendríticas, com a concomitante produção de citocinas pró-inflamatórias. Essa resposta é a causa da aguda toxicidade observada em protocolos de terapia gênica (YEW *et al.*, 2000). Posteriormente à ativação de células dendríticas, bem como dos efeitos diretos

do CpG nas células B, inicia a resposta imune adquirida, incluindo a geração de anticorpos e linfócitos T citotóxicos contra os antígenos transferidos (KRIEG, 2000). Por outro lado, foi demonstrado que a presença de tais seqüências é importante para a imunogenicidade das vacinas de DNA, e que a sua eliminação ou metilação diminui a ativação da resposta imune adaptativa induzida através da imunização gênica (PASQUINNI *et al.*, 1999; REYES-SANDOVAL e ERTL, 2004). Assim, embora a resposta induzida pelo CpG seja importante, as citocinas resultantes podem prejudicar a produção do antígeno, reduzindo a estimulação dos linfócitos T e B como mostrado (XIANG e ERTL, 1995).

Além dos CpGs, um número de citocinas, tais como GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-15, IL-18, e IFN- γ , têm sido usadas para modular ou aumentar a resposta imune produzida por vacinas de DNA. Scheerlinck *et al.* (2001) administraram conjuntamente plasmídeos codificando para a IL-4, IL-5, IL-15, GM-CSF ou IFN- γ em ovelhas imunizadas com uma vacina de DNA para o *Echinococcus granulosus*. A co-transferência do plasmídeo contendo o gene GM-CSF aumentou os títulos de anticorpos, enquanto IFN- γ ou IL-4 reduziram os níveis de IgG, e a co-transferência de IL-5 ou IL-15 não demonstraram efeito significativo.

Hanlon *et al.* (2001) utilizaram plasmídeos codificando para IL-12, IL-18 ou IFN- γ , como adjuvantes para uma vacina de DNA codificando para o Vírus da Leucemia Felina (FeLV). Os gatos foram vacinados pela via IM com o plasmídeo-FeLV em combinação com um plasmídeo codificando para uma das interleucinas. Não foram detectados anticorpos contra o FeLV; entretanto, após o desafio, somente os animais que receberam a IL-12 e IL-18 desenvolveram resposta protetora frente ao vírus.

Apesar de vários trabalhos terem mostrado que a utilização de plasmídeos codificando o gene de interesse e interleucinas pode aumentar a magnitude da resposta imune das vacinas de DNA, pode ser uma grande vantagem se o vetor for por si só capaz de direcionar uma resposta imune mais potente (WEINER, 2000), o que pode ser obtido, por exemplo, com a modificação da estrutura do plasmídeo.

Chen *et al.* (2001) injetaram em camundongos, via venosa, DNA circular e linear para determinar se a estrutura molecular do vetor plasmídeo afetaria o nível e a persistência da expressão do gene no fígado nos animais. Os autores observaram que a expressão gênica a partir das formas circulares foi de curta duração após a transferência,

enquanto a forma linear manteve altos níveis de expressão de produtos transgênicos, por até nove meses.

Através de eletroforese com detecção de fluorescência induzida por laser (μ CE-LIF), Dang *et al.* (2006) analisaram o DNA plasmideal no núcleo de células transfectadas com a conformação superenrolada (*supercoiled*) e linear. O DNA plasmideal linear foi a forma predominante encontrada no núcleo, indicando que essa conformação pode ser transportada para o núcleo através dos poros nucleares de modo mais eficiente que a conformação superenrolada. Essa maior quantidade de DNA plasmideal no ambiente nuclear pode ser importante para o aumento da eficiência de transfecção (REMAUT *et al.*, 2006).

Com o objetivo de testar um método simples e eficiente de produzir DNA linear livre de clonagem, Al-Zoghaibi *et al.* (2007) usaram a técnica de PCR para a amplificação de cassetes de expressão. Os produtos de PCR linear gerados foram capazes de produzir proteínas de interesse em células transfectadas. Quanto à viabilidade celular, houve somente 30% de redução no crescimento dessas células transfectadas com produtos de PCR comparado com 60-70% de redução no crescimento das células transfectadas com plasmídeos lineares.

A presença de seqüências CpG não metiladas dentro do cassete de expressão e de um gene de resistência a antimicrobianos deve ser avaliada ao se fazer a aplicação da tecnologia de vacinação de DNA. Deste modo, o uso de plasmídeos contendo somente seqüências necessárias para a expressão, apresentando baixa ocorrência de seqüências CpG e ausência de genes de resistência dentro das construções de expressão, seriam mais vantajosas (SCHAKOWSKI *et al.*, 2001; SCHIRMBECK *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2004).

Para solucionar essa questão, Schakowski *et al.* (2001) utilizaram um vetor linear mínimo (composto somente do promotor eucariótico, do gene de interesse e de uma seqüência de poliadenilação) e um vetor circular em quatro linhagens celulares provenientes de adenocarcinoma de cólon transfectadas com o polímero polietilenoamina (PEI) ou com lipossomas. A expressão da construção mínima foi de 2 a 4 vezes maior em relação ao plasmídeo circular nas células SW480 e HT-29 com ambos os reagentes de transfecção. Em duas linhagens celulares (Colo 205 e Colo 201) a eficiência de transfecção foi muito baixa (2,2%). Nestas células a eletroporação mostrou resultados mais eficientes em relação aos complexos catiônicos. A eficiência

de transfecção obtida pelo vetor mínimo foi de 36%, enquanto a obtida pelo plasmídeo circular foi de 33%, mas não houve diferença significativa na transfecção com as diferentes formas de DNA por eletroporação.

Schirmbeck *et al.* (2001) demonstraram pela primeira vez que uma construção de expressão mínima (sem seqüências de DNA bacteriano) pode, eficientemente, induzir uma resposta imune humoral e celular antiviral em camundongos. Moreno *et al.* (2004), também utilizaram uma construção mínima para testes de transfecção. Os autores observaram que esses vetores foram eficazes para expressão do antígeno tanto *in vitro* como *in vivo*, e foram capazes de gerar resposta humoral e celular em camundongos.

Boretti *et al.* (2000) obtiveram uma resposta imune protetora para o vírus da imunodeficiência felina ao imunizar gatos com um vetor linear mínimo associado a um gene que codificava para uma citocina. Os animais foram vacinados com uma construção mínima de expressão da gp140 ou com a gp140 em combinação com uma construção mínima expressando a IL-12 felina. Três dos quatro gatos vacinados que receberam a gp140 combinada com a IL-12 permaneceram protegidos, após o desafio, como determinado por PCR, sorologia e isolamento do vírus. No grupo dos gatos imunizados com a construção mínima para a gp140, todos se tornaram positivos para FIV por PCR, mas a detecção de anticorpos foi tardia quando comparado ao grupo controle. Segundo os autores, a inclusão de um gene de citocina numa vacina de DNA pode aumentar a imunogenicidade e direcionar a resposta imune (Th1 ou Th2).

Apesar de vários autores terem obtido melhores resultados com a forma linear, em outros experimentos foram obtidos resultados diferentes (CHERNG *et al.*, 1999; REMAUT *et al.*, 2006). Cherng *et al.* (1999) estudaram o efeito da topologia do DNA plasmídeo (circular, linear e circular relaxado) complexado com o polímero catiônico poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate-pDMAEMA) na eficiência de transfecção desses complexos *in vitro*. Os autores observaram menor potencial de transfecção das formas linear e relaxada. Resultados similares foram obtidos por Schirmbeck *et al.* (2001) ao comparar DNA linear mínimo e circular transfectados através de precipitação por CaPO₄. A construção mínima linear expressou de três a cinco vezes menos o antígeno em comparação com o plasmídeo circular. Remaut *et al.* (2006) também observaram a eficiência na transfecção *in vitro* de três formas de DNA plasmídeo utilizando como método de transfecção DNA complexado com lipossomas

(DOTAP/DOPE). Somente a forma circular mostrou expressão protéica enquanto a circular aberta e linear falharam. Para confirmar se a eficiência de transfecção observada estava relacionada com uma maior transcrição, os autores microinjetaram as diferentes formas de DNA plasmideal (nu) diretamente no núcleo da célula. Os resultados demonstraram que a eficiência de transcrição foi independente da topologia do DNA.

2.2.2 Sistemas de Entrega

A introdução de moléculas de ácido nucléico em células-alvo depende, primeiramente, da passagem dessas moléculas através da membrana plasmática e da chegada até o núcleo celular. Na ausência de substâncias carreadoras ou vetores, esse processo é pouco eficiente, devido em parte, ao tamanho do DNA, ao fenômeno de repulsão eletrostática existente entre DNA e membrana plasmática e à degradação por enzimas presentes no citoplasma (KUHN *et al.*, 1999). Portanto, um dos problemas da terapia gênica está no estabelecimento de sistemas de entrega de genes eficientes e seguros, que auxiliem o material gênico a ultrapassar as barreiras biológicas.

Por esta razão, uma ampla variedade de métodos tem sido desenvolvida para facilitar esse processo, e aumentar a eficácia das vacinas de DNA (FELGNER *et al.*, 1994). Tradicionalmente, os sistemas de entrega são classificados em vetores virais e não virais (LUO e SALTZMANN, 2000).

2.2.2.1 Vetores Virais

Os principais grupos de vírus usados na transferência gênica são adenovírus, adenovírus associado, retrovírus e herpes simplex virus. As características de cada um desses vírus fazem com que sejam mais ou menos apropriados para aplicações específicas. Elas incluem imunogenicidade, tropismo, persistência do gene expresso, tamanho máximo do gene a ser inserido e integração no genoma do hospedeiro levando à persistência em células em processo de divisão (THOMAS *et al.*, 2003).

De uma maneira geral, os vetores virais são eficientes em atravessar as barreiras existentes para chegar ao interior da célula alvo (ANDERSON, 1998). Além disso, em função de vários vetores virais recombinantes serem incompetentes para

replicação na célula-alvo, muitos deles são considerados relativamente seguros para uso. Podem ser aplicados ou injetados num grupo de células, culturas ou em tecidos para produzir expressões altamente localizadas dos genes de interesse. Essas vantagens podem ser contrabalançadas por algumas limitações sérias: potencial citotoxicidade, necessidade de empenho e tempo para a construção dos vetores virais recombinantes e risco potencial de segurança para a equipe do laboratório (WASHBOURNE e MC ALLISTER, 2002). Ainda, os vetores virais podem induzir uma resposta imune contra o próprio vetor, o que impossibilitaria seu uso continuado (SMITH, 2003).

2.2.2.2 Vetores não Virais

De acordo com Luo e Saltzman (2000) os métodos não virais, compostos em sua maioria por sistemas sintéticos, podem ser classificados em mecânicos, elétricos e químicos.

2.2.2.2.1 Mecânicos

O método de microinjeção de DNA diretamente no núcleo celular foi desenvolvido por Capecchi (1980). Através dessa técnica, o DNA não é exposto aos elementos do citoplasma, evitando a ação de nucleases (CAPECHI, 1980). Porém, este método apresenta desvantagens, uma delas é que a microinjeção somente pode ser aplicada a uma célula de cada vez. Embora relativamente eficiente, o método é também bastante laborioso e não se destina para pesquisas com grandes números de células, nem é prático para transferência *in vivo* (LUO e SALTZMAN, 2000). A injeção pró-nuclear tem sido amplamente usada na tentativa de produzir animais transgênicos (WILLADSEN, 2001).

O bombardeamento de partículas, também chamado de biobalística, pode introduzir DNA em muitas células simultaneamente. Nesse procedimento, micropartículas ligadas ao DNA (composta de metais como o ouro ou tungstênio) são aceleradas em altas velocidades, através da alta pressão de gases inertes, para penetrar na membrana celular (HUANG *et al.*, 2007). A principal desvantagem deste sistema é que os tecidos-alvo devem ser expostos cirurgicamente, embora a transferência seja relativamente eficiente (LUO e SALTZMAN, 2000).

2.2.2.2.2 Elétricos

Um método alternativo é a aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem para permeabilizar a membrana celular, permitindo, deste modo, a captação de macromoléculas pela célula. Esse processo chamado eletroporação foi primeiramente usado por Neumann *et al.* (1982) para transfectar DNA em células de mamíferos. A eletroporação pode ser usada para a expressão transitória de genes clonados e para o estabelecimento de linhagens de células que carregam cópias integradas do gene de interesse (NEUMANN *et al.*, 1982).

Desde então, a eletroporação tem sido usada para transferência de moléculas de ácido nucléico para células de cultivo *in vitro*, incluindo bactérias e leveduras. Porém, essa técnica pode resultar numa alta mortalidade de células e, além disso, as condições de voltagem, capacitância e comprimento de pulso são dependentes do tipo e do tamanho da célula, sendo necessário adaptar as condições para otimizar a sua eficiência (NEUMANN *et al.*, 1982).

Embora a eletroporação seja de difícil aplicação *in vivo*, alguns progressos têm sido obtidos. Rizzuto *et al.* (1999) utilizaram pulsos elétricos de alta frequência, mas de baixa voltagem, para transfectar células musculares de camundongos. Os resultados mostraram tradução mais eficiente no grupo que sofreu eletroporação imediatamente após a injeção do plasmídeo, quando comparado com o grupo que não foi eletropermeabilizado. Na tentativa de tornar o método de imunização por eletroporação menos invasivo, Babiuk *et al.* (2003b) utilizou um sistema livre de agulhas. Esse método aumentou significativamente a expressão gênica, após a administração intradérmica de plasmídeos em suínos, em relação à eletroporação realizada com agulhas.

2.2.2.2.3 Químicos

Sistemas de transferência sintéticos podem resolver alguns dos problemas associados com vetores virais, tais como inflamações e respostas imunes contra o vetor (NABEL *et al.*, 1993; SMITH *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 1994). Além disso, os vetores não virais têm vantagens em termos de simplicidade do uso em grande escala (LIU, 2004).

O desenvolvimento de sistemas de transfeção não-viral está focado, principalmente, em dois métodos: polímeros (CHERNG *et al.*, 1999) e lipídeos catiônicos (FELGNER *et al.*, 1994; AL-ZOGHAIBI *et al.*, 2007), e em ambos pode ocorrer a formação de complexos ao se misturar com o DNA (KHALIL *et al.*, 2006).

Devido aos lipossomos serem freqüentemente utilizados para proteger proteínas da degradação, eles foram testados como um veículo de transferência em vacinas de DNA (VAN DRUNEN *et al.*, 2001). O uso de lipídeos catiônicos em transferência gênica foi introduzido pela primeira vez por Felgner *et al.* em 1987. O uso dos polímeros catiônicos iniciou no mesmo ano por Wu e Wu (1987) com o polímero poly-L-lisina (PLL) e, posteriormente, seguido por uma segunda geração, com o polímero PEI, desenvolvido por Boussif *et al.* (1995).

Lipídios catiônicos são tipicamente usados na forma de lipossomas catiônicos. Todos os lipídios catiônicos possuem uma extremidade hidrofóbica, formada por uma ou duas moléculas de ácido graxo ou alquil com 12 a 18 carbonos de comprimento, além de uma cabeça polar positivamente carregada. As partes hidrofóbicas e a extremidade hidrofílica dão aos lipídios a capacidade de formar agregados sob forma de micelas (lipossomas) quando dispersos em solução aquosa. Entretanto, muitos lipídios catiônicos podem não formar lipossomas sozinhos e são normalmente acompanhados por um lipídio neutro como o dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) ou colesterol (KHALIL *et al.*, 2006). O DOPE é freqüentemente usado devido a sua capacidade de se fundir com outros lipídios quando exposto a baixo pH, tal como em endossomas, quando o objetivo é a liberação do DNA associado no citosol (FARHOOD *et al.*, 1995; HAFEZ *et al.*, 2001).

O complexo lipídio catiônico-DNA é formado pela mistura direta entre lipossomas catiônicos e soluções de DNA. Lipossomas carregados positivamente se ligam aos grupos fosfatos do DNA carregados negativamente através de interações

eletrostáticas. Geralmente, os complexos são formados com um leve excesso de carga positiva para permitir que haja interação com a superfície da célula. A relação entre as cargas do lipossoma e DNA, usualmente, controlam o tamanho dos complexos (ALMOFTI *et al.*, 2003). Quando há uma alta relação de carga negativas ou positivas, pequenos complexos são formados, enquanto, grandes agregados ocorrem quando a carga se aproxima da neutralidade (EASTMAN *et al.*, 1997; ALMOFTI *et al.*, 2003). Antes de acrescentar o DNA, os lipossomas catiônicos são estruturas tipicamente pequenas (100 nm); porém, após o acréscimo do DNA os complexos formados podem ter diâmetros que variam entre 200 nm até estruturas de 2 μ m (WASAN *et al.*, 1996). É geralmente difícil controlar o tamanho dos complexos formados: assim, numa mesma preparação, são formados complexos de tamanhos variados (RADLER *et al.*, 1997). Von Groll, 2003, verificou através de microscopia de força atômica (AFM), as estruturas formadas entre o lipossomo e DNA. As imagens observadas da reação entre o plasmídeo circular e lipofectamine mostraram formas irregulares e com diferentes tamanhos (Figura 1). Radler *et al.* (1997) propuseram um modelo para descrever o processo de interação entre o DNA e lipossomas. Primeiro, os lipossomas causam uma compactação das moléculas de DNA e neutralização da carga. Segundo, a neutralização pode induzir agregação resultando na formação de estruturas de diferentes tamanhos e consistindo de um “sanduíche” de DNA entre as bicamadas lipídicas. Terceiro, o DNA afeta os lipossomas, induzindo o rearranjo dos lipídios resultando na fusão de estruturas multilamelares para formar grandes complexos DNA-lipídio.

Além da compactação do DNA e neutralização, os lipossomas catiônicos fornecem proteção eficaz ao DNA contra nucleases presentes nos meios intra e extracelular, em função da localização do DNA entre bicamadas lipídicas (EASTMAN *et al.*, 1997). Os lipossomas também mostraram conduzir as moléculas de ácido nucléico para as células-alvo, o que explica a maior indução de resposta imune humoral e celular obtida após transfecção gênica com esses complexos quando comparado com DNA nu (GREGORIADIS *et al.*, 2002).

O uso de lipossomas é principalmente relacionado com a transfecção de plasmídeos circulares e/ou supercoiled. Na utilização de DNA linear, Von Groll *et al.* (2006) precisaram aumentar em cinco vezes a dose de lipossomas recomendada pelo fabricante para que ocorresse a transfecção *in vitro*. Entretanto, o efeito tóxico sobre as células ficou evidenciado.

Kuhn *et al.* (1999) sugeriram um modelo onde a neutralização do complexo DNA-lipídio, ou até mesmo a inversão da carga poderia ser obtida com o uso de um lipídio catiônico em baixas concentrações, sem a formação de lipossomos. O modelo proposto consiste de DNA em solução aquosa, um sal monovalente e surfactantes catiônicos. Em solução aquosa, o grupo fosfato das moléculas de DNA torna-se ionizável resultando numa rede de carga negativa. O sal é completamente ionizado, formando um número igual de cátions e ânions. Da mesma forma, as moléculas surfactantes dissociam-se completamente produzindo ânions e cadeias poliméricas com uma extremidade catiônica. Quando uma molécula anfifílica é adicionada numa solução contendo DNA, ocorre uma ligação cooperativa entre os fosfatos aniônicos do DNA com as extremidades catiônicas do surfactante. Deste modo, poderá ocorrer a neutralização ou até mesmo a inversão da carga do complexo, permitindo que haja interação desse complexo DNA-lipídio com a membrana plasmática celular. Essa ligação ocorre a uma concentração específica da molécula surfactante, que é dependente da sua hidrofobicidade e da concentração do sal na solução. Para pequenas concentrações de surfactantes catiônicos, poucas moléculas anfifílicas se associam com as fitas de DNA. Numa concentração crítica, entretanto, o sistema forma complexos em que a carga do DNA é quase que completamente neutralizada pelos anfifílicos associados. Se a densidade continuar aumentando, favorece para que mais moléculas do lipídio se associem com cada grupo fosfato, levando à inversão da carga do complexo.

Em trabalho anterior do nosso grupo, essa teoria proposta por Kuhn *et al.* (1999) foi testada *in vitro* (VON GROLL *et al.*, 2006). O plasmídeo pCH110 expressando a enzima β -galactosidase foi usado na transfecção de células Vero para avaliar a eficiência da transfecção de DNA circular e linear por lipossomas e pelo lipídio catiônico DDAB em baixas concentrações. Os resultados obtidos mostraram uma baixa taxa de transfecção pelo complexo DNA linear-lipossoma quando comparado com a associação entre DNA linear-DDAB. Deste modo, o uso de moléculas anfifílicas em baixas concentrações apresentou vantagens em relação à eficiência de transfecção do DNA linear, além de uma redução da toxicidade celular (VON GROLL *et al.*, 2006).

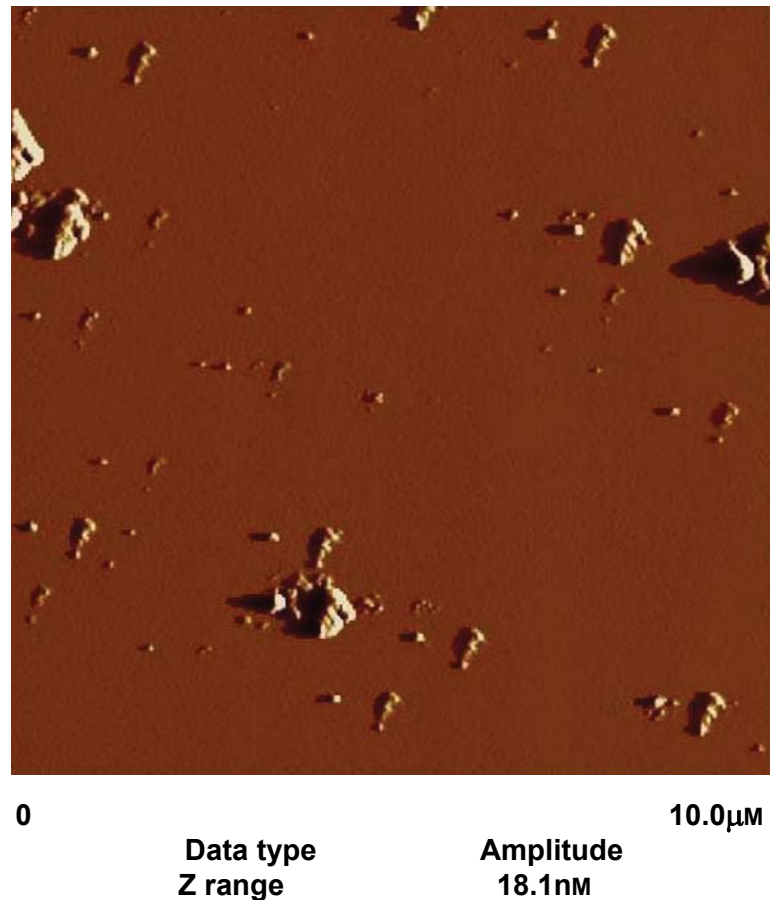


Figura 1 - Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 2,6µL de Lipofectamine e 350 ng de pCH110 circular. Foi verificado a presença de esferas de 100nm, estruturas de formato cônico particulado de 300nm de comprimento e estruturas maiores, totalmente irregulares e com comprimentos que variavam de 500nm a 800nm. Imagens obtidas numa dimensão de 100µm² (De VON GROLL, 2003).

2.2.3 Mecanismos Celulares de Interação com o DNA

A menos que um ligante seja incorporado no plasmídeo, a ligação entre o complexo DNA-lipídeo na superfície da célula é o resultado de interações iônicas não-específicas entre a carga do complexo e a carga negativa da célula. Constituintes da superfície da célula carregados negativamente, como os proteoglicanos e integrinas, têm um papel na ligação celular dos complexos, ou mesmo dos peptídeos catiônicos (BEHR *et al.*, 1989). Em células mutantes com deficiência de proteoglicanos, houve redução da ligação entre a superfície celular e os complexos. A presença de sulfato de heparina e heparina solúvel no meio inibiu competitivamente a ligação. O proteoglicano sulfato de

heparina pode atuar como um receptor não específico para macromoléculas catiônicas, mas seu papel exato em mediar a permeabilidade celular não está claro (MISLICK e BALDESCHWIELER, 1996). Existem evidências mostrando que proteínas transmembrana podem se agrupar na membrana plasmática durante a ligação de partículas catiônicas e assim induzir sua interação com o citoesqueleto, resultando na formação de fibras de tensão (KHALIL *et al.*, 2006). Essa tensão, provavelmente, fornece a energia necessária para a entrada das partículas (WOODS e COUCHMAN, 1994).

Os mecanismos de internalização dos complexos não estão bem compreendidos. Relatos iniciais sugeriram que a fusão entre lipídios e membrana plasmática era responsável pela entrega de DNA para o citosol (FELGNER *et al.*, 1987). Foi sugerido que há uma desestabilização dos lipossomas quando esses interagem com o DNA ou com a membrana celular, facilitando assim sua fusão. Entretanto, existem evidências que a endocitose seria a principal via de entrada. Houve uma diminuição na expressão gênica quando foram usados inibidores de endocitose, e um aumento da expressão de genes, quando reagentes com tropismo por lisossomos, tais como a cloroquina, foram utilizados (COTTEN *et al.*, 1990). Em geral, acredita-se que a fusão da membrana é importante para a transfecção, mas que a maior parte da entrada de DNA ocorra através de endocitose. A fusão da membrana ocorre como resultado da acidificação do endossoma e é responsável pela liberação do conteúdo do endossoma no citosol (KHALIL *et al.*, 2006). Almofti *et al.* (2003), ao contrário de outros pesquisadores, propuseram que a captação dos lipossomas ocorre por endocitose, mas que a fusão da membrana acontece, principalmente, ao nível da membrana plasmática (72%), e é essencial para a endocitose ocorrer.

Após a internalização, as moléculas existentes no endossoma não têm acesso ao citoplasma ou ao núcleo. Numa via natural, esses endossomas fusionam-se com lisossomos para degradação ou reciclagem do seu conteúdo. Deste modo, o DNA deve escapar da via endossomal, que leva a sua degradação (LUO e SALTZAMAN, 2000). Os complexos DNA-lipídios catiônicos contendo o DOPE, lipídio sensível ao pH, possuem uma habilidade intrínseca para levar ao escape endossomal (FARHOOD *et al.*, 1995). O DOPE forma uma bicamada lipídica estável no pH fisiológico, entretanto, em um ambiente ácido (pH 5-6), sofre uma modificação estrutural que leva à fusão e desestabilização da membrana endossomal, liberando seu conteúdo no citoplasma

(HAFEZ e CULLIS *et al.*, 2001). Uma outra maneira para aumentar o escape endossomal é a utilização de cloroquina, que promove a desestabilização dos lisossomos, retardando a degradação do DNA. A utilização desse reagente no meio, geralmente, favorece a transfecção, mas seu uso está associado a uma certa toxicidade celular (KHALIL *et al.*, 2006).

Após a fuga dos endossomas, o DNA plasmideal deverá ultrapassar a última barreira para poder alcançar o núcleo e ser transcrito: a membrana nuclear. Essa estrutura tem o papel fundamental de controlar o transporte entre o núcleo e o citoplasma. Ela contém poros que permitem a passagem passiva de moléculas de até 70 kDa ou aproximadamente 10 nm de diâmetro (MELCHIOR e GERACE, 1995), o que é menor que o tamanho do DNA associado a lipídeos. Pollard *et al.* (1998) microinjetaram DNA plasmideal expressando o gene β -galactosidade diretamente no núcleo ou no citosol. Quando 10.000 cópias de DNA foram injetadas no citoplasma, somente 13% das células expressaram o transgene. Uma expressão gênica semelhante foi obtida quando somente 10 cópias de DNA foram injetadas diretamente no núcleo, sugerindo que a membrana nuclear é uma barreira significativa para que ocorra a transfecção. Ao utilizar linhagens diferentes de células, os autores obtiveram variação na eficiência de transfecção, evidenciando que as barreiras para transferência gênica variam também conforme a linhagem, o que está de acordo com os resultados obtidos por Galvin *et al.* (2000).

2.2.4 Resposta Imune

A publicação inicial feita por Tang *et al.* (1992) relatando que seria possível produzir uma resposta imune específica através da introdução de um gene codificando para uma proteína, levou a inúmeros trabalhos subseqüentes. Ulmer *et al.* (1996) mostraram a habilidade de um DNA plasmideal resultar na geração de linfócitos CD8⁺ após imunização *in vivo* e a habilidade destes CTL em gerar uma resposta protetora em camundongos desafiados subseqüentemente. Trabalhos posteriores demonstraram que quando células musculares eram transfectadas e produziam o antígeno, a ativação das células T ocorria através de uma apresentação cruzada para as células apresentadoras de antígeno (ULMER *et al.*, 1996; CORR *et al.*, 1999)

Estas observações estão de acordo com Kawase *et al.* (2005) que sugeriram dois mecanismos distintos para a indução de resposta imune após a vacinação de DNA: apresentação direta para células apresentadoras de antígeno (APC), principalmente células dendríticas, e apresentação cruzada, onde o antígeno está sendo expresso em células não APCs.

Liu (2004) descreveu os principais aspectos que podem estar envolvidos na geração da resposta celular e humoral obtida pela imunização gênica. As APCs captam o antígeno exógeno em sua via de degradação endolisossomal. A proteína é degradada em peptídeos que se associam com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II) e são exibidas na superfície da célula. As células T helper CD4⁺ reconhecem esse complexo (peptídeo + moléculas MHC II) e são ativadas para produzir citocinas. As citocinas produzidas vão, entre outros efeitos, ativar células B em células produtoras de anticorpos e auxiliar a resposta T citotóxica. A ativação dos CD8⁺, geralmente, é dependente do processamento do antígeno intracitoplasmático. As proteínas são degradadas no proteossoma em peptídeos que se associam com moléculas MHC I. Estes complexos, quando são apresentados na superfície das APCs juntamente com moléculas co-estimulatórias, resultam na ativação das células CD8⁺. Para a resposta de anticorpos, células B reconhecem e respondem a antígenos presentes extracelularmente, ou expostos por proteínas de transmembrana.

Outros autores já relataram a indução de resposta imune protetora através da administração de genes que codificam proteínas de interesse (MARTINS *et al.* 1995; BORETTI *et al.*, 2000).

Martins *et al.* (1995) constataram que a vacinação de DNA conferiu proteção contra o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV). Camundongos adultos foram imunizados pela via intramuscular (IM) com um plasmídeo expressando o gene da nucleoproteína do LCMV. A vacina conferiu proteção em 15 % dos camundongos vacinados após o desafio com uma variante do vírus. Essa proteção foi evidenciada pelos níveis diminuídos de infecção no sangue e tecidos, ausência do antígeno viral em todos os órgãos testados, presença de resposta CTL CD8⁺ específica para LCMV e manutenção ou persistência de células CTL de memória após ausência de infecção viral.

Gonzalez *et al.* (2005) demonstraram efeito protetor em ovelhas através da administração do gene *env* do vírus Maedi-Visna de ovinos (MVV). Houve restrição da

replicação viral após o desafio, embora não tenha sido detectada a presença de anticorpos neutralizantes.

Hasset *et al.* (2000) fizeram a primeira identificação, *ex vivo*, da resposta de células T CD8+ induzida por uma vacinação de DNA. Foram imunizados camundongos de 3 dias de idade e adultos de seis semanas com o plasmídeo pCMVNP codificando para a nucleoproteína do LCMV. Em camundongos neonatos, os linfócitos T específicos para o vírus, quantificados uma semana após a imunização, representavam aproximadamente 43% de todas as células T CD8+. As células de memória específicas para o LCMV constituíam mais de 10% de todos T CD8+ do baço até 246 dias pós-infecção. Houve detecção de células CD8+ antígeno-específico, até um ano após a imunização, as quais não estavam presentes no grupo controle negativo. Não houve diferença significativa na percentagem de células de memória nos adultos quando comparado com neonatos. Deste modo, os autores mostraram indução de resposta imune em neonatos e que essa resposta, induzida por uma vacina de DNA, poderia ser mantida por um período significativo na ausência de revacinação.

Gerds *et al.* (2000) demonstraram a indução de resposta imune *in utero*. Os autores imunizaram fetos ovinos durante o último trimestre da gestação usando um plasmídeo codificando a glicoproteína D do herpes virus bovino 1 (BHV-1) com a porção de transmembrana removida. Todos os animais responderam a uma única imunização via oral com altos títulos de anticorpos para glicoproteína D. Segundo os autores, a imunização ativa ou passiva de fetos tem a vantagem de assegurar que esses indivíduos nasçam imunes a patógenos para os quais eles possam ter contato muito cedo. Por exemplo, a transmissão de herpes simplex, hepatite B, vírus da imunodeficiência humana, *Streptococcus* do grupo B, *Haemophilus influenzae* tipo B e *Chlamydia* sp. ocorre durante ou logo após ao nascimento. Para reduzir o risco de transmissão vertical dessas doenças, outras técnicas são usadas como a cesárea, aplicação de antimicrobianos ou terapia antiviral materna durante o último trimestre da gestação, associados a cuidados neonatais. Entretanto, nenhuma dessas intervenções elimina o risco de infecção neonatal.

A via de administração da vacina de DNA também pode determinar o tipo e a magnitude da resposta imune induzida após a vacinação (PERTMER *et al.*, 1996; KWISSA *et al.*, 2000; HASAN *et al.*, 2000. VAN DRUNEN *et al.*, 2001). Ao utilizar diferentes vias de imunização com plasmídeos não-complexados, observou-se títulos de

imunoglobulinas G (IgG) idênticos nesses camundongos. Entretanto, houve diferença quanto às subclasses de IgG: a inoculação intramuscular resultou em uma resposta predominantemente de IgG2a indicando uma estimulação dos linfócitos T *helper*, promovendo uma resposta Th1, enquanto que a inoculação intradérmica produziu anticorpos tipo IgG1, evidenciando uma resposta Th2 (PERTMER *et al.*, 1996).

Kawase *et al.* (2006), ao utilizar o DNA complexado com uma molécula catiônica, também observaram uma estimulação da resposta Th2 nos camundongos imunizados pela via intradérmica. Além disso, o complexo proporcionou um aumento significativo no nível de anticorpos na imunização quando comparado com a forma não complexada.

Por outro lado, a cinética da resposta humoral produzida pela imunização de plasmídeo não complexado através de diferentes vias, IM e SC, aparentemente não mostrou diferença, sendo observada uma resposta predominante do tipo Th1, evidenciada pela detecção de anticorpos IgG2 (HASAN *et al.*, 2000).

Na administração intramuscular de DNA associado a uma molécula catiônica houve menor expressão nas células musculares quando comparado com o plasmídeo não complexado, mas ambos induziram os mesmos níveis de imunoglobulinas G totais (KAWASE *et al.*, 2005). Os autores sugeriram o modo de apresentação direta com a forma complexada, enquanto que para o plasmídeo nu, administrado via intramuscular, a resposta imune estaria sendo induzida principalmente por apresentação cruzada, como havia sido proposto por outro autor (GREGORIADIS *et al.*, 2002). De acordo com Gregoriadis *et al.* (2002), as APCs têm sido apontadas como a melhor alternativa, quando comparadas com as células musculares, como alvo para a vacinação de DNA, favorecendo sua entrada e expressão.

Outro fator que mostrou influenciar na resposta imune foi o volume administrado na imunização. Em camundongos, a resposta imune diminuiu com a redução do volume de inoculação, indicando que a pressão associada com a injeção de uma quantidade relativamente grande de fluido pode facilitar a tradução ou alternativamente, causar danos teciduais que por sua vez poderia promover ativação do sistema imune inato. Essa tem sido apontada como uma das causas da falha ao se tentar usar, em humanos e grandes animais, técnicas que tiveram sucesso em camundongos. O volume utilizado em roedores não poderia ser aumentado proporcionalmente para o

peso de um humano (que é de 0,1mL para 20g de camundongo em relação aos 300mL para 60kg do humano) (VANNIASINKAM *et al.*, 2006).

Na vacinação genética, os detalhes da indução da resposta imune não estão bem claros. Um melhor entendimento desses mecanismos pode levar ao aumento de sua eficácia (MORENO *et al.*, 2004). Além disso, a disposição do plasmídeo de DNA e os mecanismos envolvidos na expressão do transgene, após a aplicação, permanecem desconhecidos (KAWASE *et al.*, 2005).

2.3 Genoma do CAEV e MVV

Neste trabalho, utilizamos parte do gene *gag* do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, previamente caracterizado e clonado num vetor de expressão eucariótico (RAVAZZOLO *et al.*, 2001), para imunização de camundongos.

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e Vírus Maedi Visna (MVV) são lentivírus pertencentes à família *Retroviridae*. Apresentam genoma composto de duas fitas de RNA idênticas e não complementares, com polaridade positiva, são envelopados e possuem simetria icosaédrica (COFFIN, 1996).

O genoma do CAEV e do MVV apresenta três principais genes, *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica para uma poliproteína precursora, que é clivada em três nucleoproteínas: a proteína do capsídeo (CA, p28), da matriz (MA, p17) e do nucleocapsídeo (NC, p14) (COFFIN, 1996). A proteína do capsídeo é a mais abundante do vírus e está relacionada com a geração de uma forte resposta imune humoral durante a infecção. Embora anticorpos direcionados contra a proteína do capsídeo não protejam contra infecção, eles são usados no diagnóstico dessas doenças (JOAG *et al.*, 1996). A proteína do nucleocapsídeo está firmemente ligada ao ácido nucléico do vírus e a proteína da matriz se localiza entre o envelope viral e o capsídeo. A protease viral, transcriptase reversa e endonuclease/integrase são codificadas pelo gene *pol*. O gene *env* contém as seqüências para a glicoproteína do envelope, que é subsequente processada em duas subunidades (porção da transmembrana e glicoproteínas de superfície). Genes auxiliares *tat*, *rev*, e *vif* também são encontrados no genoma. O LTR está localizado nas extremidades do provírus (DNA viral gerado pela transcriptase reversa e integrado ao DNA da célula hospedeira) e contém importantes elementos de controle para a expressão gênica (COFFIN, 1996).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

Para os testes de transfecção dos plasmídeos foram utilizadas células da linhagem COS-1 (ATCC/CRL-1650 - células provenientes de rim de macaco verde africano transformadas pelo SV-40). As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina em uma atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ a uma temperatura de 37 °C.

3.2 Animais

Nos experimentos *in vivo* foram utilizados machos e fêmeas da espécie *Mus domesticus domesticus*, da cepa BALB/c, com idade entre seis e dez semanas, pertencentes ao biotério do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 22-24 °C, e fornecimento de ração e água *ad libitum*.

3.3 DDAB

O lipídio catiônico utilizado no experimento foi o dimetildioctadecil brometo de amônio (DDAB) (Sigma D-2779) que apresenta na sua estrutura duas cadeias hidrocarbonadas, o que lhe confere um caráter hidrofóbico. Para sua utilização, o reagente foi dissolvido em etanol absoluto numa concentração de 2,7 mg/mL. A quantidade de DDAB foi estabelecida em trabalho anterior do nosso grupo (VON GROLL, 2003).

3.4 DNA Viral

Três plasmídeos foram usados nos experimentos. Como padrão dos testes de transfecção *in vitro* foi utilizado o plasmídeo pCH110 (Pharmacia, Uppsalla, Suécia). Este plasmídeo contém o gene funcional lacZ sob o controle do promotor SV40, e pode ser monitorado pela expressão da enzima β -galactosidade (β -gal).

Para os testes de transfecção *in vitro* foram utilizados os plasmídeos pC28-3 e pC22-1 (Figura 2). O DNA presente na construção do pC28-3 foi obtido a partir de cultivos celulares de tecidos de cabras naturalmente infectadas com um isolado brasileiro do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), previamente caracterizado (Ravazzolo *et al.*, 2001). O vetor contém um fragmento de 615 pares de bases (aproximadamente 205 aminoácidos), obtido por PCR, correspondendo ao gene do capsídeo (obtido através de PCR com os *primers* L3 e LRT3) da amostra C767 clonado no pCR-TOPO no sítio de clonagem. A subclonagem do inserto foi realizada previamente em BS.SK e o fragmento inserido no plasmídeo de expressão eucarionte sob o controle do promotor hCMVie1 no sítio de restrição *Sma*I/*Hind*III (Silva *et al.*, 1999). A construção do pC22-1 envolveu as mesmas etapas de clonagem, porém esse vetor contém um fragmento de 609 pares de bases (aproximadamente 203 aminoácidos) que corresponde ao gene do capsídeo do vírus Maedi Visna (MVV), obtido a partir de cultivos celulares de tecidos de ovinos naturalmente infectados (Ravazzolo *et al.*, 2001).

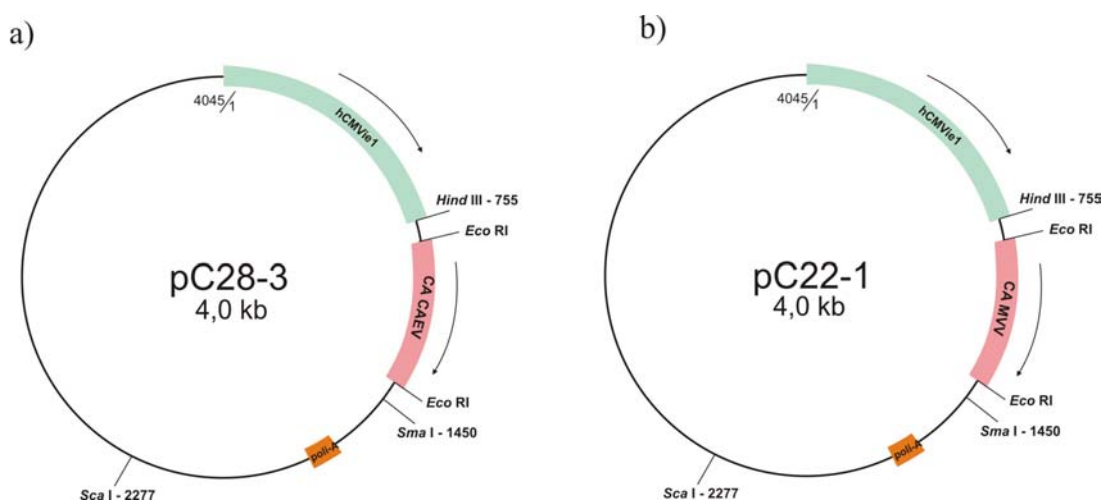


Figura 2 - Representação esquemática da estrutura dos plasmídeos utilizados nos experimentos. Foram representados em (a) a construção contendo o gene do capsídeo do vírus da artrite encefalite caprina denominado pC28-3 e em (b) a construção contendo o gene do capsídeo do vírus Maedi Visna, denominado pC22-1.

3.4.1 Plasmídeo Circular

O DNA plasmideal foi amplificado em bactérias *Escherichia coli* cepa XL-1, isolado e purificado utilizando o método de lise alcalina por fenol-clorofórmio descrito em Sambrook *et al* (1989) para volumes de cultivo de até 5 mL e um kit de extração (Pure Yield Plasmid Midiprep System -Promega Co., Wisconsin, USA) para volumes de 50 a 150 mL.

3.4.1.1 Obtenção das *E. coli* XL-1 Competentes

A produção de bactérias competentes foi feita baseando-se no método químico *One-Step* descrito por Chung *et al.* (1989). Esta técnica permite que as etapas de transformação das *E.coli*, para que se tornem permissivas ao DNA plasmideal, e armazenamento ocorram na mesma solução. Bactérias *E. coli* cepa XL-1 foram semeadas em placa de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB- Anexo 3) acrescido de 15 µg/mL de tetraciclina e incubadas em estufa a 37 °C. Após 12-14 h uma colônia bacteriana foi transferida para um tubo de ensaio contendo 2 mL de meio LB sem antimicrobiano e incubado sob-agitação a 180 rpm e 37 °C *overnight*. Após, 300 µL dessa suspensão foram mantidos em um frasco tipo Erlenmeyer contendo 30 mL de meio LB (diluição 1:100) por 3-4 horas até alcançarem a fase exponencial de crescimento (D.O₆₀₀ 0,4-0,6). O *pellet* foi obtido por centrifugação a 1000 x g por 10 minutos e ressuspensão em 1/10 de seu volume inicial no meio de transformação e armazenagem (TSS- Anexo 3) e colocadas imediatamente a -70 °C. Antes de serem utilizadas para a transformação, as bactérias foram descongeladas a temperatura de 4 °C.

3.4.1.2 Transformação das *E.coli* XL-1

Em uma alíquota de 200 µl de células competentes (descritas no item anterior) foi acrescentado 5 µl (10 ng) do DNA plasmideal (pC28-3 ou pC22-1) e incubada por 30 minutos a 4 °C. A alíquota foi submetida a um choque térmico colocando a mistura por 90 segundos a 42 °C seguido de um resfriamento rápido a 4 °C. Após, 800 µL de meio SOC foi adicionado e a suspensão ficou sob agitação de 180 rpm a 37 °C por 2

horas. Semeou-se 200 µl desse meio em placa contendo ágar LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C *overnight* e após refrigeradas a 4 °C até a seleção das colônias transformantes. Para verificar se ocorreu a transformação, a presença do DNA plasmideal foi confirmada por lise alcalina e fenol-clorofórmio seguida por análise de digestão enzimática.

3.4.1.3 Minipreparação Plasmideal

Cada colônia selecionada foi colocada em tubos contendo 5 mL de meio LB (Anexo 3) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, e incubada *overnight* sob agitação de 180 rpm. Após a incubação, o *pellet* foi obtido por uma centrifugação a 1500 x g durante 10 min e ressuspenso em 100 µL de uma solução composta de 50 mM de glicose, 25 mM TrisCl (pH 8) e 10 mM EDTA (pH 8). Após a completa homogeneização através de vortex a suspensão foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Foram acrescentados 200 µL de uma solução preparada no momento do uso composta de 0,2 M de NaOH e 1% SDS. A mistura foi feita por inversão do tubo e incubação de 10 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 150 µL de uma solução refrigerada composta de acetato de potássio 5 M e ácido acético glacial 11,5 %. A mistura foi feita por agitação lenta de 10 segundos no vortex e o tubo depositado no gelo por cinco minutos. Após este período, o tubo foi centrifugado a 8.000 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Acrescentou-se volume equivalente de fenol:clorofórmio (v/v), sendo a mistura agitada no vortex, centrifugada a 8.000 x g por 2 min e o sobrenadante transferido para um tubo novo. A precipitação do DNA foi realizada com 2 vezes o volume do sobrenadante de etanol absoluto a temperatura ambiente durante 2 minutos. O DNA foi centrifugado a 8.000 x g por 5 min e o precipitado submetido a 3 lavagens com 1 mL de etanol 70% (v/v) em água a temperatura ambiente. Após as lavagens, o sobrenadante foi completamente removido e a água residual evaporou durante 30 min à temperatura ambiente. A solubilização foi realizada em 50 µL de TE (pH 8) contendo 20 µg/mL de RNase livre de DNase e armazenado a -20 °C.

Após a extração, os plasmídeos (pC22-1 e pC28-3) foram observados em gel de agarose a 1 %. Confirmada a presença do DNA plasmideal nas colônias selecionadas, foi isolada e purificada uma quantidade maior de DNA, a partir dessas

colônias, através de um kit de extração (Pure Yield Plasmid Midiprep System / Promega).

3.4.1.4 Midipreparação e Purificação do DNA Plasmideal

Uma colônia obtida a partir de um cultivo *overnight* e previamente selecionada foi colocada em um tubo contendo 5mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubada sob agitação de 180 rpm a 37 °C por 12 horas. Um volume de 1:100 dessa pré-cultura foi transferido para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 150 mL de LB acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubado sob agitação de 180 rpm, a temperatura de 37 °C por 18 horas. Após, a cultura bacteriana foi colocada em tubos cônicos de 50 mL e centrifugada a 1500 x g por 30 minutos. O procedimento de midipreparação foi feito de acordo com o protocolo de purificação por centrifugação descrito no kit (Pure Yield Plasmid Midiprep System / Promega) com modificações (Anexo 2).

A quantificação e qualidade do DNA obtido foram verificadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280nm e confirmada em gel de agarose a 1% pela comparação com um marcador de peso molecular (High DNA Mass Ladder - Invitrogen, USA).

3.4.2 Plasmídeo Linear

A linearização do plasmídeo pC28-3 foi realizada com a ajuda do programa pDRAW32 (programa elaborado por Kjeld Olesen-Acaclone software - <http://www.acaclone.com>) para a escolha da endonuclease de restrição. No momento da escolha foi observado para que não fosse escolhido um sítio sobre o gene do capsídeo no pC28-3 (Figura 2). Escolheu-se o sítio para *ScaI* por estar localizado sobre o gene de resistência da ampicilina. Para a reação de digestão foram adicionadas 2 UI de enzima para cada µg de DNA a ser digerido e tampão da enzima. A incubação foi realizada por 2 horas a 37° C. A digestão foi observada em gel de agarose a 1 % corado com 0,5µg/mL de brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

Para a obtenção de um DNA linear puro, o produto da digestão foi submetido a uma purificação utilizando um sistema de purificação comercial (Wizard SV Gel and

PCR Clean-Up / Promega) e a quantificação foi feita em gel de agarose a 1 % pela comparação com o marcador de peso molecular.

3.4.3 DNA Linear Mínimo

Além do DNA plasmideal na forma linear, também foi utilizado uma construção linear mínima nos experimentos (Figura 3). Essa construção contém somente o promotor hCMVie1 (citomegalovírus humano) de expressão em células eucarióticas, seguida pelo gene de interesse e uma cauda de poli-A. Para a amplificação desse vetor foi utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos foram desenhados através do programa *Primer Express*, sendo o *primer* senso complementar à região imediatamente anterior do promotor hCMVie1 e o *primer* anti-senso complementar à região posterior a cauda de poli-A. As seqüências utilizadas foram: 5' GCCTCGGCCTCTGCATAAA3' (PLG1) e 5' CGAAAAGTGCCACCTGACGT3' (PLG2). Para cada reação foi utilizado como DNA molde 2 µL (10 ng) do plasmídeo circular pC28-3 ou pC22-1, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity - Invitrogen); 200 mM de dNTPs; 60 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 18 mM de sulfato de amônio; 2 mM de MgSO₄; 100 ng de cada oligonucleotídeo num volume final de 50 µL. As condições de reação foram: 94 °C por 5 minutos para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto e 30 segundos, 58 °C por 1 minuto e 68 °C por 5 minutos, terminando com uma extensão final de 10 minutos a 68 °C, para um produto de amplificação de aproximadamente 1800 pb.

Os produtos das reações foram purificados com o auxílio de um kit (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up - Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, analisados em gel de agarose 1%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

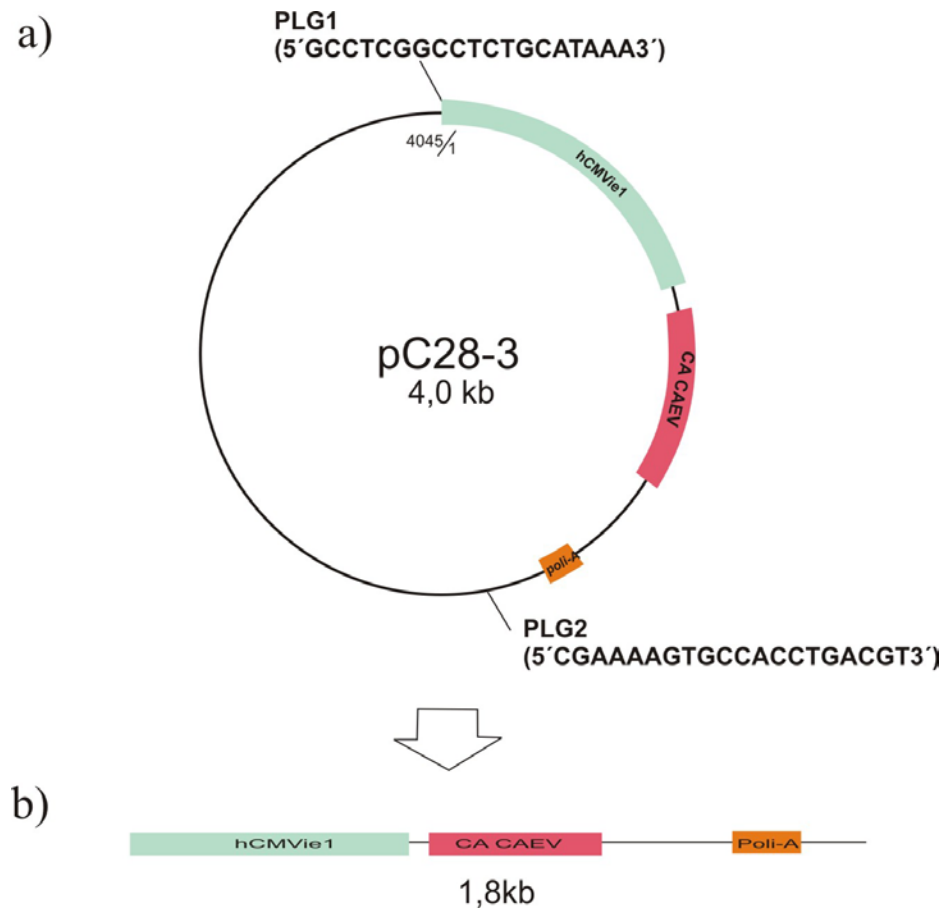


Figura 3 - Representação esquemática mostrando em (a) a região complementar dos *primers* senso e anti-senso utilizados para a construção do DNA linear mínimo obtido por PCR e em (b) o produto de amplificação contendo somente o promotor hCMVie1, o gene do capsídeo do CAEV e a cauda de Poli-A.

3.5 Transfecção das Células com Lipofectamine^(R)

Para os testes de transfecção *in vitro*, foi utilizado o reagente Lipofectamine (Invitrogen). Sua formulação é composta pelo lipídio policatiônico 2,3-*dioleoyloxy-N*-[2-(*spermine-carboxamido*)ethyl]-*N,N*-dimethyl-1-propanaminium (DOSPA) e pelo lipídio neutro *dioleoylphosphatidylethanolamine* (DOPE) na proporção de 3:1. Os plasmídeos utilizados na transfecção foram o pCH110, o pC22-1 e o pC28-3, todos na forma circular.

Para a realização dos ensaios e confirmação da expressão dos genes respectivos, as células foram semeadas a uma densidade de $0,5 \times 10^6$ por recipiente de 25 cm^2 , 15-16 horas antes da transfecção – quando as células estavam com confluência

entre 50 - 70 %. Transcorrido esse tempo, foram preparadas duas soluções, sendo a solução 1 composta de 2 µg de DNA plasmideal misturado com 100 µL de meio DMEM sem SFB, e a solução 2 composta 15 µL de Lipofectamine misturado com 100 µL de meio DMEM sem SFB. As duas soluções foram misturadas e mantidas a temperatura ambiente por 45 minutos para permitir a formação do complexo DNA-Lipofectamine®. Após foi acrescentado 800 µL de meio DMEM sem SFB sobre o complexo. O meio de cultivo foi retirado das células, as quais foram lavadas com DMEM e acrescentou-se a solução DNA-lipofectamine. Após 10 minutos a temperatura ambiente, colocou-se mais 2 mL de DMEM e as garrafas foram incubadas por 5 horas a 37 °C em uma atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂.

Terminado o tempo de incubação, foi acrescentado 8 mL de meio DMEM suplementado com 10 % de SFB. O meio foi trocado 24 horas após e a atividade da enzima β-galactosidase foi estimada após 48 horas.

Além dos três tratamentos realizados para a transfecção com os plasmídeos pCH110, pC22-1 e pC28-3, foram formados outros dois grupos de células, não transfectadas, sendo um deles usado como controle negativo para a visualização da atividade da β-galactosidase, e o outro, como controle negativo na detecção de antígeno-específico. Esses grupos tiveram o mesmo tratamento descrito acima para as células transfectadas, mas não receberam DNA plasmideal, nem o reagente Lipofectamine®. Os grupos de células formados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1- Diferentes tratamentos realizados para a etapa de transfecção *in vitro*.

grupo	material transfectado
1	2µg do pCH110 circular + 15µL de lipofectamine
2	2µg do pC22-1 circular + 15µL de lipofectamine
3	2µg do pC28-3 circular + 15µL de lipofectamine
4	controle negativo (pCH110)
5	controle negativo (pCgag)

3.5.1 Coloração com X-Gal

As células transfectadas com o plasmídeo expressando β -galactosidase foram coradas com o substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal). Após 48 horas da transfecção com lipofectamine, as células foram lavadas com 1 mL de solução salina tamponada (PBS-Anexo 1) e fixadas com 0,2 % de glutaraldeído e 2 % de formaldeído em 2,5 mL de PBS. Após 5 minutos a 4 °C, as células foram lavadas com PBS e, subsequentemente, coradas com 1 mg/mL de X-gal em PBS contendo Ferricianida de potássio / Ferrocianida de potássio e 100 mM de $MgCl_2$ por 24 horas a 37 °C. As células coradas de azul foram identificadas por microscopia. Um dos grupos negativos foi utilizado nessa coloração como controle.

3.5.2 Detecção de Antígeno-Específico

Nas células transfectadas com os plasmídeos pC22-1 e pC28-3 foram extraídas as proteínas para confirmação da captura do DNA e sua posterior tradução.

3.5.2.1 Extrato Protéico

Para a obtenção do extrato protéico, o meio de cultivo das garrafas foi retirado e as células lavadas 2 vezes com 10mL de PBS. Após acrescentou-se 1mL de PBS e raspou-se as células da garrafa de cultivo com auxílio de uma espátula (*scraper*) e essas foram repassadas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. O *pellet* foi obtido por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspenso com 1mL de TEN (Anexo 1). Após 5 minutos a temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos e o *pellet* ressuspenso por vortex com 150 μ L de TRIS.Cl pH 8,0 (0,25 M). A suspensão foi incubada a 4 °C por 10 minutos, seguido de três ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria a 37 °C (aproximadamente 1 minuto em cada temperatura). Após foi feita uma incubação final a 65 °C por 10 minutos. O extrato celular foi separado do *pellet* através de uma centrifugação de 10.000 rpm por 10 minutos e ambos armazenados a -70 °C.

3.5.2.2 *Dot Blot* para Detecção da Proteína Viral Gag

Para a realização do *Dot Blot* foram utilizados como antígeno os lisados celulares dos grupos transfectados com pC22-1, pC28-3, o lisado celular do grupo não transfectado e como controle positivo o antígeno p28 (Veterinary Laboratories Agency-New Haw, Addlestone, Reino Unido), parte do kit comercial de ágar gel imunodifusão (AGID) utilizado no Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, UFRGS.

Inicialmente, foram pipetados 2 μ L de extrato protéico de cada grupo e 2 μ L do antígeno p28 diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose para secar a temperatura ambiente por 1 hora. Após, a membrana foi lavada (2 x 10 min) com tampão TBS (Anexo 4) sob agitação. A membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, em 5% de leite desnatado em TBS para que ocorresse o bloqueio da mesma. Após foi lavada 2x por 10 minutos com TBS-Tween/Triton (Anexo 4) seguido de uma lavagem com TBS. A membrana foi incubada por 2 horas com 1:5 de soro caprino positivo para CAEV, em *blotto* (5% de leite desnatado em TBS), sob agitação leve. Subseqüentemente, foram realizadas duas lavagens com TBS-Tween (Anexo 4), por 10 minutos, uma lavagem com TBS e a membrana foi incubada com conjugado anti-IgG caprino peroxidase (Sigma). Após 1 hora de incubação, realizou-se 4 lavagens de 10 min com TBS-Tween/Triton e a solução de revelação (5 mg de 3,3'-diaminobenzidina em TBS, acrescida de 150 μ L H₂O₂ 30 % e 100 μ L de CoCl₂ 1%) foi adicionada.

A mesma preparação foi realizada utilizando-se soro ovino positivo para MVV. Os soros dos animais utilizados no experimento são provenientes do Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária e foram previamente testados por AGID.

3.5.2.3 *Western Blot*

Para a análise de *Western Blot*, foi adicionado o tampão de amostra (Anexo 5) aos lisados das células transfectadas e das células controle. No antígeno p28, usado como controle positivo, foi acrescentado Tris.Cl pH 8,0 (0,25 M) para diluição, além do tampão de amostra. As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos para desnaturação das proteínas, juntamente com o marcador de peso molecular de proteínas (LMW Electrophoresis - Pharmacia). A separação das proteínas foi realizada em gel de

eletroforese SDS-PAGE 12 % a 20 mA e eletrotransferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando o sistema semi-seco a 4 -14V por 1 hora e meia. A porção da membrana correspondente à migração do marcador foi recortada e corada com Ponceau 0,5 % para visualização das proteínas transferidas. O restante da membrana foi lavada 2 vezes por 10 minutos com TBS a temperatura ambiente, seguido de incubação em TBS contendo 5% de leite desnatado por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com o soro de caprino positivo para CAEV na diluição de 1:2 em *blotto*, *overnight* a 4 °C. Os procedimentos de lavagens, incubação com conjugado e revelação foram os mesmos usados para o *Dot Blot*.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se o *pellet* obtido da extração protéica das células. As soluções usadas na separação e transferências das proteínas estão descritas no anexo 5.

3.7 Inoculação em Camundongos

3.7.1 Protocolo de Imunizações

Para comparar a resposta imune frente a diferentes formas de DNA associado a uma molécula anfifílica, foram utilizados 24 camundongos da cepa BALB/c de 6-8 semanas de idade divididos em 5 grupos. Os camundongos foram inoculados 3 vezes com intervalos de 3 semanas via subcutânea no flanco esquerdo e receberam 10 µg de DNA em 100 µL de solução fisiológica por imunização associado ou não a 2,7 µg de DDAB. Para o preparo da solução de inoculação, primeiramente o DNA era diluído em solução fisiológica, após acrescentava-se o lipídio catiônico DDAB e a solução era homogeneizada lentamente por inversão do tubo. Os grupos de camundongos imunizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos de camundongos imunizados com as diferentes formas de DNA, via subcutânea.

grupo	nro. animais	material inoculado
1	5	DNA pC28-3 linear (digerido com <i>ScaI</i>) + DDAB
2 ^a	5	DNA mínimo pC28-3 obtido por PCR + DDAB
3	5	DNA pC28-3 circular + DDAB
4	5	DNA pC28-3 circular
5	4	solução fisiológica + DDAB

^a Esse grupo foi repetido, contendo 4 animais, sendo denominado grupo 6.

3.7.2 Detecção de Anticorpos Gag-CAEV

Após quatro semanas da última inoculação com o gene que codifica para a proteína do capsídeo do vírus CAEV, foi coletado sangue da veia da cauda de todos os camundongos para detectar a resposta imunológica através da procura de anticorpos antígeno-específico por um rastreamento prévio por *Dot blot*. Uma semana após essa coleta, os camundongos foram anestesiados com 5 mg de cloridrato de xilazina (Rompun® - Bayer, São Paulo, Brasil) em 100 mg de cloridrato de ketamina (Ketalar® - Parke Davis, São Paulo, Brasil) por quilo. Os animais tiveram o plexo braquial aberto com o auxílio de lâmina de bisturi e deste modo, foi novamente coletado sangue com ajuda de pipeta de Pasteur e repassado para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Após, realizou-se o sacrifício dos animais por deslocamento cervical.

3.7.2.1 Obtenção do Soro

O sangue coletado dos camundongos foi armazenado *overnight* a 4 °C e no dia seguinte centrifugado a 2500 rpm em microcentrífuga Eppendorf. O soro foi retirado com auxílio de micropipeta e repassado para um novo tubo de microcentrífuga e armazenado a -20° C.

3.7.2.2 *Dot Blot* para Detecção de Anticorpos contra a Proteína Viral

Para a realização do *Dot Blot*, 2 μ L do antígeno p28, diluído em TBS (1:2), foram aplicados em membrana de nitrocelulose (Hybond-Pharmacia) em cada poço de uma placa de 96 poços. A seguir, a membrana foi incubada por 2 horas com os soros dos camundongos imunizados, diluídos em *blotto* (1:2), sob agitação leve. O conjugado utilizado foi o anti IgG-camundongo peroxidase (Sigma).

Os procedimentos de lavagens, incubação e revelação foram os mesmos usados para o *Dot Blot* realizado na detecção de antígeno nas células (item 3.5.2.2).

3.7.2.3 ELISA

A presença de anticorpos Gag/CA foi detectada por ELISA utilizando o soro obtido na quinta semana após a terceira inoculação, utilizando um kit comercial (Chekit-CAEV/MVV Screening ELISA - Idexx Europe BV, Manufacturer: Dr. Bommeli AG, Berna, Suíça). Os ensaios foram realizados em cooperação com o Instituto de Virologia Veterinária, Universidade de Berna, Suíça e seguiram as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 100 μ L do soro diluído a 1:10 foi adicionada em cada poço e incubada por 90 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem, 100 μ L do conjugado anti-IgG camundongo marcado com peroxidase (Jacksom Immuno Research) diluído a 1:5000 foi adicionado e incubado por 90 minutos a temperatura ambiente. Após as lavagens, a solução cromogênica foi adicionada e a reação de cor foi parada após 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizada a uma densidade ótica de 450 nm.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade dos Plasmídeos Codificando para a Proteína Gag/CA

Como controle dos testes de transfecção *in vitro* foi utilizado o plasmídeo pCH110 que contém o gene funcional *LacZ*, que permite o monitoramento pela expressão da enzima β -galactosidase. A cor azul característica da hidrólise pela enzima do substrato X-Gal foi observada em 80% das células transfectadas com o pCH110, indicando que o processo de transfecção foi realizado de modo eficiente (Figura 4). No grupo controle (não transfectado) não houve a presença de células azuis.

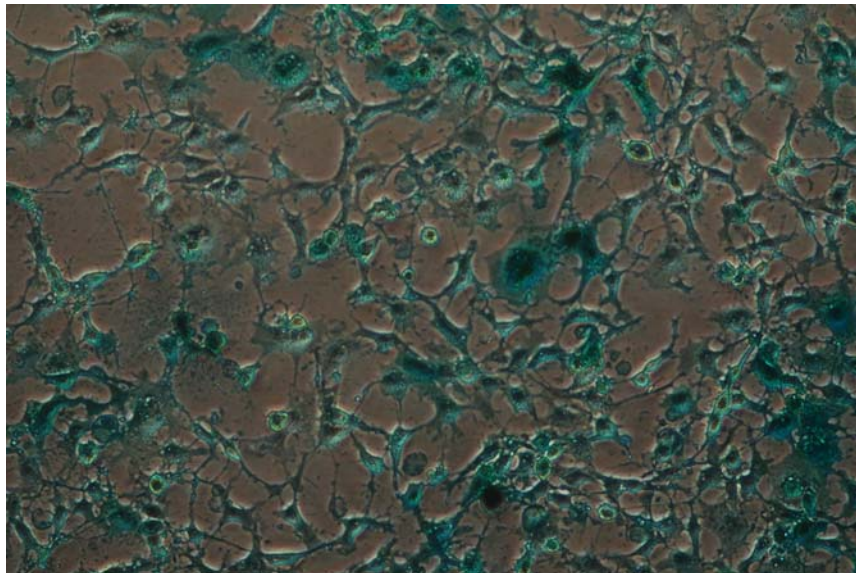


Figura 4 - Células COS-1 transfectadas com o plasmídeo pCH110.

Para detectar a expressão *in vitro* da proteína Gag/CA pelos plasmídeos pC22-1 e pC28-3, células COS-1 foram transfectadas com o DNA complexado com o lipofectamine®, e a expressão da proteína Gag/CA analisada por *Dot blot* e *Western blot*.

4.1.1 Detecção de Antígeno-Específico

Para a realização do *Dot blot* para procura do antígeno Gag/CA foi utilizado o sobrenadante obtido da extração protéica dos grupos transfectados com o pC22-1, pC28-3 e do grupo não transfectado. O antígeno p28 foi utilizado como controle da reação. Houve reação de cor, após a revelação, evidenciando o resultado positivo nos grupos de células transfectadas (pC22-1 e pC28-3), no controle não transfectado e no controle com p28.

A análise de *Western blot*, realizada com o sobrenadante obtido da extração protéica dos grupos transfectados e no controle não transfectado foi negativa e somente houve resultado positivo no controle com o antígeno p28.

O *pellet* obtido da extração protéica também foi testado por *Western blot*. O soro anti-Gag detectou a proteína Gag/CA no extrato celular das células transfectadas com o plasmídeo pC28-3 e no controle com o antígeno p28. Não foi identificada a proteína no extrato das células transfectadas com o plasmídeo pC22-1 e das células não transfectadas (Figura 5).

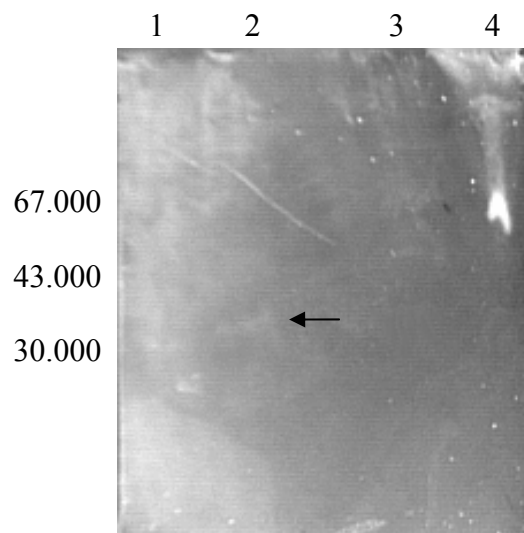


Figura 5 - Análise de *Western blot* do pellet obtido a partir de células transfectadas com o plasmídeo pC22-1 (linha 1), com o pC28-3 (linha 2) e de células não transfectadas (linha 3). Como controle positivo (linha 4) foi utilizado o antígeno p28.

4.2 Obtenção do DNA Viral

Três diferentes formas moleculares dos plasmídeos (circular, linear e linear mínimo) foram utilizadas nos testes *in vivo*. O DNA plasmideal que foi purificado utilizando um kit de extração (Pure Yield Plasmid Midiprep System - Promega) não foi clivado pela endonuclease *ScaI*, ou a clivagem foi ineficiente, quando utilizadas as condições do fabricante. Assim, aumentou-se a quantidade de endonuclease (de 1UI para 2UI) e o tempo de incubação de 1 para 2 horas a 37° C. Mas a digestão somente foi possível quando se diluiu a amostra inicial (Figura 6).

Para a obtenção do DNA linear mínimo foi utilizada a técnica de PCR. O gel de eletroforese dos produtos purificados por coluna mostra que as bandas dos produtos de PCR amplificados são do tamanho esperado (Figura 7).

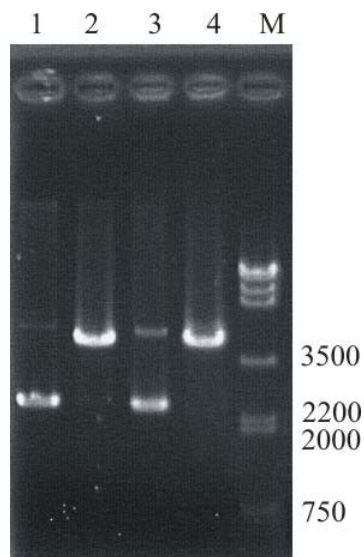


Figura 6 - Imagem de um gel de eletroforese mostrando a digestão com a endonuclease de restrição *ScaI*. Linha 1: pC22-1 circular, linha 2: pC22-1 linear, linha 3: pC28-3 circular, linha 4: pC28-3 linear. M: marcador molecular (λ -DraI).

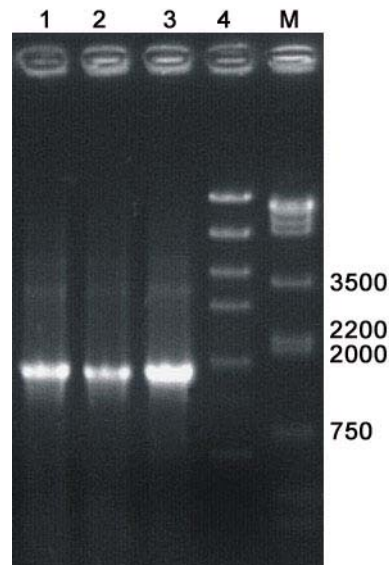


Figura 7 - Imagem do gel de eletroforese mostrando a construção linear mínima obtida por PCR. Linha 1 e 2: produtos de 1,800 pb gerados por PCR contendo o gene gag CAEV, linha 3: produtos após a purificação, linha 4: marcador de peso molecular (High DNA mass ladder), M: marcador molecular (λ -DraI).

4.4 Resposta Imune à Proteína Gag/CA CAEV

Camundongos da cepa BALB/c divididos em 5 grupos foram inoculados via subcutânea e receberam 10 μ g de DNA em diferentes formas (circular, linear e linear mínimo) associados ou não a 2,7 μ g do lipídio catiônico DDAB conforme descrito na tabela 2.

Os anticorpos para a proteína Gag/CA foram detectados, por *Dot blot*, em três dos cinco camundongos nos grupos imunizados com o plasmídeo pC28-3 linear e com a construção linear mínima associados ao DDAB, em quatro dos cinco no grupo inoculado com DNA circular associado com o DDAB e em dois de cinco camundongos do grupo que recebeu o DNA circular não associado a lipídio. Nos quatro animais que somente receberam o DDAB em solução fisiológica não houve detecção de anticorpos Gag-CAEV.

Tabela 3 - Animais com anticorpos positivos contra Gag/CA através da técnica de *Dot blot*.

material inoculado	nro. animais	nro. animais positivos
DNA pC28-3 linear + DDAB	5	3
DNA mínimo pC28-3 + DDAB	5	3
DNA pC28-3 circular + DDAB	5	4
DNA pC28-3 circular	5	2
solução fisiológica + DDAB	4	0

Para a detecção de anticorpos por ELISA, o soro dos camundongos foi coletado cinco semanas após a última imunização, por sangria do plexo braquial. Os resultados mostram que dois animais do grupo inoculado com DNA linear associado ao DDAB, um animal do grupo inoculado com o plasmídeo circular complexado com o DDAB e um animal do grupo que recebeu o plasmídeo circular nu apresentaram títulos de anticorpos para a proteína do CA maiores numericamente que o grupo controle. A análise de variância mostrou que um dos animais (denominado a) do grupo que recebeu DNA linear associado ao DDAB teve diferença significativa quando comparado com a média do grupo controle (Figura 8).

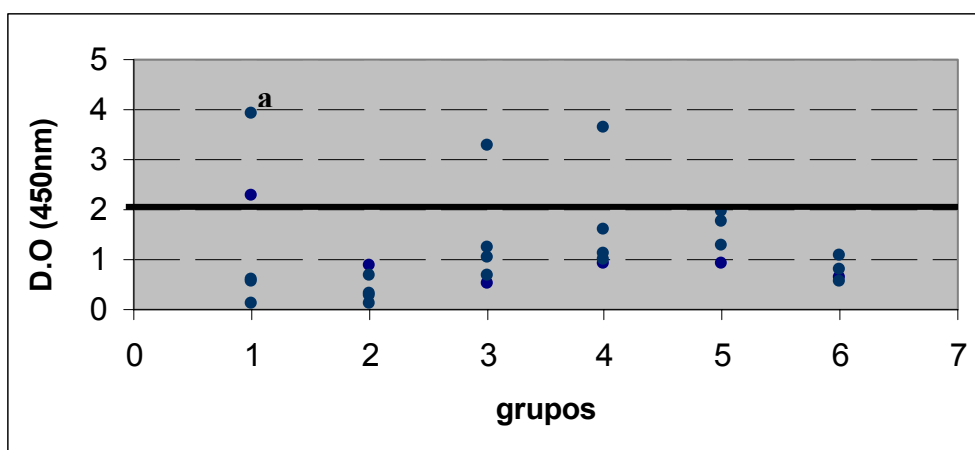


Figura 8 - Resultados do ELISA para anticorpos Gag-CAEV 5 semanas após a última inoculação nos diferentes grupos. Os camundongos foram inoculados via SC com 30 μ g de DNA (10 μ g/100 μ L a cada inoculação) em intervalos de três semanas. Os resultados foram expressos como média dos valores das duplicatas de cada animal. Grupo 1: DNA linear digerido com *ScaI* + DDAB. Grupo 2: DNA linear mínimo obtido por PCR + DDAB. Grupo 3: DNA circular + DDAB. Grupo 4: DNA circular nu. Grupo 5: solução fisiológica + DDAB. O grupo 6 trata-se de uma repetição do grupo 2.

^a. camundongo com diferença significativa quando comparado com a média do grupo controle pelo teste de análise de variância.

5 DISCUSSÃO

Embora a imunização gênica seja efetiva em animais de laboratório, a baixa eficácia desta técnica em grandes animais e humanos faz com que haja a necessidade de desenvolver um sistema de transferência de gene eficiente e seguro. O aumento da expressão protéica e a conseqüente melhora na resposta imune induzida por tais vacinas é o principal objetivo a ser alcançado. Entre os métodos de transfecção não-virais, o uso de lipídios catiônicos formando lipossomas tem sido empregado em grande parte dos trabalhos. Contudo essa associação DNA-lipossoma tem apresentado algumas desvantagens, como a formação de vesículas heterogêneas e a citotoxicidade (HONGTAO *et al.*, 2006). Este trabalho descreve o estágio inicial do desenvolvimento de uma vacina de DNA utilizando um lipídio catiônico para a complexação do material gênico, sem que ocorra a formação de lipossomas, na tentativa de otimizar a resposta imune e diminuir a toxicidade. Em nosso trabalho, os resultados obtidos na análise qualitativa mostraram que houve resposta imune nos animais quando o gene de interesse foi associado ao lipídeo DDAB comprovando a eficácia do sistema sobre o grupo onde o DNA foi inoculado nu.

O uso de moléculas anfifílicas interagindo com o DNA, sem a necessidade de formar lipossomas, foi proposto por Kuhn *et al.* (1999). A partir de cálculos teóricos para o lipídio DOTAB, os autores estabeleceram a concentração necessária dessa molécula para se alcançar a neutralização de 80% da carga do DNA. Contudo, esse lipídio se mostrou ineficaz nessa concentração para transfectar o DNA *in vitro* e se tornou tóxico para as células quando a concentração utilizada foi aumentada (VON GROLL, 2003). Kuhn *et al.* (1999) demonstraram que a concentração do surfactante necessária para levar à neutralização diminui com o grau de hidrofobicidade da molécula. Assim, Von Groll (2003) utilizou o lipídio catiônico DDAB por ser mais hidrofóbico que o DOTAB. Von Groll (2003) testou, *in vitro*, a citotoxicidade do

DDAB em diferentes concentrações, partindo dos cálculos teóricos propostos por Kuhn *et al.* (1999) e observou que em todas as concentrações testadas este lipídeo apresentava baixa toxicidade, porém verificou que com o aumento da concentração diminuía a solubilidade em solução fisiológica. Em nosso trabalho utilizamos a concentração de 26,5 µg/mL de DDAB em solução fisiológica para os experimentos *in vivo*, a mesma estabelecida por Von Groll (2003) para os testes de transfecção *in vitro*.

O lipídeo DDAB tem sido usado como um adjuvante comercial. No entanto, nesses casos, esse composto é diluído em água e aquecido a 80°C para a formação de micelas, numa concentração de uso a 250 µg por dose (LINDBLAD *et al.*, 1997). O presente trabalho não teve como objetivo utilizar esse lipídeo formando lipossomas, e sim, utilizar baixas concentrações dessa molécula para neutralizar a carga do DNA conforme modelo teórico proposto por Khun *et al.* (1999). Em nossos experimentos, esse lipídeo foi utilizado numa concentração aproximada de 10 vezes inferior à indicada para o uso como adjuvante e, como a formação de micelas não era desejada, o DDAB foi dissolvido em etanol absoluto e no momento do uso, misturado ao DNA previamente diluído em solução salina, sem agitação. Nosso trabalho é pioneiro em utilizar o lipídeo catiônico DDAB como neutralizador da carga do DNA *in vivo*.

Além da toxicidade, outra desvantagem ao utilizar lipossomas é a ineficácia observada ao transfectar DNA na forma linear (REMAUT *et al.*, 2006; AL-ZOGHAIBI *et al.*, 2007). Ao utilizar o lipídeo DDAB para transfectar o plasmídeo pCH110 *in vitro*, Von Groll (2003) obteve eficiência de transfecção semelhante com o plasmídeo na forma linear e circular. A importância de estabelecer um sistema de transfecção para DNA linear pode ser amparada pelo maior tempo de expressão obtido com essa forma quando comparado com a forma circular (CHEN *et al.*, 2001). Nesse mesmo sentido, o uso de uma construção linear mínima tem mostrado indução de resposta imune humoral e celular em camundongos (SCHIRMBECK *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2004). Além disso, tem como vantagem não conter seqüências de resistência a antimicrobianos (MORENO *et al.*, 2004) ou bacterianas (KRIEG, 2000). Considerando essas informações, em nosso experimento, foram utilizadas três formas de DNA: DNA plasmídeo circular, DNA plasmídeo linear e um vetor linear mínimo associados ao lipídeo DDAB. Esses complexos DNA-DDAB foram utilizados na imunização de camundongos e continham o gene da proteína CA do CAEV. Os resultados obtidos na análise qualitativa mostraram que houve resposta imune nos animais quando o gene de

interesse, nas três formas, foi associado ao lipídio catiônico DDAB, indicando uma provável ação do lipídio catiônico DDAB como veículo de transfecção para diferentes formas de DNA. Ao realizar uma análise quantitativa, não houve diferença significativa ao utilizar diferentes formas de DNA complexadas ou não ao DDAB. Os resultados podem ser explicados devido às condições que os ensaios foram realizados. As diluições dos soros dos animais imunizados foi diferente entre os ensaios. Para o *Dot blot*, os soros foram diluídos a 1:2, enquanto para o ELISA realizou-se uma diluição de 1:10, o que pode explicar a baixa detecção de anticorpos no ELISA. Além disso, como a diluição foi maior no ELISA, talvez esse ensaio tenha detectado somente aqueles animais que sofreram uma maior estimulação, produzindo assim, mais anticorpos. Outro fator que pode ter levado a contradição dos resultados é a possível heterogeneidade dos antígenos utilizados nos testes (LACERENZA *et al.*, 2006). Mesmo que não tenha ocorrido uma resposta humoral significativa no ELISA, apesar de ter sido verificada a presença de anticorpos no teste de *dot blot*, pode ter ocorrido um aumento dos linfócitos T citotóxicos. Uma maneira de testar se a transfecção foi efetiva no estímulo da resposta imune poderia ser o desafio de animais inoculados (BORETTI *et al.*, 2000) ou uma avaliação específica da presença de CTL por citometria de fluxo.

Henriques *et al.* (2007) obtiveram títulos de anticorpos bastante semelhante em camundongos inoculados com plasmídeos vazios ou com o gene codificando para a proteína da matriz (MA) do MVV, mostrando apenas um leve aumento após cada administração. Ao fazer um reforço com a proteína antigênica (MVV purificado), o título de anticorpos nos camundongos previamente imunizados com o gene que codifica para a MA aumentou significativamente.

Boretti *et al.* (2000) não detectaram níveis de anticorpos por ELISA ao utilizarem DNA na forma linear mínima. Contudo ao associarem o vetor codificando para o *env* do FIV com um vetor linear mínimo codificando para a IL-12, houve indução de resposta CTL e proteção contra o desafio. Resposta de linfócitos T citotóxicos foi obtida em camundongos após a vacinação contra o HIV (QIU *et al.*, 1999), um vírus relacionado ao CAEV. Em nosso experimento, pode ter ocorrido um direcionamento da resposta imune para CTL específicos para a proteína Gag/CAEV, que, todavia, não foi mensurada.

Inicialmente, a capacidade de expressão de dois vetores plasmídeos, pC22-1 e pC28-3 contendo o gene *gag* MVV e CAEV, respectivamente, foi avaliada *in vitro*.

Deste modo, a análise realizada por *Dot blot* utilizando extrato de células transfectadas com as diferentes construções mostrou resultado positivo tanto nos grupos transfectados com o pC22-1 e pC28-3, como no controle negativo (não transfectado). Uma possível explicação para esse fato é que os soros anti-MVV e CAEV, provenientes de animais de campo considerados positivos no teste de AGID, utilizados para a realização do teste de *Dot blot* podem ter reagido com antígenos presentes no extrato protéico das células não transfectadas, comuns aos animais.

De acordo com Tizard (1998), uma solução para o problema de identificação de antígenos protéicos em uma mistura complexa é o teste de *Western blotting*, que envolve a eletroforese da mistura de antígenos em gel, de forma que se possa definir cada componente em uma única faixa de acordo com seu peso molecular. Quando utilizamos, no Western blot, o sobrenadante do extrato protéico, os soros anti-MVV e CAEV não permitiram a detecção da proteína Gag/CA nas células transfectadas com os plasmídeos pC22-1 e pC28-3. Contudo, ao utilizar o sedimento dessas células, houve detecção da proteína nas células transfectadas com o plasmídeo pC28-3. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa *et al.* (2001) que realizaram a clonagem e a expressão da proteína Gag CAEV em um sistema procariótico, seguido por análise das frações de proteínas solúveis e insolúveis por SDS-PAGE. No trabalho, os autores evidenciaram uma maior quantidade da proteína Gag no componente insolúvel da cultura bacteriana que correspondia ao sedimento bacteriano.

De acordo com Lladser *et al.* (2006), o tipo e a magnitude de uma resposta imune pode depender se o antígeno é secretado, ligado à superfície da célula ou permanece dentro da célula. Os mesmos autores observaram que a resposta humoral é favorecida, após a vacinação gênica, ao utilizar um plasmídeo codificando para a forma secretada da proteína. Lewis *et al.* (1999) avaliaram o potencial de vacinas de DNA codificando para mutantes da gD do BHV-1. Os plasmídeos codificavam para a versão de formas secretadas, formas intracelulares e para formas ancoradas na membrana. A imunização de camundongos com essas formas resultou em resposta celular e humoral. Contudo, conforme o compartimento para o qual o plasmídeo codificava, havia um direcionamento do isotipo da imunoglobulina e das citocinas predominantes. Henriques *et al.* (2007) introduziram um sinal de secreção no plasmídeo que codificava para a proteína da matriz do MVV e inocularam em camundongos. Após um reforço com proteína (MVV purificado), o plasmídeo codificando para a forma secretada da MA

elevou significativamente os níveis de anticorpos nos camundongos quando comparado com o grupo que recebeu o plasmídeo que continha o gene MA na forma não secretada. O título de anticorpos nos camundongos imunizados com a MA secretada se manteve detectável por ELISA até o final do experimento (200 dias), enquanto que no grupo inoculado com MA não secretada declinou até os níveis iniciais. Em nosso experimento, não foi possível determinar em qual compartimento celular a proteína do capsídeo estava localizada após ser expressa. Contudo, nossos achados sugerem que a proteína CA poderia estar ligada à membrana celular e essa forma de apresentação da proteína poderia direcionar a resposta imune ou mesmo, alterar sua magnitude (LLADSER *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. O plasmídeo pC28-3, codificando para o gene do capsídeo do CAEV, expressou a proteína CA CAEV em células da linhagem COS-1 quando transfectado.
2. A associação do DDAB com DNA demonstrou uma provável ação adjuvante nos camundongos imunizados com o pC28-3 na forma linear e circular.
3. Houve detecção de anticorpos CA CAEV em camundongos imunizados com o pC28-3 na forma linear e circular associado ao DDAB.
4. O plasmídeo pC28-3 na forma linear induziu maiores títulos, em camundongos, que a forma circular do plasmídeo.

7 PERSPECTIVAS

- Verificar a expressão do antígeno Gag/CA CAEV na região inoculada (tecido subcutâneo) e em alguns órgãos (baço, fígado, linfonodos e rins) através da técnica de Imuno-histoquímica.
- Detectar a presença do DNA viral (Gag/CA) no baço, fígado, linfonodos e rins.
- Avaliar a eficiência de transfecção do plasmídeo pC28-3 na forma circular, linear e da construção linear mínima associado ao DDAB *in vitro*.
- Co-administrar um plasmídeo que codifique para uma citocina ou realizar um reforço com um peptídeo ou proteína na tentativa de otimizar a resposta imune.
- Utilizar um plasmídeo expressando a proteína GFP na forma circular e linear associado ou não com o lipídio catiônico DDAB e comparar a degradação e o tempo de expressão *in vitro*.
- Tentar avaliar o mecanismo de transfecção *in vitro* das diferentes formas associadas ou não ao lipídio DDAB através de um inibidor de endocitose.

REFERÊNCIAS

ALMOFTI, M.R.; HARASHIMA, H.; SHINOHARA, Y.; ALMOFTI, A.; BABA, Y.; KIWAD, H. Cationic liposome-mediated gene delivery: Biophysical study and mechanism of internalization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 410, p. 246-253, 2003.

AL-ZOGHAIBI, F.; ASHOUR, T.; AL-AHMADI, W.; ABULLEEF, H.; DEMIRKAYA, O.; KHABAR, K.S.A. Bioinformatics and experimental derivation of an efficient hybrid 3' untranslated region and use in expression active linear DNA with minimum poly(A) region. **Gene**. v.391, p. 130-139, 2007.

ANDERSON, W.F. Human gene therapy. **Nature**. v.392, p.25, 1998.

BABIUK, L.A. Vaccination: A management tool in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**. v.164, p. 188-201, 2002.

BABIUK, L.A.; PONTAROLLO, R.; BABIUK, S.; LOEHR, B.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. **Vaccine**. v.21, p. 649-658, 2003a.

BABIUK, S.; BACA-ESTRADA, M.E.; FOLDVARI, M.; BAIZER, L.; STOUT, R.; STORMS, M.; RABUSSAY, D.; WIDERA, G.; BABIUK, L. Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin. **Molecular Therapy**. v.8, p. 992-998, 2003b

BALLY, M.B.; HARVIE, P.; WONG, F.M.P.; KONG, S.; WASAN, E.K.; REIMER, D.L. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 38, p. 291–315, 1999.

BEHR, J.P.; DEMENEIX, B.; LOEFFLER, J.P.; PEREZ-MUTUL, J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA (transfection/lipospermine/intermediate pituitary/gene expression). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.86, p. 6982-6986, 1989

BORETTI, F.S.; LEUTENEGGER, C.M.; MISLIN, C.; HOFMANN-LEHMANN, R.; KÖNIG, S.; SCHROFF, M.; JUNGHAN, C.; FEHR, D.; HUETTNER, S.W.; HABEL, A.A.; FLYNN, J.N.; AUBERT, A.A.; PEDERSEN, N.C.; WITTIG, B.; LUTZ, H. Protection against FIV challenge infection by genetic vaccination using minimalistic DNA constructs for FIV env gene and feline IL-12 expression. **AIDS**. v.14, p. 1749-1757, 2000.

BOUSSIF, B.; LEZOUALC'H, F.; ZANTA, M.A.; MERGNY, M.D.; SCHERMAN, D.; DEMENEIX, B.; BEHR, J-P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.92, p. 7297-7301, 1995.

CAPECCHI, M.R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. **Cell**. v.22, p. 479-488, 1980.

CHEN, Z.; YANT, S.R.; HE, C.; MEUSE, L.; SHEN, S.; KAY, M.A. Linear DNAs concatemerize in vivo and result in sustained transgene expression in mouse liver. **Molecular Therapy**. v.3, n.3, p.403-410, 2001.

CHERNG, J.Y.; SCHUURMANS-NIEUWENBROEK, N.M.E.; JISKOOT, W.; TALSMA, H.; ZUIDAM, N.J.; HENINK, W.E.; CROMMELIN, D.J.A. Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes. **Journal Control Release**. v.60, p. 343-353, 1999.

CHUNG, C.T.; NIEMELA, S.L.; MILLER, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.86, p. 2172-2175, 1989.

COFFIN, J. M. **Retroviridae: the viruses and their replication**. In: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1767-1847.

CORR, M.; VON DAMM, A.; LEE, D.J.; TIGHE, H. In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. **The Journal of Immunology**. v. 163, p. 4721-4727, 1999.

COSTA, M.S.; REISCHAK, DILMARA ; RAVAZZOLO, A. P. . Western Blot com proteínas Gag recombinantes para diagnóstico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes. In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2001, Porto Alegre. **Anais**, 2001. p. 161-161.

COTTEN, M.; LÄNGLE-ROUAULT, F.; KIRLAPPOS, H.; WAGNER, E.; MECHTLER, K.; ZENKE, M.; BEUG, H.; BIRNSTIEL, M.L. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: Stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.87, p. 4033-4037, 1990.

DANG, F.; LI, W.; ZHANG, L.; JABASINI, M.; ISHIDA, T.; KIWADA, H.; KAJI, N.; TOKESHI, M.; BABA, Y. Electrophoretic behavior of plasmid DNA in the presence of various intercalating dyes. **Journal of Chromatography**. v. 1118, p. 218-225, 2006.

EASTMAN, S.J.; SIEGEL, C.; TOUSIGNANT, J.; SMITH, A.E.; CHENG, S.H.; SCHEULE, R.Q. Biophysical characterization of cationic lipid:DNA complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1325, p. 41-62, 1997.

FARHOOD, H.; SERBINA, N.; HUANG, L. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1235, p. 289-295, 1995.

FELGNER, P.L.; GADEK, T.R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J.P.; RINGOLD, G.M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.84, p. 7413-7417, 1987.

FELGNER, J.H.; KUMAR, R.; SRIDHAR, C.N.; WHEELER, C.J.; TSAI, Y.J.; BORDER, R.; RAMSEY, P.; MARTIN, M.; FELGNER, P.L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **Journal of Biological Chemistry**. 269, p. 2550-2561, 1994.

GALVIN, T.A.; MULLER, J.; KHAN, A.S. Effect of different promoters on immune responses elicited by HIV-1 gag/env multigenic DNA vaccine in *Macaca mulatta* and *Macaca nemestrina*. **Vaccine**. v. 18, p. 2566-2583, 2000.

GERDTS, V.; BABIUK, L.A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; GRIEBEL, P.J. Fetal immunization by a DNA vaccine delivered into the oral cavity. **Nature**. v.6, n.8, p. 929-932, 2000.

GONZÁLEZ, B.; REINA, R.; GARCÍA, I.; ANDRES, S.; GLARIA, I.; ALZUETA, M.; MORA, M.I.; JUGO, B.M.; ARRIETA-AGUIRRE, I.; PÉREZ DE LA LASTRA, J.; RODRÍGUEZ, D.; RODRÍGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; GRILLO, M.J.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D.; CHEBLOUNE, Y.; LUJÁN, L.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. **Vaccine**. v. 23, p. 4342-4352, 2005.

GREGORIADIS, G.; BACON, A.; CAPARROS-WANDERLAEY, W.; MC CORMACK, B. A role for liposomes in genetic vaccination. **Vaccine**. v. 20, p. B1-B9, 2002.

GRIBAUDO, G.; RAVAGLIA, S.; CALIENDO, A.; CAVALLO, R.; GARIGLIO, M.; MARTINOTTI, M.G.; LANDOLFO, S. Interferons inhibit onset of murine cytomegalovirus immediate-early gene transcription. **Virology**. v.197, p. 303-311, 1993

HAFEZ, I.M. e CULLIS, P.R. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 47, p. 139-148, 2001.

HAFEZ, I.M.; MAURER, M.; CULLIS, P.R. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. **Gene Therapy**. v. 8, p. 1188-1196, 2001.

HASAN, U.A.; HARPER, D.R.; ARGENT, S.; LAYTON, G.; WREN, B.W.; MARROW, W.J.W. Immunization with a DNA expression vector encoding the varicella zoster virus glycoprotein E (gE) gene via intramuscular and subcutaneous routes. **Vaccine**. v. 18, p. 1506-1514, 2000.

HANLON, L.; ARGYLE, D.; BAIN, D.; NICOLSON, L.; DUNHAM, S.; GOLDER, M.C.; MCDONALD, M.; MCGILLIVRAY, C.; JARRETT, O.; NEIL, J.C.; ONIONS, D.E. Feline leukemia virus DNA vaccine efficacy is enhanced by co-administration with interleukin-12 (IL-12) and IL-18 expression vectors. **Journal of Virology**. v. 75, p.8424-8433, 2001.

HASSETT, D.E.; ZHANG, J.; SLIFKA, M.; WHITTON, J.L. Immune responses following neonatal DNA vaccination are long-lived, abundant, and qualitatively similar to those induced by conventional immunization. **Journal of Virology**. v. 74, n.6, p. 2620-2627, 2000.

HATTORI, Y.; KAWAKAMI, S.; NAKAMURA, K.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Efficient gene transfer into macrophages and dendritic cells by *in vivo* gene delivery with mannoseylated lipoplex via the intraperitoneal route. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 318, n. 2, p.828-834, 2006.

HENRIQUES, A.M.; FEVEREIRO, M.; PRAZERES, D.M.F.; MONTEIRO, G.A. Development of a candidate DNA vaccine against Maedi-Visna virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.119, p.222-232, 2007.

HONGTAO, L.; SHUBIAO, Z.; BING, W.; SHAOHUI, C.; JIE, Y. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**. v. 114, p. 100-109, 2006.

HUANG, B.; MAO, C-P.; PENG, S.; HE, L.; HUNG, C-F; WU, T.C. Intradermal administration of DNA vaccines combining a strategy to bypass antigen processing with a strategy to prolong dendritic cell survival enhances DNA vaccine potency. **Vaccine**. v. 25, p. 7824-7831, 2007.

JOAG, S.V.; STEPHENS, E.B.; NARAYAN, O. **Lentiviruses**. In: Fields Virology. FIELDS, B.N. (coord.) 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1977-1996.

KAWASE, A.; KOBAYASHI N.; ISAJI, K.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y. Manipulation of local disposition and gene expression characteristics of plasmid DNA following intramuscular administration by complexation with cationic macromolecule. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 293, p. 291-301, 2005.

KAWASE, A.; ISAJI, K.; YAMAOKA, A.; KOBAYASHI, N.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y. Enhanced antigen-specific antibody production following polyplex-based DNA vaccination via the intradermal route in mice. **Vaccine**. v. 24, p. 5535-5545, 2006.

KHALIL, I.A., KOGURE, K., AKITA, H., HARASHIMA, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacological Reviews**. v.58, p.32-45, 2006.

KRIEG, A.M. Minding the Cs and Gs. **Molecular Therapy**. v.1, p. 209-210, 2000.

KRIEG, A.M. Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. **Proceedings of the American Thoracic Society**. v.4, p. 289-294, 2007.

KWISSA, M.; VON KAMPEN, K.; ZURBRIGGEN, R.; GLÜCK, R.; REIMANN, J.; SCHIRMBECK, R. Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. **Vaccine**. v. 18, p. 2337-2344, 2000.

KUHN, P. S.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Charge inversion in DNA-amphiphilic complexes: possible application to gene therapy. **Physica Acta**. v. 274, p. 8-18, 1999.

LACERENZA, D.; GIAMMARIOLI, M.; GREGO, H.; MARINI, C.; PROFITI, M.; RUTILI, D.; ROSATI, S. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 112, p. 264 -271, 2006.

LEUTENEGGER, C. M.; BORETTI, F.S.; MISLIN, C.N; FLYNN, J.N.; SCHROFF, M.; HABEL, A.; JUNGHANS, C.; KOENIG-MEREDIZ, S.A; SIGRIST, B.; AUBERT, A.; PEDERSEN, N.C.; WITTIG, B.; LUTZ, H. Immunization of cats against feline immunodeficiency virus (FIV) infection by using minimalistic immunogenic defined gene expression vector vaccines expressing fiv gp140 alone or with feline interleukin-12 (IL-12), IL-16, or a CpG motif. **Journal of Virology**. v. 74, p. 10447-10457, 2000.

LEWIS, P.J.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, L.A. Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response. **Journal of Virology**. v. 73, p. 10214-10223, 1999.

LIANG, R.; VAN DEN HURK, J.V.; ZHENG, C.; YU, H.; PONTAROLLO, R.A; BABIUK, L.A; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK , S. Immunization with plasmid DNA encoding a truncated, secreted form of the bovine viral diarrhea virus E2 protein elicits strong humoral and cellular immune responses. **Vaccine**. v. 23, p. 5252-5262, 2005.

LINDBLAD, E.B.; ELHAY, M.J.; SILVA, R.; APPELBERG, R.; ANDERSEN, P. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. **Infection and Immunity**.v. 65, n. 2, p. 623-629, 1997.

LIU, M. A. **DNA vaccines: a review**. In: Vaccines, Preventing disease and protecting health. QUADROS, C.A. (editor). Washington: Pan American Health Organization, 2004, p. 245-255.

LLADSER, A.; PÁRAGUA, M.; QUEVEDO, L.; MOLINA, M.C.; SILVA, S.; FERREIRA, A.; BILLETTA, R.; QUEST, A.F.G. Naked DNA immunization as an approach to target the generic tumor antigen survivin induces humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**. v. 211, p.11-27, 2006.

LUO, D. & SALTZMAN, M. Synthetic DNA delivery systems. **Nature**. v. 18, p. 33-37, 2000.

MARTINS, L.P.; LAU, L.L.; ASANO, M.S; AHMED R.. DNA vaccination against persistent viral infection. **Journal of Virology**. v.69, n. 4, p2574-2582, 1995.

MORENO, S.; LÓPEZ-FUERTES, L.; VILA-CORO, A.J.; SACK, F.; SMITH, C.A.; KONIG, S.A.; WITTIG, B.; SCHROFF, M.; JUHLS, C.; JUNGHANS, C.; TIMÓN, M. DNA immunization with minimalistic expression constructs. **Vaccine**. v. 22, p. 1709-1716, 2004.

MELCHIOR, F. e GERACE, L. Mechanisms of nuclear protein import. **Current Opinion in Cell Biology**. v.7, p.310-318, 1995.

MISLICK, K.A. e BALDESCHWIELER, J.D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 93, p. 12349-12354, 1996.

MUTWIRI, G.; PONTAROLLO, R.; BABIUK, S.; GRIEBEL, P.; VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; MENA, A.; TZANG, C.; ALCON, V.; NICHANI, A.; IOANNOU, X.; GOMIS, S.; TOWNSEND, T.; HECKER, R.; POTTER, A.; BABIUK, L. A. Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 91, p. 89-103, 2003.

NABEL, G.J.; NABEL, E.G.; YANG, Z.Y.; FOX, B.A.; PLAUTZ, G.E.; GAO, X.; HUANG, L.; SHU, S.; GORDON, D.; CHANG, A.E. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, p. 11307-11311, 1993.

NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P.H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **EMBO Journal**. v.1, p. 841-845, 1982.

PASQUINI, S.; DENG, H.; REDDY, S.T.; GILES-DAVIS, W.; ERTL, H.C. The effect of CpG sequences on the B cell response to a viral glycoprotein encoded by a plasmid vector. **Gene Therapy**. v.6, n.8, p. 1448-1455, 1999.

PERTMER, T.M.; ROBERTS, T.R.; HAYNES, J.R. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA Delivery. **Journal of Virology**, v.70, p.6119-6125, 1996.

POLLARD, H. REMY, J-S, LOUSSOUARN, G.; DEMOLOMBE, S.; BEHR, J-P; ESCANDE, D. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 13, p. 7507-7511, 1998.

QIU, J.T.; SONG, R.; DETTENHOFER, M.; TIAN, C.; AUGUST, T.; FELBER, B.K.; PAVLAKIS, G.N.; YU, X.F. Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. **Journal of Virology**. v.73, p. 9145-6152, 1999.

RADLER, J.O; KOLTOVER, I.; SALDITT, T.; SAFINYA, C.R. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. **Science**. v. 275, p. 810, 1997.

RAVAZZOLO, A.P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. **Virus Research**. v. 79, p. 117-123, 2001.

REED, S. G. e CAMPOS-NETO A. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. **Current Opinion in Immunology**. v.15, p. 456-460, 2003.

REMAUT, K.; SANDERS, N.N.; FAYAZPOUR, F.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S.C. Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes. **Journal of Controlled Release**. v.115, p. 335-343, 2006.

REYES-SANDOVAL, A., ERTL, H.C. CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. **Molecular Therapy**. v. 9, n.2, p. 249-261, 2004.

RIZZUTO, G.; CAPPELLETTI, M.; MAIONE, D.; SAVINO, R.; LAZZARO, D.; COSTA, P.; MATHIESEN, I.; CORTESE, R.; CILIBERTO, G.; LAUFER, R; MONICA, N.; FATTORI, E.. Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.96, p. 6417-6422, 1999.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. In: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 1989.

SCHAKOWSKI, F.; GORSCHLÜTER, M.; JUNGHANS, C.; SCHROFF, M.; BUTTGEREIT, P.; ZISKE,C.; SCHÖTTKER, B.; KÖNIG-MEREDIZ, S.A.; SAUERBRUCH, T.; WITTIG, B.; SCHMIDT-WOLF, I.G.H.. A novel minimal-size vector (midge) improves transgene expression in colon carcinoma cells and avoids transfection of undesired DNA. **Molecular Therapy**. v. 3, n 5, p. 793-800, 2001.

SCHEERLINCK, J.P.Y.; CASEY, G.; MCWATERS, P.; KELLY, J.; WOOLLARD, D.; LIGHTOWLERS, M.W.; TENNENT, J.M.; CHAPLIN, P.J. The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy. **Vaccine**. v. 19, p. 4053-4060, 2001.

SCHIRMBECK, R.; KÖNIG-MEREDIZ, S.A.; RIEDL, P.; KWISSA, M.; · SACK, F.; SCHROFF, M.; JUNGHANS, C.; REIMANN, R.; WITTIG, B. Priming of immune responses to hepatitis B surface antigen with minimal DNA expression constructs modified with a nuclear localization signal peptide. **Journal of Molecular Medicine**. v.79, p. 343-350, 2001.

SILVA, R.F.; LIMA, M.F.R; REISCHACK, D.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Produção de anticorpos monoclonais através de imunização genética para o diagnóstico dos lentivirus de pequenos ruminantes, maedi-visna e artrite encefalite caprina. In:

SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XI, 1999, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 262.

SMITH, K. R. Gene therapy: theoretical and bioethical concepts. **Archives of Medical Research**. v.34, p. 247-268, 2003.

SMITH, T.A.; MEHAFFEY, M.G.; KAYDA, D.B.; SAUNDERS, J.M.; YEI, S.; TRAPNELL, B.C.; MCCLELLAND, A.; KALEKO, M. Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice. **Nature Genetics**. v. 5, p. 397-402, 1993.

TANG D.C., DEVIT M., JOHNSTON S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**. v.356(6365), p. 152-154, 1992.

TERNETTE, N.; TIPPLER, B.; ÜBERLA, K.; GRUNWALD, T. Immunogenicity and efficacy of codon optimized DNA vaccines encoding the F-protein of respiratory syncytial virus. **Vaccine**. v. 25, p. 7271-7279, 2007.

THOMAS, C.E.; EHRHARDT, A.; KAY, M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nature**. v.4, p. 346-358, 2003.

TIZARD, I.R. **Sorologia: Detecção e medição dos anticorpos**. In: Imunologia Veterinária: uma introdução. TIZARD, I.R. 5. ed. São Paulo: Editora Roca, 1998. p. 224-243.

UCHIJIMA, M.; YOSHIDA, A.; NAGATA, T.; KOIDE Y. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. **The Journal of Immunology**. v.161, p. 5594-5599, 1998.

ULMER, J.B.; DONNELLY, J.J.; PARKER, S.E. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**. v. 259, p.1745-1749, 1996.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; LOEHR, B.I.; BABIUK, L.A.; Immunization of livestock with DNA vaccines: current studies and future prospects. **Vaccine**. v. 19, p. 2474-2479, 2001.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S.; BABIUK, S.L.; BABIUK, L. A. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. **Immunologica Reviews**. v. 199, p. 113-115, 2004.

VANNIASINKAM, T.; REDDY, S.T.; ERTL, H. C. J. DNA immunization using a non-viral promoter. **Virology**. v. 344, p. 412-420, 2006.

VON GROLL, A. Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção in vitro de células eucarióticas. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2003. 102 f.

VON GROLL, A.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M.B.; RAVAZZOLO, A.P. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be improved by the use of cationic lipid as charge neutralizer. **Biotechnology Progress**, 2006.

WASAN, E.K.; REIMER, D.L.; BALLY, M.B. Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-induced damage when complexed to cationic liposomes. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 85, p. 427-433, 1996.

WASHBOURNE, P. e McALLISTER, A. K. Techniques for gene transfer into neurons. **Current Opinion in Neurobiology**. v.12, p. 566-573, 2002.

WEINER, D. Plasmid Interleukin 12. **AIDS**. v. 14, p.1759-1760, 2000.

WOODS, A. e COUCHMAN, J.R. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. **Molecular Biology of the Cell**. v. 5, p. 183-192, 1994.

WILLADSEN, P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. **Veterinary Parasitology**. v. 101, p. 353-367, 2001.

WORGALL, S. A realistic chance for gene therapy in the near future. **Pediatrics Nephrology**. v. 20, p. 118-124, 2005.

WU, G. e WU, C.H.. Receptor-mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262, n.10, p.4429-4432, 1987.

XIANG, Z.Q. e ERTL, H.C. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. **Immunity**. v. 2, n. 2, p. 129-135, 1995.

YANG, Y.; NUNES, F.A.; BERENCSI, K.; FURTH, E.E.; GONCZOL, E.; WILSON, J.M. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, p. 4407- 4411, 1994.

YEW, N.S.; ZHAO, H.; WU, I.H.; SONG, A.; TOUSIGNANT, J.D.; PRZYBYLSKA, M.; CHENG, S.H. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. **Molecular Therapy**. v 1, n. 3, p. 255-262, 2000.

ZIMMERMANN, S.; DALPKE, A.; HEEG, K. CpG oligonucleotides as adjuvant in therapeutic vaccines against parasitic infections. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 298, p. 39-44, 2008.

ANEXO 1

SOLUÇÕES PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA β -GALACTOSIDASE

a) PBS pH 7,4

NaCl	4 g
KCl	0,1 g
Na ₂ HPO ₄	0,60 g
Água destilada	q.s.p. 500 mL

b) Solução de Fixação

Formaldeído 2%	5,4 mL a 37 %
Glutaraldeído 0,2%	0,8 mL a 25 %
PBS pH 7,4	q.s.p. 100 mL

c) Solução de Coloração

Ferricianida 25mM / Ferrocianida 25mM	4 mL
MgCl ₂ 100mM	200 μ L
X-Gal (40mg/mL em DMSO)	1 mL
PBS pH 7,4	q.s.p. 100 mL

SOLUÇÕES PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO

a) PBS

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄	4,3mM
KH ₂ PO ₄	1,4mM

b) TEN

Tris.Cl (pH7,5)	40 mM
EDTA	1 mM
NaCl	15 mM

ANEXO 2

Protocolo do Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega) com modificações.

Cultura da bactéria

1. Transfira uma colônia, crescida *overnight*, para um tubo cônico de 50 mL contendo 5 mL de meio e antimicrobiano conforme resistência do vetor. Incube a pré-cultura, a 180 rpm e a 37 °C por 12 horas.
2. Transferir 1:100 (1,5 mL) dessa pré-cultura para um Erlenmeyer contendo 150 mL de meio e antimicrobiano. Incube a 180 rpm e a 37 °C por 18 horas.
3. Centrifugue o cultivo bacteriano, em tubos cônicos de 50 mL, a 1500 x g por 30 minutos e descarte o sobrenadante. Seque a boca do tubo em papel toalha para remover o excesso de meio.

Lise da cultura

4. Ressuspenda completamente o *pellet* bacteriano em 6 mL de solução de ressuspensão de células, com auxílio de um agitador.
5. Adicione 6 mL da solução de lise e misture cuidadosamente por inversão do tubo 3-5 vezes. Incube por 3 minutos a temperatura ambiente (22-25°C). Antes de adicionar a solução conferir se não há precipitados, se houver, aquecer a 37°C antes do uso.
6. Adicione 10 mL de solução de neutralização ao lisado celular. Misture por inversão do tubo 3-5 vezes.
7. Centrifugue a 1500 x g por 30 minutos para permitir a formação do *pellet* dos restos celulares.

Purificação do DNA por centrifugação

8. Transfira o lisado para a coluna de clarificação (azul) e incube por 2 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue o tubo com a coluna a 1500 x g por 5 minutos.
9. Transfira o lisado filtrado para a coluna de ligação (branca) e centrifugue a 1500 x g por 5 minutos. Descarte o conteúdo do tubo e remonte a coluna de ligação.

Lavagem

10. Adicione 5 mL da solução de remoção de endotoxinas na coluna de ligação e centrifugue a 1500 x g por 5 minutos. Descarte o conteúdo do tubo e remonte a coluna.
11. Adicione 20 mL de solução de lavagem da coluna e centrifugue a 1500 x g por 10 minutos. Descarte o conteúdo do tubo.
12. Remonte a coluna e centrifugar por mais 10 minutos a 1500 x g para garantir a remoção do etanol. Seque a ponta da coluna com papel filtro.

Eluição

13. Colocar a coluna de ligação num novo tubo e adicione 600 µL de água livre de nuclease sobre a membrana. Incube por 3 minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 1500 x g por 15 minutos e passe o filtrado para um tubo de microcentrífuga e armazene a -20 °C.

a) Solução de ressuspensão de células

Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
RNAse	100 µg/mL

b) Solução de lise

NaOH	0,2 M
SDS	1%

c) Solução de neutralização	
hidrocloro guanidina (pH 4,8)	4,09 M
acetato de potássio	759 mM
ácido acético glacial	2,12 M
d) Solução de lavagem	
acetato de potássio	60 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	8,3 mM
EDTA (pH 8,0)	0,04 mM
etanol	60 %

ANEXO 3

SOLUÇÕES

a) Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto triptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Água destilada	q.s.p.1000 mL

b) Ágar LB

Bacto triptone	10 g
Bacto yeast ext reac	5 g
NaCl	10 g
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

c) TSS (meio de transformação e armazenagem)

MES	64 mg
MgCl ₂ 1M	0,75 mL
PEG 8000	3 g
LB	q.s.p. 28,5 mL
DMSO	5 % (vol/vol)

ANEXO 4

SOLUÇÕES PARA *DOT BLOT*

a) TBS

Tris.Cl, pH 7,5	2,5 mL (Sol.2 M)
NaCl	4,38 g
Agua Milli-Q	q.s.p. 500 mL

b) TBS-Tween

Tris.Cl, pH 7,5	1mL (sol.2 M)
NaCl	2,92 g
Tween 20	50 µl
Agua Milli-Q	q.s.p. 100 mL

c) TBS-Tween/Triton

Tris.Cl, pH 7,5	2 mL (sol.2 M)
NaCl	5,84 g
Tween 20	100 µl
Triton X-100	400 µl
Agua Milli-Q	q.s.p. 200 mL

ANEXO 5

SOLUÇÕES PARA *WESTERN BLOT*

1) Solução estoque de Acrilamida

Acrilamida PAGE	60 g
Bis (N,N´Methylenebisacrylamide)	1,6 g
Água Milli-Q	q.s.p. 200 mL

Usar luvas e máscara para o preparo. Armazenar a 4° C ao abrigo da luz.
No rótulo indicar: usar luvas, produto neurotóxico.

2) 1,5 M TrisCl, pH 8,8

Tris	36,3 g
HCl (4N)	até pH 8,8
Água Milli-Q	q.s.p. 200 mL

Filtrar em membrana de 0,45 µm. Armazenar a 4° C.

3) 0,5M TrisCl, pH 6,8

Tris	3 g
HCl (4N)	até pH 6,8
Água Milli-Q	q.s.p. 50 mL

Filtrar em membrana de 0,45µm. Armazenar a 4° C.

4) Solução SDS 10%

SDS (<i>sodium dodecylsulfato</i>)	5 g
Água Milli-Q	q.s.p. 50 mL

Armazenar a 4° C. Para o preparo usar luvas e máscara.

5) APS 10%

APS (<i>ammonium persulfate</i>)	0,1 g
Água destilada	q.s.p. 1 mL

Estocar a -20° C.

6. 0,375 M TrisCl; 0,1% SDS, pH 8,8

TrisCl, 1,5M, pH 8,8	12,5 mL
SDS 10%	0,5 mL
Água destilada	q.s.p. 50 mL

Armazenar a 4° C.

7. Tampão de tratamento de amostras 6x

TrisCl (0,5 M, pH 6,8)	7 mL
SDS	1 g
Glicerol	3 mL
DTT	0,93 g
Azul de Bromofenol	1,2 mg

Dividir em aliquotas de 1mL e armazenar a -70°C.

8. Tampão de Eletroforese

Tris	12,1 g
Glicina	57,6 g
SDS	4 g
Água destilada	q.s.p. 4 L

O pH fica aproximadamente 8,3. Não ajustar o pH. Armazenar por até 2 meses. Após o uso pode ser reutilizado.

9. Tampão de Transferência

Tris	0,6 g
Glicina	2,88 g
SDS	0,2 g
Água destilada	q.s.p 100 mL

Adicionar 20% de metanol antes do uso. Não reutilizar.