

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

**LIPÍDIOS CATIÔNICOS ANFIFÍLICOS COMO**  
**NEUTRALIZADORES DA CARGA ELÉTRICA DO DNA PARA**  
**TRANSFECCÃO *in vitro* DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS**

**ANDREA VON GROLL**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Imunologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo

**Co-orientador:** Prof. Dr. Yan Levin

**Porto Alegre**

**2003**



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Ana Paula**, por seus ensinamentos, conselhos e dedicação, tanto para o desenvolvimento deste trabalho, bem como para o meu crescimento pessoal e profissional (certamente eu devo ter feito algum erro de concordância nesta frase).

Aos meus pais, **Eunice e Juarez**, por sempre me apoiarem e terem me dado toda a segurança para superar as dificuldades enfrentadas neste período.

Ao **Fábio e a Lisandra**, por terem me dado o melhor presente neste mestrado (mesmo com o fato de eu ter virado literalmente tia).

Ao meu co-orientador **Prof. Yan Levin**, por toda sua paciência, principalmente tentando me explicar os conceitos básicos da Física e a **Profa. Márcia** que, junto com o prof. Yan, sempre cooperaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Bira**, por ter sido um grande amigo e colega.

Às outras componentes que abandonaram a *gang* **Aline e Dilmara** que, mesmo distantes, muito me acrescentaram com o exemplo de seus mestrados. E me dão a esperança de que um dia eu chego lá!

Aos amigos de lamentações, solidariedade e de muitas alegrias nas horas-extras: **Edna, Monsieur Laerte, André, Dona Orema, Alda, Dione, Lika, Carmem, Andrea Faraon, Paula e Elisandro**.

Aos amigos extra faculdade por terem sido minha segunda família: “**los hermanos**” **Marcela, Jorgelina e José** e aos **Amigos do Vôlei**.

À **Lizandréia**, por sua ajuda e trabalho despendido na Microscopia de Força Atômica.

À **Profa. Valéria**, que todos os seus ensinamentos prévios foram de grande valia para o desenvolvimento deste mestrado.

## RESUMO

A transfecção gênica tem sido eficientemente realizada a partir de diferentes formulações de lipídios catiônicos e neutros. Este trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade de uma teoria que propõem utilizar moléculas anfifílicas como neutralizadoras da carga do DNA para a transfecção gênica *in vitro*. Foram realizadas transfecções utilizando o surfactante brometo de dodeciltrimetil amônio (DOTAB) ou o lipídio catiônico brometo de dimetildioctadecil amônio (DDAB) com o pCH110 (plasmídeo que expressa a enzima  $\beta$ -galactosidase) nas formas linear e circular. Em paralelo, foram realizadas transfecções com Lipofectamine™ (lipossomo formado por DOSPA e DOPE) com o mesmo plasmídeo. O DDAB, que é mais hidrofóbico, apresentou-se mais eficiente e menos tóxico que o DOTAB. O DDAB transfectou com semelhante eficiência o pCH110 circular e linear em células de linhagem VERO, diferente de Lipofectamine™ que não transfectou o pCH110 linear na quantidade utilizada para o circular. Foi necessário utilizar Lipofectamine™ em um volume cinco vezes superior para formar o complexo com o DNA linear em relação ao plasmídeo circular. Através da eletroforese em gel de agarose, verificou-se que o DDAB não alterou a estrutura dos plasmídeos linear e circular na proporção em que foram utilizados para transfectar. Na Microscopia de Força Atômica, verificou-se diferentes estruturas formadas entre o DDAB e o plasmídeo circular, onde predominaram esferas de 50-100 nm, sendo possivelmente DNA na forma toroidal. Embora não tenha sido identificado o mecanismo de transfecção, este sistema mostrou-se simples, econômico e eficiente para transfectar células de linhagem, utilizando-se tanto plasmídeo linear como circular.

**ABSTRACT**

*The genetic transfection has been performed efficiently using different combinations of cationic and neutral lipids. In this work we studied the viability of a new theory which proposes the use of amphiphilic molecules to neutralize the DNA charge in order to transfect DNA in vitro. We have performed transfections using the surfactant dodecyltrimethyl-ammonium bromide (DOTAB) and the cationic lipid dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB) with pCH110 (plasmid that expresses the enzyme beta-galactosidase), in its linear and circular form. In parallel, were performed transfections with Lipofectamine (liposome composed of DOSPA and DOPE) with the same plasmids. The DDAB, which is more hydrophobic than DOTAB, has proven to be much more efficient and less toxic. The DDAB transfected equally well both the circular and the linear form of pCH110 in the VERO cell line. This is quite different from the Lipofectamine, which was unable to transfect the linear form of pCH110 at the concentrations that were sufficient for the transfection of the circular plasmid. In fact, it was necessary to use five times more Lipofectamine in order to complex the linear DNA, as compared to the same amount of circular plasmid. Using the electrophoresis in agarose gel, it was verified that DDAB does not significantly alter the structure of plasmid, either circular or linear, at the concentrations used for transfection. However, the atomic force microscopy (AFM) indicates presence of distinct regions on the DNA-plasmid complex. In particular, there is a predominance of spheres with 50-100nm in diameter, which are possibly the condensed DNA of toroidal shape. Although the mechanism of transfection is not fully understood, the DDAB system has proven simple, economic, and relatively efficient for the transfection of cell lines using either linear or circular plasmids.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Métodos de transfecção .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Métodos biológicos .....	15
2.1.1.1 Retrovírus.....	16
2.1.1.2 Adenovírus.....	17
2.1.1.3 Vírus associado a adeno recombinante .....	18
2.1.1.4 Vetores virais não testados clinicamente em humanos .....	18
2.1.2 Métodos físicos .....	19
2.1.2.1 Eletroporação .....	19
2.1.2.2 Microinjeção .....	20
2.1.3 Métodos químicos .....	20
2.1.3.1 Coprecipitação do DNA com fosfato de cálcio .....	21
2.1.3.2 Dietilaminoetil-dextran (DEAE-dextran).....	21
2.1.3.3 Lipossomos .....	22
2.1.3.3.1 Lipossomos formados por lipídios aniônicos.....	23
2.1.3.3.2 Lipossomos formados por lipídios catiônicos.....	23
2.1.3.3.3 Lipossomos formados por derivados de colesterol catiônicos.....	26
2.1.3.3.4 Mecanismo de transfecção por lipossomos.....	27
2.1.3.4 Moléculas anfifílicas faciais.....	30
<b>2.2 Transferência gênica.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Transfecção <i>in vitro</i> .....	31
2.2.2 Transfecção <i>in vivo</i> .....	32
2.2.2.1 Transporte de oligonucleotídeos .....	32

2.2.2.2 Vacinas de DNA .....	33
1.2.2.2.3 Terapia gênica .....	36
<b>2.3 Aplicações em Medicina Veterinária.....</b>	<b>40</b>
2.3.1 Vacina de DNA .....	40
2.3.2 Terapia gênica .....	41
2.3.3 Obtenção de animais transgênicos como modelos experimentais para doenças humanas .....	42
<b>2.4 Teoria de um modelo proposto para a realização de transferência de genes e oligonucleotídeos .....</b>	<b>42</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Cultivos celulares .....</b>	<b>46</b>
3.1.1 Cultivos de Células de Linhagem .....	46
3.1.2 Cultivos Primários e Secundários .....	46
<b>3.2 Lipídios Catiônicos.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3 Lipossomos.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 DNA para a transfecção .....</b>	<b>48</b>
3.4.1 Obtenção e purificação do plasmídeo .....	48
3.4.1.1 Transformação das bactérias XL-1 <i>Blue</i> competentes .....	48
3.4.1.2 Multiplicação das bactérias .....	49
3.4.1.3 Purificação do DNA plasmídeo .....	49
3.4.1.4 Linearização do pCH110.....	49
3.4.1.5 Purificação e quantificação do DNA digerido .....	50
<b>3.5 Protocolos de Transfecção.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.1 Cálculo da quantidade de lipídios catiônicos para a transfecção .....</b>	<b>52</b>
3.5.2 Avaliação da citotoxicidade dos lipídios catiônicos em células VERO .....	54
3.5.3 Parâmetros de transfecção.....	55
3.5.3.1 DOTAB e Lipofectamine™.....	55
3.5.3.2 DNA circular e DNA linear .....	57
3.5.3.3 DDAB e Lipofectamine™ .....	58
3.5.3.4 Células de cultivo secundário.....	59
3.5.3.4.1 Transfecções em células de PFB:.....	59
3.5.3.4.2 Transfecções em células de MSO: .....	59
<b>3.6 Análise dos complexos DNA – lipídios catiônicos .....</b>	<b>59</b>

<b>3.7 Análise do complexo DNA – Lipofectamine™</b> .....	<b>61</b>
<b>3.8 Microscopia de Força Atômica (MFA)</b> .....	<b>62</b>
3.8.1 Preparo das reações para análise por MFA .....	62
3.8.1.1 Formação do complexo lipossomo-DNA .....	62
3.8.1.2 Formação do complexo DDAB-DNA.....	62
3.8.2 Realização da MFA.....	62
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>63</b>
<b>4.1 Obtenção e purificação do plasmídeo</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2 Protocolos de Transfecção</b> .....	<b>63</b>
4.2.1 Avaliação da citotoxicidade dos lipídios catiônicos em células VERO .....	63
4.2.3 Parâmetros de transfecção.....	64
4.2.3.1 DOTAB e Lipofectamine™ .....	64
4.2.3.2 DNA circular e DNA linear .....	65
4.2.3.3 DDAB e Lipofectamine™ .....	66
4.2.3.4 Células de cultivo secundário.....	67
4.2.3.4.1 Transfecções em células de PFB.....	67
4.2.3.4.2 Transfecções em células de MSO .....	68
<b>4.3 Análise dos complexos DNA – lipídios catiônicos</b> .....	<b>69</b>
<b>4.3 Análise do complexo DNA – Lipofectamine™</b> .....	<b>69</b>
<b>4.4 Microscopia de Força Atômica</b> .....	<b>72</b>
4.4.1 Imagens da reação entre o lipossomo (Lipofectamine™) e o plasmídeo linear .....	72
4.4.2 Imagens da reação entre o lipossomo (Lipofectamine™) e o plasmídeo circular ..	72
4.4.3 Imagens da reação entre o DDAB e o plasmídeo circular .....	72
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>85</b>
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>87</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>98</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>99</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>100</b>
<b>ANEXO 4</b> .....	<b>101</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b>	Doenças que estão em testes clínicos terapêuticos por terapia gênica (adaptada de Verma e Somia, 1997) .....	39
<b>TABELA 2</b>	Parâmetros utilizados no desenvolvimento da teoria elaborada por Kuhn <i>et al.</i> (1999) e os utilizados para a aplicação da teoria <i>in vitro</i> .....	52
<b>TABELA 3</b>	Composição das diferentes quantidades dos lipídios catiônicos para complexar com 500 ng do pCH110. ....	60
<b>TABELA 4</b>	Composição das diferentes quantidades de Lipofectamine™ para complexar com 350 ng do pCH110 .....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Representação gráfica das estruturas dos lipídios catiônicos.....	25
<b>FIGURA 2</b>	Mecanismo de transfecção proposto por Felgner e Ringold (1989).....	28
<b>FIGURA 3</b>	Representação da internalização e do trajeto no citoplasma celular de um lipossomo pH-sensível e de um lipossomo pH-não sensível (Ropert, 1999).....	30
<b>FIGURA 4</b>	Gráfico demonstrando a previsão teórica para o modelo de Kuhn <i>et al.</i> (1999).....	44
<b>FIGURA 5</b>	Estrutura dos lipídios catiônicos que foram utilizados para a transfecção .....	47
<b>FIGURA 6</b>	Esquema gráfico do plasmídeo pCH110 destacando a região promotora do SV40, o gene lac Z (expressa a $\beta$ -galactosidase), o gene Amp-r (resistência a ampicilina) e as endonucleases selecionadas pelo programa pDRAW32 .....	50
<b>FIGURA 7</b>	Quantificação de DNA através do programa de análise de imagem <i>ScionImage</i> .....	51
<b>FIGURA 8</b>	Gráfico demonstrando a influência da concentração molar do sal em relação ao ponto de transição, no qual ocorre a ligação do DOTAB com o DNA .....	53
<b>FIGURA 9</b>	Representação da placa de 96 poços com as concentrações de DDAB e DOTAB para o teste de citotoxicidade .....	55
<b>FIGURA 10</b>	Teste de citotoxicidade do DDAB em células Vero .....	64
<b>FIGURA 11</b>	Células Vero transfectadas com pCH110 .....	68
<b>FIGURA 12</b>	Análise da formação de complexos entre diferentes proporções dos lipídios catiônicos e Lipofectamine™ com pCH110 circular e linear.....	71
<b>FIGURA 13</b>	Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 2,6 $\mu$ L de Lipofectamine™ e 350 ng de pCH110 linearizado.....	73
<b>FIGURA 14</b>	Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 2,6 $\mu$ L de Lipofectamine™ e 350 ng de pCH110 circular .....	74
<b>FIGURA 15</b>	Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 5,6 $\mu$ g de DDAB e 350 ng de pCH110 circular .....	75
<b>FIGURA 16</b>	Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo com o produto amplificado após a realização da primeira PCR (PCR 1) e da segunda PCR (PCR 2) para a detecção de DNA de <i>Mycoplasma spp</i> nas células de PFB .....	102

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - Graus Celcius

µg - micrograma

**β-gal** - enzima β-galactosidase

µL - microlitro

µm - micrômetro

**ADA** -adenosina deaminase

**AIDS** – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

**APC** - células apresentadoras de antígenos

**AS-ODNs** - oligonucleotídeos *antisense*

**BET** – brometo de etídeo

**CAT** – cloranfenicol acetil transferase

**CaSki** – células provenientes de carcinoma humano – [ATCC/CRL-1550]

**cm<sup>2</sup>** – centímetro quadrado

**CO<sub>2</sub>** – dióxido de carbono

**COS** – células provenientes de rim de macaco [ATCC/CRL-1650]

**CTAC** - cloreto de cetiltrimetilamônio

**CV-1** – células provenientes de rim de macaco [ATCC/CCL-70]

**DC-Chol** - 1,2-dioleoil-3- 3a-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol

**DDAB** - brometo de dimetildioctadecilamônio

**DEAE-dextran** - dietilaminoetil-dextran

**DHDAB** – brometo de dihexadecildimetilamônio

**D-MEM** – meio essencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco

**DMRIE** -N-[1(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etil

**DMSO** – dimetil sulfóxido

**DNA**- ácido desoxirribonucleico

**DOGS** - 1,3-dioleoil-N-glicerol

**DOPE** - dioleoil fosfatidiletanolamina

**DOSPA** - N-[1(2,3-dimiristiloxi)propil]acetil

**DOTAB** – brometo de dodeciltrimetilamônio

**DOTAP** - trimetilamônio propano

**DOTMA** – cloreto de N-[1,2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio

**E1** -região que codifica proteínas essenciais para a replicação do DNA viral do Adenovírus

**g** - grama

**g** – força da gravidade

**gp** - glicoproteína

**h** – hora

**HIV** – vírus da imunodeficiência humana

**HIV-1** – vírus da imunodeficiência humana tipo 1

**HSV** - herpes simplex vírus

**HSV-1** - herpes simplex vírus tipo 1

**i.m.** - intramuscular

**IFN- $\gamma$**  - interferon gama

**IgG1** – imunoglobulina G tipo 1

**IL-4** – interleucina 4

**kb** – kilobase

**LB** – meio Luria Bertoni

**LPLL** - *lipopoli(L-lisina)*

**M** - molar

**MFA** – microscopia de força atômica

**mg** - miligrama

**min** - minuto

**mL** - mililitro

**MLV** -vírus da leucemia murina de Moloney

**mM** - milimolar

**MSO** - membrana sinovial ovina

**NaCl** - cloreto de sódio

**ng** - nanograma

**nmol** - nanomol

**nM** - nanomolar

***o.n.*** – *overnight*

**OBA** – *Office of Biotechnology Activities*

**pb** – pares de base

**PBS** – *Phosphate Buffer Saline* (Solução salina tamponada com fosfatos)

**PEG** - polietilenoglicol

**PFB** - pulmão de feto bovino

**pH**- potencial de hidrogênio

**PKC** - proteína quinase C

**q.s.p.** – quantidade suficiente para

**RAC** - *Recombinant DNA Advisory Committee*

**RCR** - retrovírus competente de replicação

**RNA**- ácido ribonucleico

**SCID** – *Severe Combined Immunodeficiency Disease*

**SFB** - soro fetal bovino

**SV40** - simian virus 40

**TE** – Tampão Tris-EDTA

**VERO** – células provenientes de rim de macaco [ATCC/CCL-81]

**VT** - tripsina versene

**X-gal** – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ - D-galactosídeo

## 1 INTRODUÇÃO

As técnicas de manipulação gênica permitem que genes eucarióticos sejam introduzidos em células procarióticas e que estas, ao se multiplicarem, sejam capazes de os propagarem. Porém, nem todas as proteínas eucarióticas são sintetizadas eficientemente em bactérias e, em função destas limitações, desenvolveu-se sistemas para expressão de proteínas biologicamente ativas, através da transfecção destes genes para células eucarióticas.

A introdução de DNA heterólogo nas células eucarióticas possibilita uma série de aplicações, tais como: produção em alta escala de proteínas de interesse biológico; inserção de genes em células para que estas adquiram características desejadas, como, por exemplo, a imortalização de cultivos celulares primários a partir da inserção de um gene tumoral; para identificar elementos da seqüência de DNA envolvidos no controle da expressão gênica; analisar a manutenção dos genes e a sua expressão e a aplicação *in vivo*, como vacinas de DNA e para terapias gênicas.

Entre os fatores que influenciam na eficiência de um método de transfecção pode-se destacar a origem e o tipo da célula, presença de soro no meio, degradação do DNA por endonucleases presentes no citoplasma e a citotoxicidade dos componentes utilizados para a transfecção.

A fim de aprimorar e estabelecer as melhores condições, o estudo para o desenvolvimento de técnicas de transfecção é constante, sempre buscando suprir limitações das existentes, aperfeiçoá-las ou então, buscar métodos mais apropriados para os objetivos requeridos.

Este trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade da teoria desenvolvida por Kuhn *et al.* (1999) que propõem utilizar moléculas anfífilas como neutralizadoras da carga do DNA para a transfecção gênica *in vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pode-se classificar os métodos de transfecção como transfecção transitória ou estável e transfecção *in vitro* ou *in vivo*. A transfecção é considerada transitória quando o DNA é introduzido dentro do núcleo, mas não é incorporado ao cromossomo; ou permanente, quando o DNA é integrado ao cromossomo ou mantido como um episossomo (Ausubel, 1991). A transfecção *in vitro* consiste na introdução de DNA em células cultivadas. A cultura de células é realizada em frascos de cultivos e as suas condições de manutenção (pH, nutrientes, temperatura) podem ser controladas pelo manipulador. Já na transfecção *in vivo* o DNA é introduzido em células alvos do organismo de seres vivos superiores.

### 2.1 Métodos de transfecção

Os procedimentos mais comumente usados para a transfecção podem ser divididos em: métodos biológicos, métodos físicos e métodos químicos.

#### 2.1.1 Métodos biológicos

A transfecção utilizando vetores virais apresenta-se como uma eficiente forma de atravessar as barreiras existentes para chegar ao interior da célula alvo (Anderson, 1998). Isto ocorre porque o vírus utiliza o seu mecanismo natural de adsorção – reconhecimento do receptor celular – para penetrar na célula, facilitando a internalização do DNA. O sistema viral é atrativo porque é possível substituir genes envolvidos na replicação viral ou na virulência por um ou mais genes potencialmente terapêuticos, tornando-se um eficiente vetor que não se replica ou não produz doença no hospedeiro (Friedmann, 1997).

Três diferentes classes de vetores virais têm sido usadas em testes clínicos: retrovírus, adenovírus e vírus associado a adeno recombinante.

#### 2.1.1.1 Retrovírus

Os retrovírus são vetores que se caracterizam pela expressão estável e contínua devido à integração do genoma viral no cromossomo da célula hospedeira (Anderson, 1998). O vírus da Leucemia de Moloney (MLV) tem sido o mais usado nos testes clínicos. Estes vetores apresentam os genes virais relacionados à patogénia e replicação removidos, porém são mantidas seqüências regulatórias para realizarem empacotamento, transcrição reversa e integração do DNA no genoma das células alvo (Mann *et al.*, 1983).

As restrições para este sistema são:

- o MLV só transfecta células em divisão, pois ele somente integra o seu DNA ao cromossomo quando a membrana nuclear está desintegrada, evento que ocorre quando a célula está realizando mitose;

- a inserção do DNA próviral é inespecífica no genoma do hospedeiro, o que pode levar à ativação de oncogenes ou mesmo a inativação de genes celulares por inserção aleatória no interior de regiões codificantes ou regulatórias;

- a possibilidade da formação de um retrovírus competente de replicação (RCR) devido a sua propensão para a recombinação. Deve-se considerar que muitas células contêm retrovírus endógenos que podem recombinar informações genéticas e assim resultar na mobilização dos vetores terapêuticos que causem viremia crônica e subsequente formação de tumores malignos (Purcell *et al.*, 1996).

Naldine *et al.* (1996) construíram um vetor formado por uma quimera entre o HIV e MLV que apresentou a capacidade de transduzir em células quiescentes *in vivo*. O vetor lentiviral apresentou-se eficiente na transferência e integração do DNA no

cérebro de ratos adultos e manteve a expressão gênica por um longo período sem manifestar alguma patologia. Embora tenha se mostrado um bom vetor, os autores sugerem que, para testes clínicos em humanos, seria mais prudente desenvolver vetores derivados de lentivírus não humano, tais como vírus da imunodeficiência dos símios, vírus da imunodeficiência bovina ou vírus da anemia infecciosa eqüina.

#### 2.1.1.2 Adenovírus

Em geral, adenovírus humanos são responsáveis por doenças brandas no trato respiratório superior. O vírus apresenta uma dupla fita de DNA de 36 kilobases contendo genes que expressam mais de 50 produtos através de seu ciclo de replicação. Com a eliminação da região E1 do vetor, duas importantes características são adquiridas: obtém-se um espaço para a integração de genes terapêuticos e, na ausência da proteína E1a transativante, o vírus não pode replicar. Assim, depois da transfecção gênica, não ocorrerá disseminação viral. Esta primeira geração de vetores adenovirais demonstrou ser muito eficiente para transferir genes na maioria dos tecidos depois da administração *in vivo*. Em contraste com os retrovírus, estes vetores podem ser concentrados em altos títulos, podem transduzir em células que não se dividem e não se integram no DNA cromossomal do hospedeiro (Kay *et al.*, 1997).

Os adenovírus tiveram seu uso limitado devido:

- à descoberta de que a produção de baixos níveis das proteínas do vetor provoca uma forte resposta imunológica, tanto celular como humoral, que elimina as células transduzidas e inibe a administração repetida do vetor (Verma & Somia, 1997);

- e, principalmente, pela morte de um paciente após a administração de um vetor adenoviral na artéria hepática para o tratamento de deficiência de ornitina transcarbamilase (Reid *et al.*, 2002).

### 2.1.1.3 Vírus associado a adeno recombinante

Estes vetores contêm um pequeno genoma formado por uma fita simples de DNA. São compostos por dois genes (*cap* e *rep*), porém necessitam de genes adicionais para replicar, sendo normalmente utilizados os do adenovírus ou do herpes simplex vírus (Verma & Somia, 1997).

Estes vírus não parecem causar doença em humanos, podem infectar uma variedade de tipo de células e o DNA viral pode integrar-se ao cromossomo de humanos (Muzyczka, 1992). Ocorreu transdução em cérebro, músculo esquelético e fígado pela injeção direta no tecido quiescente. Estes vetores têm as desvantagens de somente conseguir empacotar DNA de pequenos tamanhos (3,5-4,0 kilobases de DNA) e o preparo do vetor é muito laborioso devido à natureza tóxica de produtos do gene *rep* e a necessidade de separá-lo de contaminantes, como adenovírus auxiliar (Verma e Somia, 1997).

### 2.1.1.4 Vetores virais não testados clinicamente em humanos

Há estudos da elaboração de vetores baseados em Epstein-Barr virus, simian virus 40 (SV40), papiloma e vírus da hepatite, porém ainda não foram testados clinicamente (Friedmann, 1997).

Além destes, o herpes simplex vírus (HSV) tem se destacado como um vetor atrativo para terapia gênica, principalmente nas doenças relacionadas ao sistema nervoso.

Burton *et al.* (2001) destacam os seguintes aspectos biológicos do HSV que são muito úteis para um vetor:

- vírus altamente infeccioso;

- transduzem e expressam transgenes eficientemente em células que não se dividem;

- apresentam ampla capacidade de inserção de genes exógenos (aproximadamente a metade dos 84 genes virais não é essencial para o crescimento em cultura de tecidos e podem ser substituídos por conjuntos de genes terapêuticos);

- o herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) recombinante com replicação defectiva pode ser preparado em altos títulos e purificado sem risco de contaminação com recombinantes do tipo selvagem;

- apresentam um comportamento latente que é explorado para a expressão estável e por longo tempo de transgenes terapêuticos em neurônios;

Existem registros demonstrando correção ou prevenção de importantes distúrbios neurológicos incluindo neurodegeneração (Yamada *et al.*, 1999), dor crônica (Wilson *et al.*, 1999), neuropatia periférica (Goins *et al.*, 1999) e glioma maligno (Moriuchi *et al.*, 2000).

Embora os resultados apresentados com vetores derivados do HSV-1 sejam promissores, ainda se buscam maiores garantias de segurança para iniciar os testes clínicos em humanos. Isto porque se registrou problemas de toxicidade como morte celular e resposta inflamatória após injeção intraparenquimal com um vetor mutante do HSV-1 (Howard *et al.*, 1998).

## 2.1.2 Métodos físicos

### 2.1.2.1 Eletroporação

A técnica de eletroporação foi determinada por Neumann *et al.* (1982) que estabeleceram um método de introduzir DNA através de poros formados na membrana celular pela aplicação de pulsos elétricos de alta voltagem. Este método permite a

entrada de macromoléculas de DNA e também pode ser realizado em um grande número de diferentes tipos celulares. Ele pode ser usado para a expressão transitória de genes clonados e para o estabelecimento de linhagens de células que carregam cópias integradas do gene de interesse. Porém, a eletroporação 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 (Neumann *et al.*, 1982), sendo necessário adaptar as condições para otimizar a sua eficiência.

#### 2.1.2.2 Microinjeção

Capechi (1980) desenvolveu a técnica da microinjeção do DNA diretamente no núcleo celular o que permite uma integração ocasional do DNA com o cromossomo, resultando em genes recombinantes. O número de células que podem ser transfectadas é limitado, porém o DNA não é exposto aos elementos do citoplasma, evitando a ação de endonucleases. Atualmente, esta técnica é usada principalmente para introduzir genes dentro de embriões para produção de animais transgênicos (Capechi, 1989).

#### 2.1.3 Métodos químicos

A primeira dificuldade de introdução do DNA para dentro da célula é a sua passagem pela membrana citoplasmática, já que ambos são carregados negativamente, repelindo-se. Deste modo, os métodos químicos inicialmente foram desenvolvidos baseando-se no uso de carreadores de carga positiva que interagem com o DNA, neutralizando a sua carga e formando um complexo que possibilita a sua passagem pela membrana.

### 2.1.3.1 Coprecipitação do DNA com fosfato de cálcio

A transfecção realizada pela coprecipitação do DNA com fosfato de cálcio (Graham & Van der Eb, 1973) foi inicialmente utilizada para auxiliar na introdução de vetores virais (DNA de adenovírus e SV40) em células aderentes. Após algumas adaptações verificou-se sua eficiência na transfecção de plasmídeos recombinantes para o interior de diferentes tipos de células eucarióticas. O tratamento de células com cloroquina (Luthman & Magnusson, 1983) e/ou com glicerol (Wilson & Smith, 1997) durante a transfecção demonstrou aumentar a quantidade de proteína expressada.

Embora esta técnica seja de fácil realização, ela apresenta uma baixa reprodutibilidade e necessita de uma alta quantidade de DNA para se obter um bom rendimento de transfecção. Orrantia & Chang (1990) utilizaram plasmídeos marcados radioativamente e verificaram que menos de 10% dos plasmídeos transfectados por fosfato de cálcio se encontravam intactos no núcleo e acima de 50% dos plasmídeos se encontravam degradados no citosol. A baixa reprodutibilidade é causada principalmente pela variação no tamanho e na forma do complexo de transfecção.

### 2.1.3.2 Dietilaminoetil-dextran (DEAE-dextran)

O dietilaminoetil-dextran (DEAE-dextran) foi originalmente usado como um facilitador para introduzir RNA de poliovírus dentro de células (Vaehri & Pagano, 1965). Este procedimento, com pequenas modificações, continua sendo usado para a transfecção de genomas virais e plasmídeos. Embora o mecanismo de ação de DEAE-dextran não seja conhecido, acredita-se que o polímero poderia ligar-se ao DNA e inibir a ação de nucleases e/ou ligar-se às células e promover endocitose do DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

A transfecção mediada por DEAE-dextran difere de fosfato de cálcio em três importantes aspectos (Sambrook *et al.*, 1989):

- é usada somente para a expressão transitória e não para a transformação estável de células;

- apresenta melhor eficiência de transfecção com as células de linha BSC-1, CV-1 e COS, mas é insatisfatória com muitos outros tipos de células, provavelmente porque o polímero é tóxico;

- menores quantias de DNA são usadas para a transfecção com DEAE-dextran do que com coprecipitação com fosfato de cálcio.

### 2.1.3.3 Lipossomos

Os lipossomos foram descritos originalmente por Bangham & Horne (1964) depois de verificarem através de microscopia eletrônica que fosfolipídios em solução formavam vesículas compostas de bicamadas concêntricas intercaladas por compartimentos de água. A característica típica dos lipídios que formam a bicamada é sua natureza anfifílica: uma extremidade polar que está covalentemente ligada a uma ou duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicos. Quando estes lipídios são expostos a um meio aquoso, interações entre eles próprios (interações hidrofílicas entre as extremidades polares e força de Van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonos) e com a água (efeito hidrofóbico) levaram a formação das bicamadas fechadas (Lasic, 1995).

Os lipossomos foram então estudados como modelos de membranas (Bangham *et al.*, 1965a; Bangham *et al.*, 1965b; Barchfeld *et al.*, 1985) e como veículos para o transporte de moléculas, tais como albumina (Barbanti-Brodano *et al.*, 1973), anticorpos (Blythman *et al.*, 1981), insulina (Miskimins & Shimizu, 1981), entre outras.

Baseado na habilidade de transportar macromoléculas, Ostro *et al.* (1978) e Dimitriadis (1978) demonstraram que os lipossomos poderiam complexar com um RNA mensageiro funcional e transportá-lo para dentro de células eucarióticas *in vitro*, ocorrendo a síntese da proteína esperada.

Diferentes composições de lipossomos passaram a ser estudadas quanto a sua eficiência de transfecção de RNA e DNA. Tais lipossomos foram formados por lipídios aniônicos, neutros, catiônicos ou combinações destes.

#### 2.1.3.3.1 Lipossomos formados por lipídios aniônicos

De acordo com Pagano & Weinstein (1978), lipossomos de carga negativa demonstram ótima fusão com as células. Assim, Fraley *et al.* (1979) utilizaram uma mistura de fosfatidilglicerol e fosfatidilcolina que são lipídios presentes na gema de ovo, para preparar lipossomos carregados negativamente. Estes lipossomos foram combinados com o plasmídeo pBR322 que carrega os genes de resistência à tetraciclina e ampicilina. Depois de submetido a um tratamento com DNaseI, o complexo lipossomo-DNA foi transferido para colônias da cepa SF8 de *Escherichia coli*. A transfecção foi eficiente, demonstrando que lipossomos poderiam ser usados para transfectar células procarióticas e que protegeram o DNA da ação de nucleases.

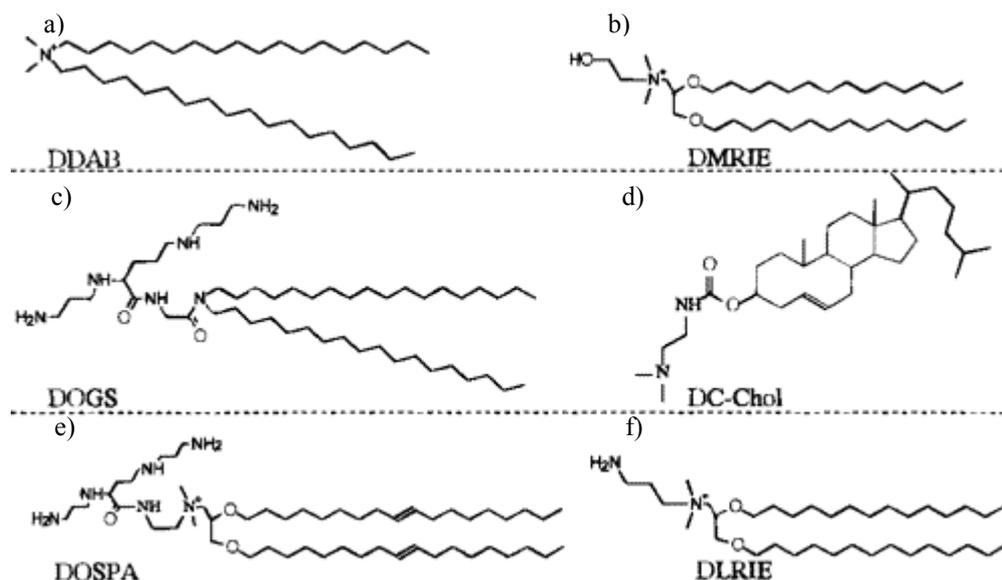
#### 2.1.3.3.2 Lipossomos formados por lipídios catiônicos

Felgner *et al.* (1987) desenharam e sintetizaram o lipídio catiônico cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), o qual, sozinho ou em combinação com fosfolipídios neutros, forma espontaneamente lipossomos multilamelares que ao serem sonificados, se tornam pequenas vesículas unilamelares. O DNA interage espontaneamente com DOTMA devido às interações iônicas entre o

grupo de carga positiva da molécula de DOTMA e o grupo fosfato de carga negativa do DNA.

A técnica apresentou-se simples, altamente reprodutível e efetiva para ambas expressões transitória e estável do DNA transfectado. Dependendo do tipo de célula, a lipofecção foi de cinco até cem vezes mais efetiva do que as técnicas de transfecção por fosfato de cálcio ou com DEAE-dextran.

A eficiência do transporte do DNA para dentro do citoplasma é dependente da proporção de carga positiva e negativa entre lipídio e DNA, pela composição do meio e, principalmente, pela composição do lipídio catiônico (Hofland *et al.*, 1996). Muitos lipídios têm sido estudados quanto a sua capacidade de transferência gênica. Eles variam de moncatiônicos, tais como cloreto de N-[1,2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (**DOTMA**) (Felgner and Ringold, 1989), trimetilamônio propano (**DOTAP**) (Leventis & Silvius, 1990), brometo de dimetildioctadecilamônio (**DDAB**) (Fig. 1a) (Rose *et al.*, 1991), 1,2-dioleoil-3- $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (**DC-Chol**) (Fig. 1d) (Farhood *et al.*, 1992) e N-[1(2,3-dimiristiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-(2-hidroxi)etil (**DMRIE**) (Fig. 1b) (Remy *et al.*, 1994), a policatiônicos, como 1,3-dioleoil-N-glicerol (**DOGS**) (Fig. 1c) (Behr *et al.*, 1989), lipopoli(L-lisina) (**LPLL**) (Zhou *et al.*, 1991) e N-[1(2,3-dimiristiloxi)propil acetil (**DOSPA**) (Fig. 1e) (Hawley-Nelson *et al.*, 1993). Embora estes lipídios tenham apresentado capacidade de transfectar DNA, não são todos os lipídios catiônicos que apresentam esta habilidade. Alguns apresentam atividade de inibição da proteína quinase C (PKC) o que os impossibilitam de transportarem eficientemente DNA (Farhood *et al.*, 1992).



**Figura 1** – Representação gráfica das estruturas dos lipídios catiônicos (Byk *et al.*, 1998). O DDAB e o DMRIE são monocatiônicos e apresentam dupla cadeia de hidrocarbonos (a e b); o DC-Chol é monocatiônico porém apresenta a região hidrofóbica derivada de colesterol (d) e o DOGS e DOSPA são policatiônicos e também apresentam dupla cadeia de hidrocarbonos (c e e).

Com exceção do lipossomo formado com DOGS, todas as outras formulações têm em comum um componente fosfolipídico neutro em adição ao lipídio catiônico. Felgner *et al.* (1994) demonstraram que a presença do lipídio neutro dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) na proporção molar de 1:1 com diferentes lipídios catiônicos foi cinco vezes mais ativa que formulações sem o lipídio neutro.

Hofland *et al.* (1996) obtiveram um complexo lipídio-DNA estável por 90 dias mantendo-o congelado ou em suspensão a 4°C. A centrifugação deste complexo produziu um sedimento que continha aproximadamente 90% de DNA e 10% de lipídio. A transfecção de células com o sedimento ressuspendido e o sobrenadante mostrou que a maioria da atividade da transfecção estava no sedimento e somente o sobrenadante apresentou-se tóxico. Assim obtiveram um complexo estável, capaz de ser estocado por um longo período, podendo ser concentrado sem perda na eficiência de transfecção e com toxicidade reduzida.

Verificando que a partir da ligação entre o lipossomo e o DNA também se obtinha a formação de agregados de estruturas heterogêneas, de diferentes tamanhos e que resultavam em mudanças nas características físicas do complexo, Bally *et al.* (1997) procuraram desenvolver um sistema em que a partir destes agregados, se obtivessem pequenas partículas homogêneas, bem definidas e com boas características carreadoras para transferência gênica. Para obter estas partículas, os agregados lipossomo/DNA foram submetidos a um processo de extração, utilizando solvente orgânico e água. Na interface destas duas fases e na fração orgânica se obteve um complexo lipídio-DNA hidrofóbico, onde o DNA apresentava-se ligado à extremidade catiônica do lipídio e a cadeia não polar na extremidade externa, dando as características hidrofóbicas. Os autores não demonstraram a eficiência de transcrição deste complexo formado.

You *et al.* (1999) verificaram um aumento de 20 vezes na eficiência de transfecção e nível de expressão ao adicionar protamina na solução com o DNA plasmideal antes da formação do complexo lipossomo-DNA. O lipídio catiônico utilizado foi o DDAB. As protaminas protegeriam o DNA da degradação por DNase e promoveriam o carregamento do DNA para o núcleo.

#### 2.1.3.3.3 Lipossomos formados por derivados de colesterol catiônicos

Em 1991, Gao & Huang prepararam lipossomos catiônicos à base de derivados de colesterol sendo compostos por três partes distintas: uma estrutura de colesterol (que substitui a cadeia de hidrocarbonetos dos lipídios catiônicos), uma extremidade com um grupo amino e uma região de ligação entre as duas estruturas anteriores. Este derivado era composto pelo DC-Chol (Figura 1d) e apresentou uma boa eficiência de transfecção e baixa toxicidade.

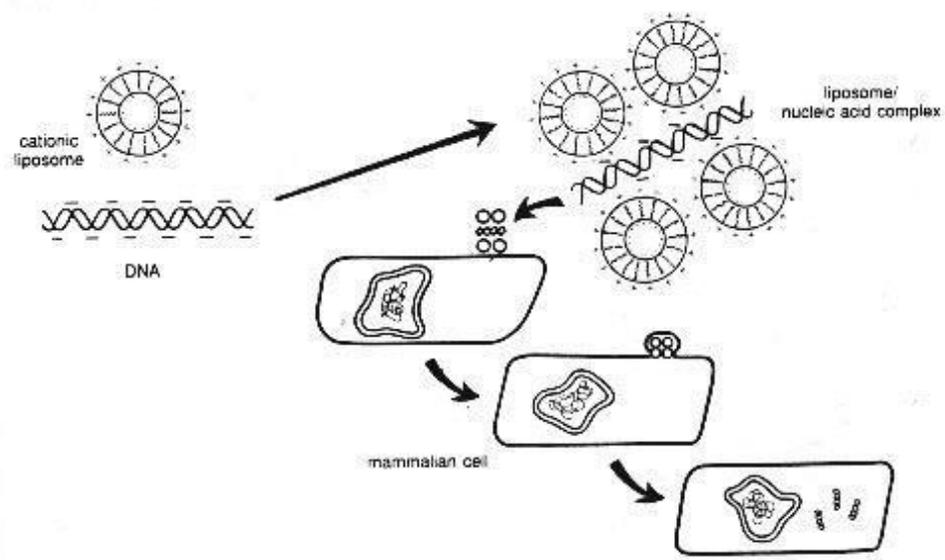
Okayama *et al.* (1997) testaram oito diferentes derivados de colesterol catiônicos e verificaram que o lipossomo formado pelo colesterol-3 $\beta$ -carboxiamidoetileno-N-hidroxiethylamina foi dez vezes mais eficiente que Lipofectin<sup>®</sup> (Gibco BRL) e três vezes mais eficiente que DC-Chol ao transfectar células NIH3T3 com o plasmídeo pGL3 que expressa a enzima luciferase.

Ghosh *et al.* (2000) trocaram a estrutura formada por éster na região de ligação do DC-Chol por uma estrutura formada por éter. O novo reagente apresentou-se estável em suspensão aquosa e também ocorreu um aumento de eficiência de transfecção, especialmente na presença de soro.

Devido as suas características de alta eficiência de transfecção e baixa toxicidade, os derivados de colesterol catiônico se tornaram muito úteis em experimentos que usam lipossomos catiônicos, sejam para avaliar os fatores que influenciam na transfecção bem como compreender os seus mecanismos de transporte de DNA (Nakanishi & Noguchi, 2001).

#### 2.1.3.3.4 Mecanismo de transfecção por lipossomos

Felgner e Ringold (1989) descreveram um provável mecanismo de ação para os reagentes com lipossomos. Eles hipotetizaram que o complexo DNA/DOTMA consiste de quatro lipossomos em associação com o DNA. Os lipossomos com o diâmetro de 250 nm contêm aproximadamente 2500 moléculas lipídicas. Metade das moléculas são carregadas positivamente (a outra metade é formada por DOPE que é um lipídio neutro). Um plasmídeo de 2500 pares de bases apresenta 5000 cargas negativas, assim, aproximadamente quatro lipossomos seriam necessários para neutralizar a carga negativa do plasmídeo. Os lipossomos carregando o DNA se fusionariam com a membrana celular liberando o DNA para o citoplasma (Figura 2).



**Figura 2** - Mecanismo de transfecção proposto por Felgner e Ringold (1989). Uma fita de DNA linear liga-se a quatro lipossomos. Os lipossomos se fusionam com a membrana celular e o DNA é liberado para o citoplasma.

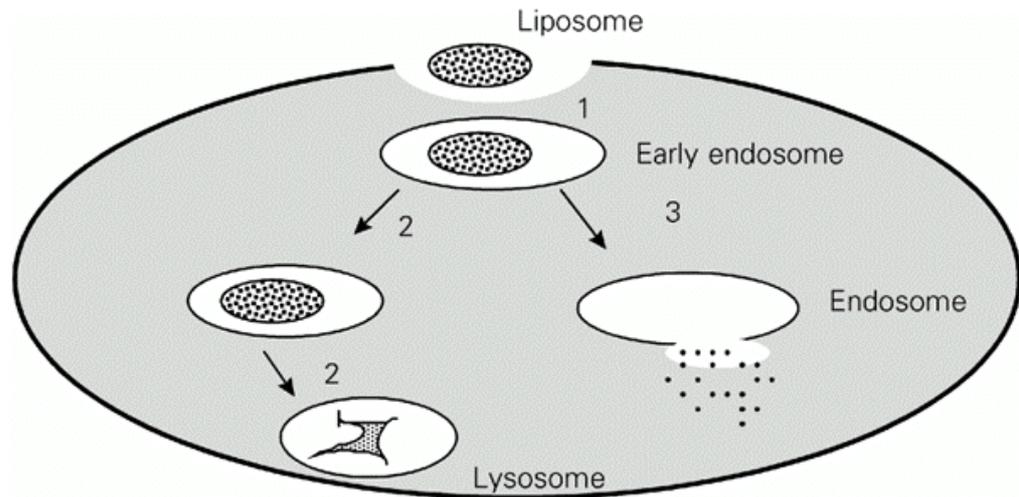
No entanto, na prática, a quantidade ótima de DOTMA para neutralizar o plasmídeo é praticamente a metade do total. Por isto, este modelo falha ao considerar a possibilidade da carga lipídica estar distribuída igualmente entre as bicamadas interna e externa e também em não considerar as implicações das diferenças estruturais entre DNA linear e DNA circular super enrolado. Neste estado compactado, as dimensões totais do DNA são bem menores, restringindo o número de cargas que o lipídio deveria neutralizar (Smith *et al.*, 1993).

Utilizando técnicas de microscopia eletrônica, Lappalainen *et al.* (1997) acompanharam o transporte de oligonucleotídeos complexados com lipossomos de diferentes cargas (monocatiônicos e policatiônicos) dentro da célula. O estudo mostrou que ambos complexos foram rapidamente internalizados por endocitose, os oligonucleotídeos foram liberados no citosol e transportados para a área perinuclear.

Nakanishi & Noguchi (2001) realizaram uma série de estudos para identificar fatores que influenciam a endocitose e para comprovar que os lipossomos não se fusionam com a membrana celular e sim com a membrana endocítica após atingir um pH favorável. Eles verificaram que na presença de *wortmannin*, um inibidor de endocitose, a transfecção do plasmídeo pGL3 por lipossomos foi drasticamente inibida. Utilizando Microscopia de Força Atômica (MFA) verificaram que complexos lipossomo-DNA de 0,4 a 1,4  $\mu\text{m}$  foram os mais efetivos para a transfecção por endocitose. Para determinar como o DNA é liberado do complexo no endossoma foi usada microscopia de varredura por laser confocal que permite diferenciar DNA do lipossomo por estarem marcados por diferentes substâncias fluorescentes. Quando adicionaram nigericina, uma substância que dissipa o gradiente de pH do citoplasma, não ocorreu a separação do complexo DNA-lipossomo, demonstrando a necessidade de um pH ideal para que ocorra a fusão entre o lipossomo e a vesícula endocítica e assim permita a liberação do DNA no citosol.

Este mecanismo proposto de endocitose do complexo lipossomo-DNA e fusão do lipossomo com a membrana endocítica elucidada também a função do DOPE em aumentar a eficiência de transfecção. Os lipossomos compostos por DOPE apresentam a característica de sensibilidade ao pH ácido (Litzinger & Huang, 1992). Quando o lipossomo-DNA é internalizado num endossoma, este apresenta um gradiente de pH interno que vai acidificando de acordo com sua maturação. Ao atingir um pH interno de 6,0, o lipossomo se desestabiliza e se funde com a membrana endocítica liberando o DNA plasmídeo no citosol. Caso o lipossomo não fosse sensível a este pH, ele permaneceria protegendo o DNA e ambos chegariam ao último compartimento endocítico que é o lisossoma. O lisossoma é o principal compartimento lítico e nesse

meio, tanto os lipossomos como o DNA plasmideal seriam degradados, podendo chegar somente uma pequena quantidade de DNA no núcleo (Ropert, 1999) (Figura 3).



**Figura 3** - Representação da internalização e do trajeto no citoplasma celular de um lipossomo pH-sensível e de um lipossomo pH-não sensível (Ropert, 1999). 1-Processo de endocitose: lipossomo dentro de um endossoma inicial; 2 – Degradação do lipossomo não sensível ao pH e do seu conteúdo num lisossoma; 3 – Desestabilização do lipossomo pH-sensível e liberação de seu conteúdo dentro do citosol.

#### 2.1.3.4 Moléculas anfifílicas faciais

Walker *et al.* (1998) testaram a utilização de moléculas anfifílicas faciais, as quais se caracterizam por apresentar uma superfície polar e uma superfície não polar. Elas se diferenciam dos lipídios catiônicos por apresentarem as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas localizadas ao longo do eixo longitudinal das moléculas. Sintetizando uma série de componentes contendo uma face de ácido biliar (hidrofóbica) e outra de cadeia de poliamina (hidrofílica), verificou-se que estas moléculas ligaram-se ao DNA e apresentaram um aumento na transfecção celular de ambos DNA plasmideal e oligonucleotídeos. Foi igualmente demonstrado que promoveram a expressão do gene plasmideal em vários tecidos depois da sua introdução em animais.

## 2.2 Transferência gênica

A transferência gênica apresenta importantes aplicações tanto *in vitro* como *in vivo*.

### 2.2.1 Transfecção *in vitro*

A transfecção *in vitro* facilita o estudo e o controle da expressão de genes. Os experimentos de transfecção são inicialmente realizados *in vitro* para que se avaliem os fatores envolvidos, a eficiência de transfecção e a toxicidade. Sambrook *et al.*, (1989) citam diferentes aplicações para a expressão de proteínas a partir de genes eucarióticos clonados:

- para confirmar a identidade de um gene clonado pelo uso em ensaios imunológicos ou funcionais, detectando a proteína codificada;
- para expressar genes que codificam para proteínas que requerem modificações após a tradução, tal como glicosilação ou processamento proteolítico;
- para produzir grande quantidade de proteínas de interesse biológico que são normalmente inviáveis e em quantidades limitadas nas condições naturais;
- para estudar a biossíntese e o transporte intracelular de proteínas após expressão em vários tipos de células;
- para elucidar as relações entre estrutura – função por análise das propriedades de proteínas normais e mutantes;
- para identificar elementos da sequência de DNA envolvidos no controle da expressão gênica.

## 2.2.2 Transfecção *in vivo*

A possibilidade de transfectar genes em células *in vivo* permite que proteínas de interesse sejam expressas no organismo. Baseado neste princípio, estão sendo desenvolvidas tecnologias para a utilização de oligonucleotídeos, vacinas de DNA e para terapias gênicas.

### 2.2.2.1 Transporte de oligonucleotídeos

Zamecnik & Stephenson (1978) adicionaram uma seqüência de 13 nucleotídeos complementar às seqüências pré-terminais 3' e 5' do RNA do vírus sarcoma de Rous, em uma cultura de células de fibroblasto de embrião de galinha infectada com o vírus. Como conseqüência, ocorreu a inibição da replicação viral e da transformação das células através de uma hibridização por competição. Assim foi sugerida a utilização dos oligonucleotídeos *antisense* (AS-ODNs) desenhados para hibridizar com um RNAm específico ou com seqüências de DNA dupla-fita como agentes terapêuticos contra infecções virais e câncer.

Porém, vários fatores limitavam a aplicação de AS-ODNs, tais como estabilidade, afinidade, especificidade e transporte celular (Wagner, 1994). Então, análogos de ODNs foram desenvolvidos visando melhorar tais limitações: Stein *et al.* (1991) trocaram o átomo de oxigênio da ligação fosfodiéster por um enxofre formando o fosforotionato ODN. Embora este composto formado tenha apresentado maior resistência à ação das nucleases (Stein & Cheng, 1993), eles tiveram diversos efeitos não específicos, incluindo redução da hibridização (Ghosh *et al.*, 1991) e alteração na morfologia e proliferação celular (Yaswen *et al.*, 1993).

Buscou-se a utilização de um sistema carreador que protegesse o AS-ODN, aumentando a sua efetividade. Lipossomos formados por fosfatidilcolina demonstraram

ser eficientes transportadores de AS-ODNs ao mesmo tempo em que aumentaram a sua estabilidade no meio de cultura (Thierry & Dritschilo, 1992). Lappalainen *et al.* (1994) demonstraram que os ODNs são transportados mais rápido e eficientemente na presença de lipossomos, verificando-se ODNs intactos no núcleo e no citoplasma de células CaSki (células de linhagem de câncer cervical humano) somente quando transfectados com lipossomo.

#### 2.2.2.2 Vacinas de DNA

As vacinas de DNA consistem na introdução *in vivo* de genes que codificam para proteínas imunodominantes do patógeno. O gene é transportado para o organismo do hospedeiro por um vetor plasmídeo não replicante, o qual é internalizado por células-alvo e estas sintetizam a proteína que levará ao estímulo de uma resposta imune (Hasse & Whitton, 1996).

Wolff *et al.* demonstraram em 1990 que a injeção de RNA ou DNA puros diretamente no músculo esquelético de camundongo resultou em uma expressão significativa do gene que expressa a  $\beta$ -galactosidase nas células musculares.

Tang *et al.* (1992) demonstraram que se poderia obter uma resposta imune humoral através da inoculação de um gene codificante para o hormônio de crescimento humano. A rota de inoculação foi intradérmica, utilizando um sistema de biobalística, onde partículas de ouro cobertas pelo plasmídeo contendo o gene de interesse são bombardeadas diretamente para o citoplasma das células dérmicas e epidérmicas hospedeiras.

Procurando avaliar se a injeção de DNA levava a uma resposta imune neutralizante e específica frente a patógenos, Wang *et al.* (1993) realizaram a injeção

intramuscular (i.m.) de um plasmídeo contendo o gene que codifica para a glicoproteína precursora gp160 do envelope do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Entre os resultados obtidos, foi verificada a presença de anticorpos anti gp160, os quais inibiram a formação de sincício que é provocado pela infecção viral em células *in vitro*. Além da neutralização, ocorreu lise de células que expressavam o envelope, devido a uma resposta citotóxica. Demonstrando que por esta estratégia se obtém, tanto uma resposta imune humoral, como celular frente a um patógeno viral.

Diferentes vias de inoculação do DNA foram avaliadas por Fynan *et al.* (1993). Nesse modelo experimental, a vacina consistiu de 100 µg de DNA plasmideal designado para expressar uma glicoproteína hemaglutinina do vírus Influenza. As vias que apresentaram melhor eficácia frente ao desafio com o vírus Influenza foram as vias intramuscular e intravenosa, onde observou-se a maior porcentagem de animais que sobreviveram ao desafio e estes desenvolveram apenas sinais leves da doença. Depois, em ordem decrescente de eficiência de proteção foram as vias intranasal, intradérmica e subcutânea que tiveram um número maior de óbitos e os sobreviventes apresentaram sinais severos de Influenza. Os camundongos inoculados via intraperitoneal não desenvolveram proteção, sendo que nenhum dos animais sobreviveu ao desafio. Neste trabalho, também foi avaliado o sistema de inoculação por biobalística que demonstrou ser o método mais eficiente de todos. Com apenas 0,4 µg de DNA obteve-se 95% de sobreviventes.

Embora o método por biobalística seja mais eficiente com pequena quantidade de DNA, a injeção i.m. tem consideráveis vantagens. É considerada mais rápida e mais fácil de se aplicar, o custo de aquisição de um sistema de inoculação por bombardeamento é mais alto que a compra de seringas e acessórios para a inoculação i.m. (Barry e Johnston, 1997).

Davis *et al.* (1993) realizaram uma série de estudos para verificar os fatores que afetam a eficiência de transfecção e estabilidade de expressão pela inoculação de vacina de DNA via i.m. Verificou-se que realizando uma pré-injeção de uma solução hipertônica de sucrose ou de bupivacaina (anestésico local) há melhora na distribuição das substâncias injetadas e resulta numa menor variação da expressão do gene. A transferência gênica é dez vezes mais eficiente em músculo em regeneração do que no músculo normal (Davis *et al.*, 1994). Mesmo que a eficiência de transfecção seja baixa em músculo normal, ambas respostas imunes humoral e mediada por células foram obtidas, sendo que elas foram dependentes da dose de DNA aplicado (Davis *et al.*, 1995).

Verificou-se que a necessidade de altas doses de DNA puro para a inoculação intramuscular é devido a sua degradação por nucleases intersticiais. Baseando-se em estudos de sistemas carreadores de DNA que aumentam a sua eficiência de transfecção *in vitro*, buscou-se adaptar estas técnicas para a aplicação *in vivo*. Pode-se destacar os seguintes sistemas de transporte de DNA:

- **microesferas de alginato biodegradável:** alginato de sódio é um polissacarídeo que pode ser facilmente transformado em uma sólida matriz com a adição de cátions divalentes. Micropartículas de alginato são seguras para o uso em animais e elas têm sido usadas para encapsular proteínas purificadas (Bowersock *et al.*, 1999) e vírus (Hilbert *et al.*, 1999). A imunização oral de animais com microesferas contendo proteínas imunogênicas levaram a resposta imune humoral (mucosa e sistêmica) e mediada por células. Aggarwal *et al.* (1999) demonstraram que microesferas de alginato poderiam ser usadas para o encapsulamento, transporte e expressão de DNA plasmideal. Em seu trabalho, camundongos foram inoculados com microesferas de alginato contendo DNA plasmideal e adenovirus bovino tipo 3. Como

resultado ocorreu um aumento significativo da expressão transgênica quando comparado aos camundongos que foram inoculados com microesferas contendo somente o DNA plasmideal. O aumento da expressão gênica devido à presença do adenovírus ocorreu porque estes rompem os endossomas antes que se fusionem com lisossomas, inibindo a degradação do DNA por enzimas lisossomais (Curiel *et al.*, 1991).

- **Lipossomos:** Gregoriadis *et al.* (1997) demonstraram pela primeira vez que a imunização intramuscular de camundongos com pRc/CMV HBS (codifica a região S do antígeno de superfície de hepatite B) envolvidos por lipossomos aumentou tanto a imunidade celular como a humoral quando comparados com DNA puro. Foram gerados títulos cem vezes maiores de IgG1 e níveis aumentados de IFN- $\gamma$  e IL-4. A imunização com DNA plasmideal por lipossomo evita a necessidade do envolvimento das células musculares, facilitando sua captação pelas células apresentadoras de antígenos (APC) que se infiltram no sítio da inoculação ou pela drenagem aos linfonodos locais e, ao mesmo tempo, protegem o DNA da ação das nucleases (Gregoriadis *et al.*, 1996).

#### 1.2.2.2.3 Terapia gênica

A terapia gênica pode ser definida como uma estratégia de tratamento que se baseia na introdução de genes em células do organismo com o objetivo de redução ou eliminação da doença (Bally *et al.*, 1997). Estas doenças são causadas por mutações no genoma celular que levam a uma perda de função do órgão ou tecido. O conceito envolve o transporte do ácido nucleico para células alvo em um esforço para alterar a produção de uma proteína específica, onde mudanças na expressão resultarão em um benefício terapêutico.

De acordo com Friedmann (1997), existem duas formas de realizar-se a terapia gênica:

- ***ex vivo***: as células são removidas fisicamente do paciente, transfectadas *in vitro* com o vetor que apresenta o gene de interesse e depois de transformadas são novamente administradas ao paciente. Este procedimento é geralmente realizado com células sanguíneas.

- ***in vivo***: o vetor é transfectado diretamente no tecido doente. Como exemplos, a infecção de vetores de adenovirus na traquéia e brônquios de pacientes com fibrose cística e a injeção de um vetor contendo o gene que expressa a distrofina diretamente no músculo de pacientes com distrofia muscular.

Spradling & Rubin (1982) realizaram o primeiro sistema terapêutico eficiente tendo como modelo a *Drosophila melanogaster*. Foi utilizado um elemento genético de transposição, o fator P, que transferiu um gene normal para embriões que apresentavam um defeito genético na cor dos olhos. O gene transferido codifica para uma enzima que produz a cor de olhos vermelha do tipo selvagem de *Drosophila*. O resultado é que as moscas tratadas adquiriram a coloração normal dos olhos.

Hammer *et al.* (1984) registraram a primeira cura por terapia gênica em mamíferos. Camundongos de uma cepa que apresenta redução de níveis séricos de hormônio do crescimento receberam um gene que codifica para o hormônio de crescimento de rato. A deficiência em hormônio de crescimento foi corrigida e os animais cresceram rapidamente. O problema é que o gene não foi controlado apropriadamente, resultando em gigantismo. Os camundongos ficaram com até uma vez e meia o tamanho de camundongos normais.

Duas crianças com quadro de imunodeficiência combinada severa devido ao defeito genético na enzima catabólica adenosina deaminase (ADA<sup>-</sup> SCID) foram

submetidas à terapia gênica por um protocolo desenvolvido por Blaese *et al.* (1990). Células T dos pacientes foram separadas do sangue, proliferadas em cultura, transfectadas com um vetor retroviral que apresentava o gene da ADA e então reintroduzidas nos pacientes depois de 9 a 12 dias. Depois de quatro anos de acompanhamento, o número de células T sanguíneas estava normalizado, bem como a resposta imune celular e humoral. O tratamento gênico durou dois anos, mas o vetor integrou e a expressão gênica de ADA em células T persistiu. Para esta doença, a terapia gênica foi segura e efetiva (Blaese *et al.*, 1995).

Uma das limitações da transfecção direta do DNA em células no organismo era a falta de especificidade com as células-alvo. Utilizando como vetor um retrovírus murino, Kasahara *et al.* (1994) inseriram um gene que codifica para a eritropoietina (um hormônio polipeptídico) junto com parte do gene *env* que contem a região que codifica para a glicoproteína de superfície (gp70) do vírus da leucemia murina Moloney. Como resultado, este vírus murino que apresentava a característica de ser ecotrópico, ou seja só infectava células de origem murina, passou a ser também infeccioso para células humanas que apresentam o receptor da eritropoietina. Este tipo de seleção de tecido alvo por meio de interações receptor-ligante foi o grande passo para se realizar a terapia gênica *in vivo*.

De acordo com o RAC (*Recombinant DNA Advisory Committee*, pertencente ao *Office of Biotechnology Activities*, do *National Institutes of Health*), órgão oficial que regulamenta e autoriza a aplicação de ensaios de terapia gênica nos Estados Unidos (EUA), até fevereiro de 2003 registravam-se 509 protocolos clínicos utilizando técnicas de transferência gênica nos EUA (OBA, 2003). Na Tabela 1, adaptada de Verma & Somia (1997), pode-se verificar as doenças em que estão sendo realizados testes clínicos terapêuticos por terapia gênica.

**Tabela 1** – Doenças que estão em testes clínicos terapêuticos por terapia gênica (adaptada de Verma & Somia, 1997)

Origem	Doença	Defeito	Células alvos
Genética	Imunodeficiência combinada severa (SCID/ADA)	Adenosina deaminase (ADA) em 25% dos pacientes com SCID	Células da medula óssea ou linfócitos T
	Hemofilia A	Deficiência Fator VIII	Fígado, músculo, fibroblastos ou células da medula óssea
	Hemofilia B	Deficiência Fator IX	Fígado
	Hipercolesterolemia	Deficiência do receptor para lipoproteína de baixa densidade	Fígado
	Fibrose cística	Falta de transporte de sal no epitélio do pulmão; perda do gene <i>CFTR</i> .	Vias aéreas do pulmão
	Hemoglobinopatias	Defeitos estruturais nos genes $\alpha$ - ou $\beta$ -globina	Células da medula óssea que dão origem aos eritrócitos
	Talassemia		
	Anemia da célula <i>sickle</i>		
	Doença de Gaucher	Defeito na enzima glucocerebrosidase	Células da medula óssea, macrófagos
Deficiência $\alpha_1$ - antitripsina: enfisema genético	Falta de $\alpha_1$ - antitripsina	Células do fígado ou pulmão	
Adquirida	Câncer	Muitas causas	Variedade de células cancerosas, fígado, cérebro, pâncreas, rim
	Doenças Neurológicas		Injeção direta no cérebro, neurônios, células da Glia, células de Schwann
	Cardiovascular	Restinoses, arterioescleroses	Artérias, células do endotélio vascular
	Doenças Infecciosas	AIDS, hepatic B	Células T, fígado, macrófagos

A maioria dos protocolos de terapia gênica é baseada no uso de vetores virais. Mesmo que se tenham buscado desenvolver vetores seguros, ainda existem problemas na segurança e na produção de vetores virais, tais como:

- mutações e recombinação no genoma de vetores retrovirais;
- desenvolvimento de resposta imune contra proteínas de vetores originados de adenovírus e HSV-1.

Estas considerações têm estimulado o desenvolvimento de métodos não-virais para a transferência de genes terapêuticos (Friedmann, 1997). Kay *et al.* (1997) destacam vantagens do uso de lipossomos catiônicos em relação aos vetores virais na terapia gênica:

- complexos lipossomo-DNA são mais fáceis de preparar e não há um limite para o tamanho de genes que podem ser transportados;
- como este sistema não é formado por proteínas, ele pode desenvolver uma fraca resposta imunológica que não afetaria em futuras reaplicações;
- há pouco risco de gerar formas infecciosas ou induzir mutações oncogênicas porque os genes transportados apresentam baixa eficiência de integração, não replicam e nem recombina.

### **2.3 Aplicações em Medicina Veterinária**

Na medicina veterinária, as aplicações baseadas em métodos de transfecção gênica têm sido ampliadas, tais como:

#### **2.3.1 Vacina de DNA**

Genes codificantes de proteínas de diferentes patógenos, como vírus da influenza das galinhas (Fynan *et al.*, 1993), vírus da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (Pirzadeh & Dea, 1998), herpesvírus bovino tipo 1 (van Drunen *et al.*, 1998),

*Taenia ovis* (Rothel *et al.*, 1997), parvovírus canino (Jiangue *et al.*, 1998) induziram uma resposta imune protetora após a vacinação com DNA.

Para otimizar a imunização com vacinas de DNA para agentes de interesse veterinário, os estudos não tem sido somente concentrados no transporte de DNA para dentro do núcleo, mas também em obter uma interação entre a expressão de antígenos e apresentação destes para as células do sistema imune. Por isso, métodos de transporte químico, mecânico e elétrico estão sendo adaptados para o uso em vacinas (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 2001).

A utilização de bombardeamento de DNA intradérmico, que apresenta ampla eficácia em humanos, encontra um fator limitante nos animais de grande porte: a pele queratinizada. Este problema pode ser contornado quando o DNA é transportado quimicamente, tal como a utilização de lipídios catiônicos (Schaffer & Lauffenburger, 1998).

Babiuk *et al.* (2003) destacam que uma das principais vantagens de vacinas de DNA é que elas podem induzir resposta imune em neonatos mesmo na presença de anticorpos passivos. Isto foi comprovado no trabalho de van Drunen Littel-van den Hurk *et al.* (1999) quando eles imunizaram bovinos neonatos com DNA que codificava para uma glicoproteína de superfície do herpesvírus bovino tipo I, obtendo uma imunização efetiva mesmo com a presença de anticorpos maternos.

### 2.3.2 Terapia gênica

Lozier *et al.* (1994) transfectaram um conjugado contendo adenovirus-polilisina-luciferase e o gene codificante para o fator IX da coagulação em células primárias originárias de cães com hemofilia B. A transfecção resultou na expressão do fator IX por mais de 2 semanas *in vitro* nas células de fibroblastos obtidas de cães com hemofilia. Herzog *et al.* (1999) e Snyder *et al.* (1999) apresentaram métodos que

corrigiram a hemofilia B canina *in vivo* utilizando adenovírus como vetor de expressão. A terapia gênica também está sendo estudada no tratamento de doenças oncogênicas. Quintin-Colonna *et al.* (1996) aumentaram a sobrevivência de cães e gatos apresentando melanoma e fibrossarcoma, respectivamente, ao tratá-los (além da cirurgia e radioterapia) com repetidas injeções locais de células Vero xenogênicas secretando altos níveis de interleucina-2. Além do efeito anti-tumoral, este procedimento apresentou-se seguro frente à análise toxicológica. Ciftci & Trovitch (2000) destacaram que doenças comuns entre animais e humanos, tais como fibrose cística, hipercolesterolemia, diabetes, doenças coronárias, apresentam estudos avançados na medicina humana que podem ser adaptadas para a terapia de animais.

### 2.3.3 Obtenção de animais transgênicos como modelos experimentais para doenças humanas

Camundongos transgênicos têm sido construídos, permitindo a sua utilização como modelos experimentais para o estudo de doenças humanas, tais como: doenças causadas por *prions* (Telling *et al.*, 1994), neurodegeneração (Driscoll & Gerstbrein, 2003), tumores tímicos (Kikuchi *et al.*, 2002), oligodendroglioma (Weiss *et al.*, 2003), patologias pancreáticas (Clerc *et al.*, 2002) e salmonelose entérica (Salzman *et al.*, 2003).

## 2.4 Teoria de um modelo proposto para a realização de transferência de genes e oligonucleotídeos

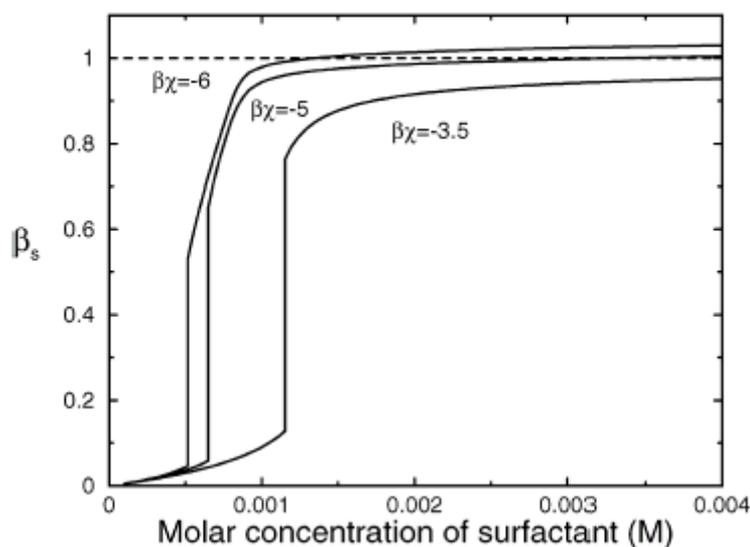
Kuhn *et al.* (1999) desenvolveram uma teoria de utilização de lipídios catiônicos, os quais seriam capazes de formar um complexo neutro ou até inverter a carga do DNA sem a formação de lipossomos.

O sistema é composto por uma solução aquosa onde são adicionados cloreto de sódio (NaCl), DNA e o lipídio catiônico. Em uma solução aquosa, os grupos fosfatos das moléculas de DNA tornam-se ionizados resultando em uma rede de carga negativa, o sal é completamente ionizado formando um igual número de cátions e ânions e os lipídios catiônicos também se dissociam produzindo ânions e cadeias poliméricas com uma extremidade catiônica. O objetivo é que estas extremidades catiônicas se liguem com os fosfatos aniônicos do DNA, para neutralizar ou até inverter a carga deste complexo e, assim, evitar que o DNA seja repellido pela membrana celular. Porém existem três fatores principais que influenciam a formação de complexos entre DNA e lipídios: a entropia, as forças de interação entre as partículas lipídicas (energia hidrofóbica) e as interações eletrostáticas entre todos os íons presentes. Para entender estes fatores, é necessário calcular a energia livre da solução, sendo que, a energia livre mínima corresponde ao estado de equilíbrio termodinâmico. Em particular, busca-se a concentração de lipídios catiônicos para a qual a entropia do meio seja baixa suficiente para que os lipídios tendam a se ligar ao DNA devido às interações eletrostáticas. Para pequenas concentrações de lipídios catiônicos, poucas moléculas anfífilas se associam com o DNA e a entropia domina, porém ao atingir uma concentração crítica, as interações eletrostáticas se tornam dominantes e o sistema forma um complexo em que a carga de DNA é quase que completamente neutralizada pelos anfífilos associados. Se a concentração das moléculas anfífilas continuar sendo aumentada, favorece para que mais moléculas do lipídio se associem com um fosfato, levando à inversão da carga do complexo.

Na Figura 4 podemos verificar a previsão teórica para este modelo. As condições utilizadas são: o DNA é formado por 220 pares de bases e a sua concentração é de 2  $\mu\text{M}$ . A concentração do NaCl é de 18 mM. O  $\beta_s$  é a fração de ligação efetiva da

molécula anfifílica, ou seja, na concentração molar do surfactante em que o  $\beta_s = 1$ , a carga do DNA torna-se completamente neutralizada pelo surfactante.

*P.S. Kuhn et al. / Physica A 274 (1999) 8–18*



**Figura 4** – Gráfico demonstrando a previsão teórica para o modelo de Kuhn *et al.* (1999). Os dados foram obtidos para um DNA formado por 220 pares de bases e com concentração de 2  $\mu$ M. A concentração do NaCl é de 18 mM. O  $\beta_s$  é a fração de ligação efetiva da molécula anfifílica e o  $\beta\chi$  representa o grau de hidrofobicidade da molécula anfifílica.

Pelo gráfico, podemos ver a ocorrência de uma transição termodinâmica de primeira ordem. Isto significa que aumentando gradualmente a concentração molar do lipídio catiônico, ocorre uma transição descontínua onde a carga do DNA é neutralizada pelos lipídios catiônicos. Esta transição é cooperativa, o que significa que muitas moléculas lipídicas se ligam ao DNA simultaneamente. O  $\beta\chi$  é um parâmetro relacionado com o grau de hidrofobicidade da molécula anfifílica. Quanto maior o valor absoluto de  $\beta\chi$ , maior é a hidrofobicidade. No gráfico, pode-se verificar que as moléculas mais hidrofóbicas necessitam de uma menor concentração para neutralizar o DNA e a inversão de carga ( $\beta_s$  é superior ao valor 1) ocorre mais próxima do ponto de transição da ligação da molécula com o DNA.

De acordo com esta teoria, a inversão de carga pode ocorrer com uma baixa concentração de lipídios catiônicos se estes forem suficientemente hidrofóbicos. Altas concentrações de lipídios (como é necessário para a formação de lipossomos) são tóxicas para as células. Com a utilização de uma baixa concentração de lipídios catiônicos para a transfecção, haveria uma influência direta na diminuição da citotoxicidade. Este modelo ainda não havia sido desenvolvido experimentalmente para determinar qual a sua eficiência de transfecção.

Os objetivos deste trabalho de mestrado foram:

- desenvolver um sistema de transfecção para comprovar experimentalmente esta teoria;
- avaliar a eficiência de transfecção com diferentes parâmetros: hidrofobicidade da molécula anfifílica, tipo de célula a ser transfectada e estrutura do DNA;
- comparar o método de transfecção desenvolvido no trabalho com o método realizado com lipossomos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivos celulares

Os testes de transfecção foram realizados nas células de linhagem VERO [ATCC/CCL-81 – células provenientes de rim de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano)] e em cultivos secundários de células de pulmão de feto bovino (PFB) e de membrana sinovial ovina (MSO) provenientes do estoque de células do laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária, UFRGS.

##### 3.1.1 Cultivos de Células de Linhagem

As células de linhagem VERO foram cultivadas em meio Eagle modificado de Dulbecco (D-MEM – SIGMA, nº D1152), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para sua multiplicação e com 2% de SFB para sua manutenção.

##### 3.1.2 Cultivos Primários e Secundários

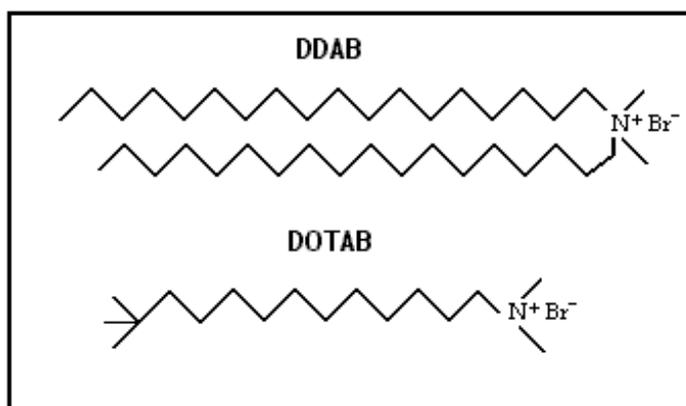
As células de cultivo secundário foram obtidas após a realização do cultivo primário de pulmão de feto bovino (PFB) e de membrana sinovial ovina (MSO) pela técnica de explante como descrita por Crawford *et al.* (1980). O cultivo primário foi mantido em D-MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após o preenchimento da garrafa de cultura, as células foram individualizadas com tripsina versene 0,05% (VT) (Anexo 2) e repicadas para novos frascos dando origem aos cultivos secundários.

Ambos cultivos de linhagem e secundários foram passados para frascos de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> e 150cm<sup>2</sup>, sucessivamente, a fim de se obter um estoque de

células. Quando as células completavam a superfície do frasco de 150 cm<sup>2</sup>, elas eram individualizadas, centrifugadas à 1200 g por 10 min, ressuspensas em meio de congelamento composto por 40% de D-MEM, 50% de SFB e 10% de DMSO, mantidas por 24 h à -20°C e depois congeladas em nitrogênio líquido.

### 3.2 Lipídios Catiônicos

Foram utilizados dois lipídios catiônicos: o DDAB e o brometo de dodeciltrimetil-amônio (DOTAB). As suas composições químicas são respectivamente C<sub>38</sub>H<sub>80</sub>NBr e C<sub>15</sub>H<sub>34</sub>NBr e estão representadas na Figura 5. A principal diferença entre estes dois lipídios é que o DDAB apresenta duas cadeias de hidrocarbonos, sendo uma molécula mais hidrofóbica em relação ao DOTAB. Eles foram obtidos comercialmente (Sigma).



**Figura 5** – Estrutura do lipídio catiônico DDAB e do surfactante DOTAB que foram utilizados para a transfecção.

O DDAB foi dissolvido em etanol absoluto e o DOTAB em água destilada estéril.

### 3.3 Lipossomos

Como padrão para os testes de transfecção, foi utilizado o reagente Lipofectamine™ (Invitrogen). Ele é composto por lipossomos formados pelos lipídios DOSPA e DOPE na proporção 3:1 e concentração de 2 mg/mL.

### 3.4 DNA para a transfecção

Para a transfecção *in vitro*, foi utilizado o plasmídeo pCH110 (Pharmacia). O pCH110 é um plasmídeo de 7128 pb que contem o gene *lacZ* que expressa a enzima  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal).

#### 3.4.1 Obtenção e purificação do plasmídeo

Para obtermos o DNA plasmideal puro e em grande quantidade, foram realizadas as etapas descritas a seguir:

##### 3.4.1.1 Transformação das bactérias XL-1 *Blue* competentes

Diluiu-se 50 ng do plasmídeo em 5  $\mu$ L de TE. A transformação das bactérias foi realizada por choque térmico. A solução contendo o plasmídeo foi adicionada nas bactérias *Escherichia coli* competentes XL-1. A mistura foi colocada em gelo por 30 min e depois foi transferida para o banho-maria com temperatura de 42°C e mantida por 90 segundos. A suspensão ficou sob agitação à 37°C por 2 horas em meio SOC (Anexo 1). O meio foi semeado em placa contendo o meio ágar LB (Anexo 1) suplementado com ampicilina (50  $\mu$ g/mL) e mantido à 37°C, *overnight* (*o.n.*).

#### 3.4.1.2 Multiplicação das bactérias

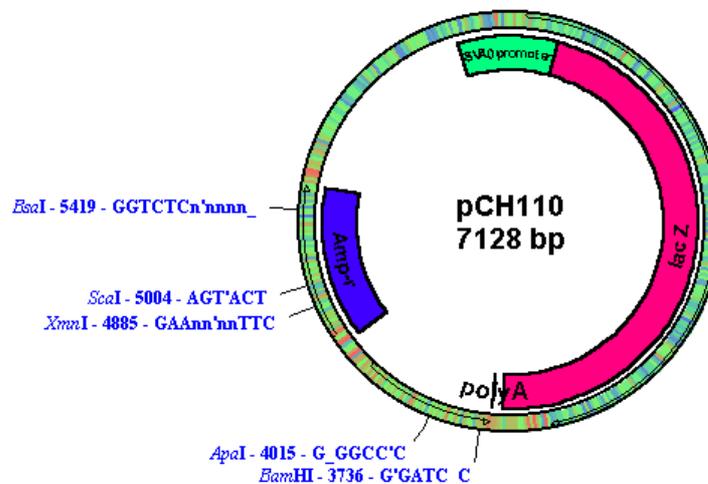
Uma colônia foi selecionada e colocada em um tubo contendo 5 mL de LB com ampicilina. Deixou-se o tubo agitando *o.n.* a 37°C. Os 5 mL foram utilizados para inocular dois *erlenmeyers* com 250 mL de LB com ampicilina em cada.

#### 3.4.1.3 Purificação do DNA plasmideal

O DNA plasmideal do pCH110 foi purificado pela primeira vez utilizando o *Kit wizard Plus Maxipreps DNA purification Systems* da Promega®. Uma segunda obtenção do DNA plasmideal do pCH110 foi realizada utilizando a técnica de purificação por Polietilenoglicol a 13% (PEG 13%), de acordo com Promega Biotec (Anexo 2).

#### 3.4.1.4 Linearização do pCH110

A teoria de Kuhn *et al.* (1999) foi elaborada baseando-se na utilização de DNA na forma linear, onde todas as suas cargas negativas apresentar-se-iam expostas, e assim, seria obtida a quantidade de moléculas anfifílicas que neutralizariam o DNA. Devido a isso, realizou-se a linearização do pCH110. Para escolhermos a enzima de restrição, utilizamos o programa pDRAW32 (programa elaborado por Kjeld Olesen – Acaclone *software* – <http://www.acaclone.com>). O sítio de restrição não poderia estar localizado sobre o gene *lacZ*. Na Figura 6, podemos verificar as enzimas de restrição que apresentaram as características desejadas.



**Figura 6** – Esquema gráfico do plasmídeo pCH110 destacando a região promotora do SV40, o gene lac Z (expressa a  $\beta$ -galactosidase), o gene Amp-r (resistência a ampicilina) e as endonucleases selecionadas pelo programa pDRAW32.

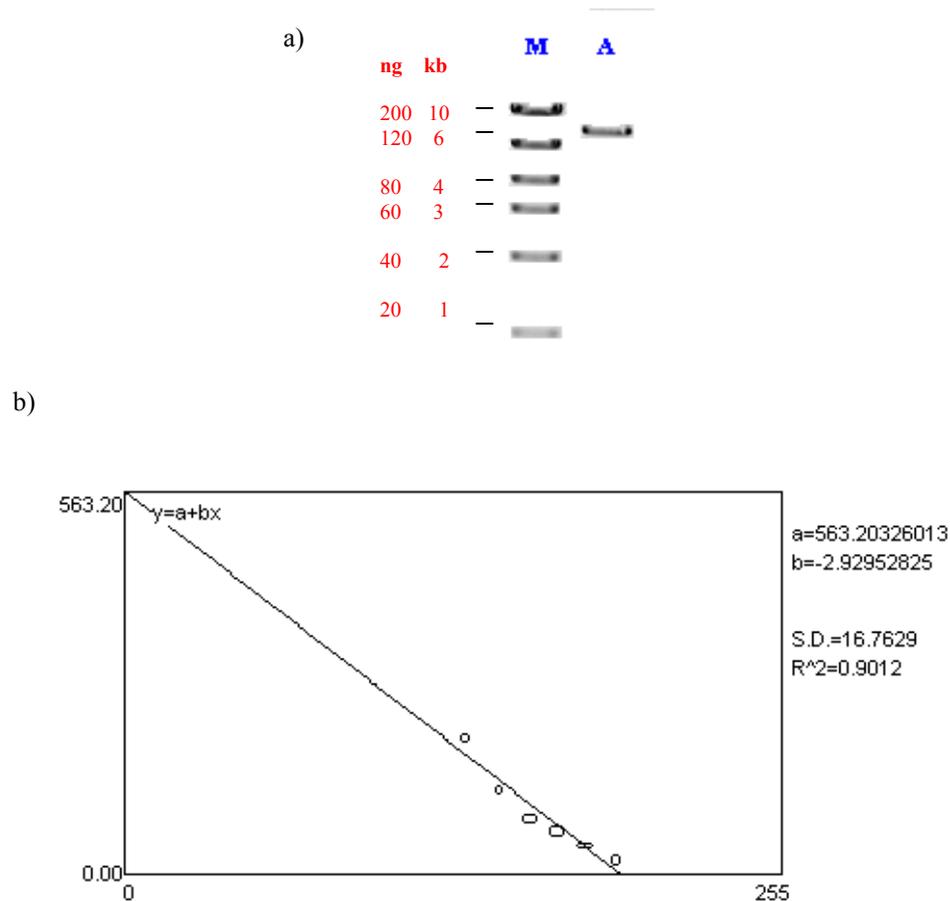
Destas endonucleases, foram selecionadas a *Sca*I e a *Bam*HI. A *Sca*I apresenta um sítio de restrição com extremidade cega (*blunt ended*) e a *Bam*HI apresenta um sítio de restrição com extremidade coesiva (*overhang*).

As reações de digestão do pCH110 foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante das endonucleases.

#### 3.4.1.5 Purificação e quantificação do DNA digerido

Para obter o DNA linear puro, o produto da digestão era submetido a uma extração por fenol-clorofórmio. O DNA final era ressuspenso em água destilada e autoclavada e, desta suspensão, retirava-se uma alíquota para realizar eletroforese em gel de agarose a 1% corado com 0,05% de brometo de etídeo. No mesmo gel, eram adicionados 4  $\mu$ L do marcador *High DNA mass ladder* (Invitrogen). Através do programa de análise de imagem *ScionImage*, realizava-se uma curva padrão de função

linear a partir da medição da densidade de pixels das bandas do marcador (Figura 7). A seguir, era verificada a densidade de pixels da banda da amostra e o valor era inferido na curva padrão, obtendo-se a quantidade de DNA.



**Figura 7** – Quantificação de DNA através do programa de análise de imagem *ScionImage*. a) Obtenção da curva padrão utilizando como marcador o *High DNA mass ladder* (M) e ao lado está a amostra (A) a ser quantificada de acordo com a densidade de pixels lida pelo programa. b) Curva padrão onde o valor da densidade dos pixels encontrada é inferida e obtêm-se a quantidade de DNA.

### 3.5 Protocolos de Transfecção

#### 3.5.1 Cálculo da quantidade de lipídios catiônicos para a transfecção

A quantidade inicial de DOTAB e DDAB para ser utilizada na transfecção foi obtida a partir de Kuhn *et al.* (1999). Foi necessário modificar os parâmetros para os que seriam utilizados nos testes de transfecção. Na Tabela 2 podemos comparar os parâmetros usados na teoria de Kuhn *et al.* (1999) e os utilizados nos testes *in vitro*:

**Tabela 2:** Parâmetros utilizados no desenvolvimento da teoria elaborada por Kuhn *et al.* (1999) e os utilizados para a aplicação da teoria *in vitro*.

	Kuhn <i>et al.</i> (1999)	Teste <i>in vitro</i>
Tamanho do DNA	220 pb	7128 pb
Concentração de DNA	$2 \times 10^{-6}$ M	$4,25 \times 10^{-10}$ M*
Concentração do sal	18 mM	154 mM

\* 2 µg em 1mL

Na teoria verificou-se que na concentração de 0,0012M para um  $\beta\chi$  de  $-3,5$ , o lipídio catiônico neutraliza 80% da carga de DNA (ver Fig. 4). Assim, elaborou-se uma equação de escala (Equação 1) que relaciona a concentração do componente anfifílico com a concentração do DNA:

$$\kappa = \frac{\rho_a}{Z_{\text{DNA}} \cdot \rho_{\text{DNA}}} \quad (1)$$

onde:

$\kappa$  = é uma constante

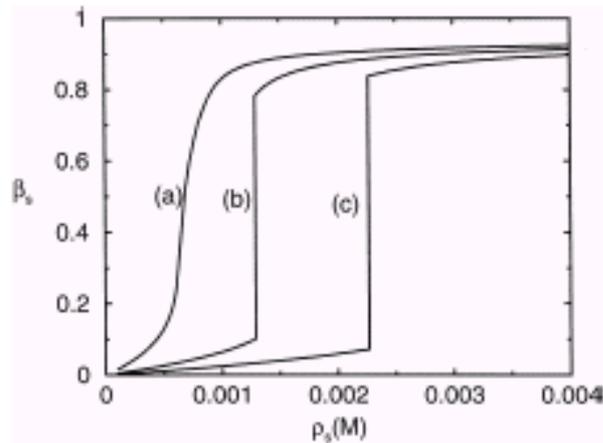
$\rho_a$  = concentração molar do componente anfifílico

$Z_{\text{DNA}}$  = tamanho do DNA em número de pares de base (bp)

$\rho_{\text{DNA}}$  = concentração molar do DNA

Em Kuhn *et al.* (1998), foi demonstrado que o ponto de transição varia de acordo com a concentração de sal no meio. Isto significa que  $\kappa$  varia com a concentração de NaCl.

*P.S. Kuhn et al. / Chemical Physics Letters 298 (1998) 51–56*



The DNA-DoTAB binding isotherms for various concentrations of added salt: (a) 5, (b) 18, (c) 40 mM.

**Figura 8** – Gráfico demonstrando a influência da concentração molar do sal em relação ao ponto de transição, no qual ocorre a ligação do DOTAB com o DNA.

Utilizando o DOTAB como modelo (Figura 8), o qual apresenta um  $\beta\chi$  de  $-3,5$ , verificou-se que ele atinge o ponto de transição na concentração de  $\rho_a = 0,0005$  M para NaCl 5 mM, já para NaCl 18 mM, a concentração de DOTAB é 0,0013 M e para NaCl 40 mM a concentração do DOTAB é de 0,0023 M. Fazendo uma extrapolação linear destes valores, obtém-se uma equação (Equação 2) que indica a concentração de lipídios para a transição em função da concentração de sal.

$$\rho_a = 0,0003 + 0,000051 \times \rho_s \quad (2)$$

$\rho_s$  = concentração de sal

A concentração de sal utilizada nos testes é de 154mM (solução fisiológica):

$$\rho_a = 0,0003 + 0,000051 \times 154$$

$$\rho_a = 0,008 \text{ M}$$

Assim, podemos calcular o  $\kappa$  para a concentração de NaCl de 154mM e obtemos:

$$\kappa = \frac{0,008}{220 \times 2 \times 10^{-6}} = 18,2$$

Usando esta equação, calculamos a concentração de anfifílicos utilizados nos testes:

$$18,2 = \frac{\rho_a}{Z_{DNA} \cdot \rho_{DNA}}$$

$$18,2 = \frac{\rho_{lc}}{7128 \cdot 4,25 \times 10^{-10}}$$

$$\rho_a = 18,2 \times 3,0294 \times 10^{-6}$$

$$\rho_a = 5,51 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Cálculo para a quantidade inicial do DOTAB:

Peso molecular do DOTAB: 308,3g/mol

$$Q = 5,51 \times 10^{-5} \times 308,3 = 16,9 \times 10^{-3} \text{ g/L}$$

$$Q \sim 17 \mu\text{g/mL}$$

Cálculo para a quantidade inicial do DDAB:

Peso molecular do DDAB: 631g/mol

$$Q = 5,51 \times 10^{-5} \times 631 = 34,7 \times 10^{-3} \text{ g/L}$$

$$Q \sim 35 \mu\text{g/mL}$$

### 3.5.2 Avaliação da citotoxicidade dos lípidios catiônicos em células VERO

Em uma placa de 96 poços foram semeadas  $10^4$  células por poço junto com 200  $\mu\text{L}$  de D-MEM suplementado com 5% de SFB. A placa foi mantida por 24 horas à 37°C

em uma cuba com CO<sub>2</sub>. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionadas diluições de DDAB e DOTAB em quadruplicatas. As diluições apresentavam as concentrações mostradas na Figura 9.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	A	0	3,5	6,5	13,5	26,5	53,0	106,5	213,0	426,0	852,0		
	B	0	3,5	6,5	13,5	26,5	53,0	106,5	213,0	426,0	852,0		
	C	0	3,5	6,5	13,5	26,5	53,0	106,5	213,0	426,0	852,0		
	D	0	3,5	6,5	13,5	26,5	53,0	106,5	213,0	426,0	852,0		
DO TA B	E	0	3,2	6,5	9,7	13,0	19,4	26,0	39,0	52,0	65,0		
	F	0	3,2	6,5	9,7	13,0	19,4	26,0	39,0	52,0	65,0		
	G	0	3,2	6,5	9,7	13,0	19,4	26,0	39,0	52,0	65,0		
	H	0	3,2	6,5	9,7	13,0	19,4	26,0	39,0	52,0	65,0		
		µg/mL											

**Figura 9** – Representação da placa de 96 poços com as concentrações de DDAB e DOTAB para o teste de citotoxicidade.

A placa foi mantida por 48 horas à 37°C, quando o sobrenadante foi retirado e as células foram coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa. Foram avaliados os efeitos tóxicos, como morte e alteração celular através do microscópio óptico invertido.

### 3.5.3 Parâmetros de transfecção

Foram realizadas diferentes transfecções para verificar os parâmetros que influenciam na aplicação *in vitro* da teoria.

#### 3.5.3.1 DOTAB e Lipofectamine™

Inicialmente, buscou-se verificar a ocorrência de transfecção de pCH110 circular e linear utilizando DOTAB e, em paralelo, realizou-se a transfecção com Lipofectamine™.

Em seis garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, foram adicionadas 5x10<sup>5</sup> células por garrafa. Estas garrafas foram mantidas com D-MEM à 10% de SFB por 15 horas à 37°C para a deposição e crescimento das células. Obtendo-se uma confluência celular de 80%, realizou-se os processos de transfecção.

Em quatro garrafas, foram realizadas as transfecções utilizando o DOTAB, sendo que em todas elas utilizou-se 2 µg do pCH110. Três garrafas foram utilizadas para a transfecção com DNA circular e quantidades crescentes de DOTAB (13 µg, 19,5 µg, 26 µg). A quarta garrafa foi transfectada com 2 µg de DNA linear e 13 µg de DOTAB. O procedimento de transfecção utilizando o DOTAB foi realizado da seguinte forma:

- em 1mL de solução fisiológica adicionou-se 2 µg de pCH110 e o DOTAB na quantidade indicada anteriormente. Deixou-se esta solução à temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) por 10 min e depois se incubou a cultura de células com essa solução por 5 horas à 37°C. Passado este período, adicionou-se 10 mL de D-MEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio foi trocado e mantido por mais 24 horas. Para verificarmos se o gene da β-gal foi transfectado para a célula, realizou-se a coloração com X-gal, a qual foi realizada da seguinte forma: retirou-se o meio da garrafa e as células foram fixadas com a Solução de Fixação (Anexo 3) por 5 min à 4°C, lavou-se as células com PBS 7,4 (Anexo 3) e se aplicou a Solução de Coloração (Anexo 3). As células foram mantidas à 37°C e foram observadas em 24 e 48 horas. Foi verificada a porcentagem de células que apresentavam a coloração azul, pois estas indicavam que haviam sido transfectadas e estavam expressando a β-galactosidase.

Em paralelo, foi realizada a transfecção de pCH110 circular e linear com protocolo de transfecção utilizando Lipofectamine™. Para sua realização, foram preparadas duas soluções de 100 µL de MEM sem SFB, sendo que na primeira

adicionou-se 2 µg do DNA e na segunda 15 µL de Lipofectamine™. Estas duas soluções foram misturadas e mantidas por 45min à temperatura ambiente (21°C – 25°C) para a formação do complexo DNA-lipossoma. Depois, foram acrescentados 800 µL de MEM sem SFB e adicionou-se esta solução sobre as células, mantendo por 10 min. Após foram acrescentados mais 2 mL de D-MEM sem SFB, incubou-se por 5 horas à 37°C e adicionou-se 8 mL de D-MEM suplementado com 10% SFB. Os procedimentos seguintes foram equivalentes a transfecção com DOTAB, onde 24 horas após a transfecção trocou-se o meio e depois de mais 24 horas foi realizada a fixação das células e coloração com X-gal.

Estas transfecções foram identificadas da seguinte forma:

- **Transfecção 1:** 2 µg de pCH110 circular + 13 µg de DOTAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 2:** 2 µg de pCH110 linear + 13 µg de DOTAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 3:** 2 µg de pCH110 circular + 19,5 µg de DOTAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 4:** 2 µg de pCH110 circular + 26 µg de DOTAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 5:** 2 µg de pCH110 circular + 15 µL de Lipofectamine™
- **Transfecção 6:** 2 µg de pCH110 linear + 15 µL de Lipofectamine™

### 3.5.3.2 DNA circular e DNA linear

De acordo com os resultados obtidos nas transfecções anteriores, foi realizada uma nova transfecção com a Lipofectamine™ para verificar se ela seria eficiente para transfectar DNA linear. Aumentou-se a quantidade de Lipofectamine™ em cinco vezes

a indicada, utilizando-se 75  $\mu\text{L}$  com 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 linear. A transfecção foi realizada de acordo com o protocolo para transfecção com Lipofectamine™ descrito no item anterior.

- **Transfecção 7:** 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 linear + 75  $\mu\text{L}$  de Lipofectamine™

### 3.5.3.3 DDAB e Lipofectamine™

Para avaliar a eficiência de transfecção utilizando o lipídio catiônico DDAB foram realizadas as seguintes transfecções:

- **Transfecção 8:** 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 circular + 26,5  $\mu\text{g}$  de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;

- **Transfecção 9:** 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 circular + 53  $\mu\text{g}$  de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;

- **Transfecção 10:** 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 linear digerido com *Bam*HI + 26,5  $\mu\text{g}$  de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;

- **Transfecção 11:** 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 linear digerido com *Bam*HI+ 53  $\mu\text{g}$  de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;

Para verificar se o pCH110 linear digerido com *Sca*I tem o mesmo comportamento que o pCH110 digerido com *Bam*HI foi realizada a seguinte transfecção:

- **Transfecção 12:** 2  $\mu\text{g}$  de pCH110 linear digerido com *Sca*I + 26,5  $\mu\text{g}$  de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;

Em paralelo a estas transfecções foram repetidas as Transfecções 5 e 6 com Lipofectamine™ como controle das condições.

### 3.5.3.4 Células de cultivo secundário

A fim de verificar a ocorrência de transfecção em células de cultivo secundário, utilizou-se células de pulmão de feto bovino (PFB) e de membrana sinovial ovina (MSO) com DDAB utilizando pCH110 circular e comparar com Lipofectamine™

Para a transfecção utilizando cultivo celular secundário foram preparadas 4 garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com 1x10<sup>6</sup> células por garrafa. Estas garrafas foram mantidas com D-MEM a 10% de SFB por 15 horas à 37°C para a deposição e crescimento das células. O processo de transfecção foi realizado de acordo com o protocolo descrito inicialmente, seguindo as formulações abaixo.

#### 3.5.3.4.1 Transfecções em células de PFB:

- **Transfecção 13:** 2 µg de pCH110 circular + 26,5 µg de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 14:** 2 µg de pCH110 linear + 26,5 µg de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 15:** 2 µg de pCH110 circular + 15 µL de Lipofectamine™ .

#### 3.5.3.4.2 Transfecções em células de MSO:

- **Transfecção 16:** 2 µg de pCH110 circular + 26,5 µg de DDAB + q.s.p.1 mL de solução fisiológica;
- **Transfecção 17:** 2 µg de pCH110 circular + 15 µL de Lipofectamine™ .

## 3.6 Análise dos complexos DNA – lipídios catiônicos

Para verificarmos se os lipídios catiônicos alteram a conformação do DNA plasmideal foram utilizadas diferentes concentrações dos lipídios catiônicos (Tabela 3)

para neutralizar 500 ng do pCH110. Estas reações foram realizadas em solução fisiológica (q.s.p. 30  $\mu$ L), simulando as possíveis soluções de transfecção. A mistura foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%, corada com brometo de etídeo (BET) e visualizada por luz ultra violeta.

**Tabela 3** - Composição das diferentes quantidades dos lipídios catiônicos para complexar com 500 ng do pCH110. Estas reações foram realizadas em solução fisiológica (q.s.p. 30  $\mu$ L) e foram analisadas para a formação de complexos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com BET.

Reação	DOTAB	DDAB	Forma do DNA
1	6,5 $\mu$ g (2x)	-	circular
2	16,25 $\mu$ g (5x)	-	circular
3	32,5 $\mu$ g (10x)	-	circular
4	6,5 $\mu$ g (2x)	-	linear
5	16,25 $\mu$ g (5x)	-	linear
6	32,5 $\mu$ g (10x)	-	linear
7	-	6,65 $\mu$ g (1x)	circular
8	-	33,25 $\mu$ g (5x)	circular
9	-	66,5 $\mu$ g (10x)	circular
10	-	6,65 $\mu$ g (1x)	linear
11	-	33,25 $\mu$ g (5x)	linear
12	-	66,5 $\mu$ g (10x)	linear
13	-	100 $\mu$ g (15x)	circular
14	-	133,5 $\mu$ g (20x)	circular
15	-	166,5 $\mu$ g (25x)	circular
16	-	166,5 $\mu$ g (25x)	linear
17	48,75 $\mu$ g (15x)	-	circular
18	65 $\mu$ g (20x)	-	circular
19	81,25 $\mu$ g (25x)	-	circular
20	-	-	circular

### 3.7 Análise do complexo DNA – Lipofectamine™

Para verificarmos a formação do complexo entre lipossomo e o DNA circular e linear, realizou-se a reação de diferentes quantidades de Lipofectamine™ com 350 ng DNA plasmideal (Tabela 4). As reações foram realizadas em D-MEM (q.sp. 30 µL) sem soro fetal bovino, mantendo a Lipofectamine™ e o DNA incubados por 45 min e a seguir submetendo-os à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com BET e visualizado por luz ultra violeta.

**Tabela 4** - Composição das diferentes quantidades de Lipofectamine™ para complexar com 350 ng do pCH110. Estas reações foram realizadas em D-MEM (q.s.p. 30 µL) e foram analisadas para a formação de complexos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com BET.

Reação	Quantidade de Lipofectamine™	Forma do DNA
21	2,6 µL (1x)	circular
22	2,6 µL (1x)	linear
23	5,2 µL (2x)	linear
24	7,8 µL (3x)	linear
25	10,4 µL (4x)	linear
26	13 µL (5x)	linear

### 3.8 Microscopia de Força Atômica (MFA)

#### 3.8.1 Preparo das reações para análise por MFA

Para evitar a interferência de aminoácidos e sais na visualização das imagens, as reações foram realizadas simulando os protocolos de transfecção porém em água destilada estéril.

##### 3.8.1.1 Formação do complexo lipossomo-DNA

O DNA circular e o linear do pCH110 (350 ng) foram diluídos em 20  $\mu\text{L}$  de água bem como 2,6  $\mu\text{L}$  de Lipofectamine™ foi diluído em 20  $\mu\text{L}$  de água. As duas soluções foram misturadas e deixadas incubando por 45min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 960  $\mu\text{L}$  de água.

##### 3.8.1.2 Formação do complexo DDAB-DNA

Em 1000  $\mu\text{L}$  de água, foram adicionados 350 ng de circular e 5,2  $\mu\text{g}$  de DDAB.

#### 3.8.2 Realização da MFA

Em uma lâmina de mica foram depositadas 10  $\mu\text{L}$  da reação. Deixou-se secar a água a temperatura ambiente. O modelo de microscópio de força atômica usado foi o NanoScope III (Digital Instruments). O *scanner* utilizado foi do tipo “D” que capta imagens de área de 1 a 100  $\mu\text{m}^2$ . A frequência usada para escanear foi de 0,5-1,0 Hz.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Obtenção e purificação do plasmídeo

O DNA plasmideal do pCH110 que foi purificado pelo *Kit wizard Plus Maxipreps DNA purification Systems* da Promega® não foi clivado pela endonuclease *ScaI*. Assim, foi realizada uma segunda purificação do DNA plasmideal do pCH110 utilizando a técnica por PEG 13%. O DNA obtido por esta técnica foi eficientemente linearizado com a enzima *ScaI*, bem como com a *BamHI*, conforme observado em gel de agarose.

### 4.2 Protocolos de Transfecção

#### 4.2.1 Avaliação da citotoxicidade dos lipídios catiônicos em células VERO

Na realização do teste de citotoxicidade com o DDAB, ele apresentou baixa toxicidade em todas as concentrações testadas. Porém, verificou-se que com o aumento de sua concentração ele diminuía sua solubilidade na solução fisiológica. Sendo assim, para utilizá-lo na transfecção, foi verificado em que concentração o DDAB era solúvel em solução fisiológica. O DDAB foi completamente solúvel em solução fisiológica nas concentrações de 3,5 µg/mL (Fig. 9a) até 26,5 µg/mL. Na concentração de 53 µg/mL (Fig. 9b), o DDAB apresentou-se parcialmente solúvel e nas concentrações a partir de 106,5 µg/mL (Fig. 9c) ocorreu precipitação.

De acordo com estes resultados e aplicação da equação ( Kuhn *et al.*, 1998; Khun *et al.*, 1999, item 3.5.1) selecionou-se as concentrações 26,5 µg/mL e 53 µg/mL de DDAB em solução fisiológica para os testes de transfecção.



**Figura 10** – Teste de citotoxicidade do DDAB em células Vero. O DDAB encontra-se totalmente dissolvido na concentração de  $3,5\mu\text{g/mL}$  (a), parcialmente dissolvido com  $53\mu\text{g/mL}$  (b) e insolúvel com  $106,5\mu\text{g/mL}$  (c). Nenhuma das concentrações foram citotóxicas. Aumento 50 x.

No teste de citotoxicidade com o DOTAB, verificou-se que ele apresentou uma elevada citotoxicidade a partir da concentração de  $26,0\ \mu\text{g/mL}$ . A citotoxicidade observada consistiu do desprendimento das células da monocamada aderida na base da garrafa, não ocorrendo alteração na estrutura da célula.. Após as 48 horas de contato com o DOTAB, verificou-se que nas concentrações de  $26\ \mu\text{g/mL}$ ,  $39\ \mu\text{g/mL}$ ,  $52\ \mu\text{g/mL}$  e  $65\ \mu\text{g/mL}$  havia a presença respectiva de 30%, 10%, 0% e 0% das células na monocamada.

Foram então selecionadas as concentrações  $13\ \mu\text{g/mL}$ ,  $19,5\ \mu\text{g/mL}$  e  $26\ \mu\text{g/mL}$  para os testes de transfecção.

#### 4.2.3 Parâmetros de transfecção

##### 4.2.3.1 DOTAB e Lipofectamine™

Nas transfecções realizadas com  $13\ \mu\text{g}$  de DOTAB, não se obteve células transfectadas, tanto utilizando o plasmídeo linear como circular. Este mesmo resultado foi encontrado para a garrafa transfectada com  $19\ \mu\text{g/mL}$ , sendo essas quantias de

DOTAB ineficientes para a transfecção. A transfecção realizada com 26 µg/mL apresentou duas células transfectadas e uma alta toxicidade, mantendo somente 30% das células na monocamada aderida à base da garrafa de cultura.

Em paralelo, foi realizado como controle da transfecção, o método utilizando Lipofectamine™. A transfecção realizada com o plasmídeo circular obteve 40% das células transfectadas. As alterações celulares verificadas consistiam de vacuolização intensa, porém com baixa morte celular. Na transfecção realizada com o plasmídeo linear e 15 µL de Lipofectamine™, não foram obtidas células transfectadas e a toxicidade foi baixa, sem ocorrer a vacuolização das células.

#### 4.2.3.2 DNA circular e DNA linear

Para verificar se realmente não ocorreria a mesma eficiência de transfecção ao utilizar o mesmo volume de Lipofectamine™ com o plasmídeo circular e o linear ou se o pCH110 na forma linear não estava expressando o gene β-gal, repetiu-se as transfecções com Lipofectamine™ do teste anterior, porém, e em paralelo, foi realizada uma transfecção com o pCH110 linear e um volume de Lipofectamine™ cinco vezes superior (75 µL) ao utilizado com eficiência no circular.

Durante o processo de transfecção, foi observado por microscópio óptico (100x e 320x) que, após as cinco horas de incubação da Lipofectamine™ com o DNA plasmídeo circular em 3 mL de D-MEM sobre a cultura das células, ocorria a formação de complexos que se apresentavam distribuídos sobre as células na forma de esferas (Fig. 10E). Estes complexos não foram visualizados na reação entre a Lipofectamine™ (15 µL) e o DNA linear, porém entre a Lipofectamine™ (75 µL) e o DNA linear também foi possível visualizar a formação dos complexos.

Quanto à eficiência de transfecção, bem como à citotoxicidade, os resultados das duas primeiras transfecções foram equivalentes às descritas anteriormente. A transfecção utilizando 75  $\mu$ L de Lipofectamine™ com o pCH110 linear apresentou 1% das células transfectadas e uma alta toxicidade, com morte celular de 80% da monocamada e com células intensamente vacuolizadas (Fig. 10C).

#### 4.2.3.3 DDAB e Lipofectamine™

Ao preparar-se a solução de transfecção, primeiro o DNA era adicionado na solução fisiológica e posteriormente era acrescentado o DDAB. Tanto ao adicionar 26,5  $\mu$ g como 53  $\mu$ g de DDAB na solução fisiológica, observou-se que este precipitava sendo necessária uma intensa homogeneização. Já ao realizar primeiro a mistura entre o DNA e o DDAB e depois adicionar a solução fisiológica, os dois primeiros formaram um complexo insolúvel na solução fisiológica e não ocorreu transfecção.

Nas transfecções realizadas utilizando o DDAB com o plasmídeo circular obteve-se 10% de células transfectadas com 26,5  $\mu$ g/mL de DDAB e 15% com 53  $\mu$ g/mL, sendo esta a concentração que apresentou a melhor eficiência de transfecção. A citotoxicidade de ambas foram baixas, ocorrendo desprendimento de células nas 24 horas em que o DDAB estava em contato com as células, porém no momento da coloração (24 horas após a troca de meio que havia o DDAB), havia uma monocamada de células com 100% de confluência.

As células transfectadas com DDAB apresentaram características diferentes após a coloração, quando comparadas com as transfectadas com Lipofectamine™. Na transfecção com Lipofectamine™, verificou-se que toda a célula apresentava-se corada de azul (Fig. 10A), já nas com DDAB observou-se células com grânulos azuis

distribuídos por todo o citoplasma e coloração intensa de azul junto ao núcleo (Fig. 10B).

As transfecções realizadas com o plasmídeo linear clivado com *Bam*HI e o DDAB tiveram uma eficiência de 15% de células transfectadas, tanto utilizando 26,5 µg de DDAB como 53 µg. Este resultado foi semelhante ao obtido com o plasmídeo circular, demonstrando que, para a mesma quantidade de DNA plasmídeo circular e linear, o DDAB tem eficiência semelhante de transfecção e a mesma característica de coloração, tendo as células coradas fortemente junto ao núcleo e grânulos azuis no citoplasma (Fig. 10D).

A transfecção utilizando o DDAB e o pCH110 linearizado com *Sca*I obteve um resultado de 8% das células transfectadas.

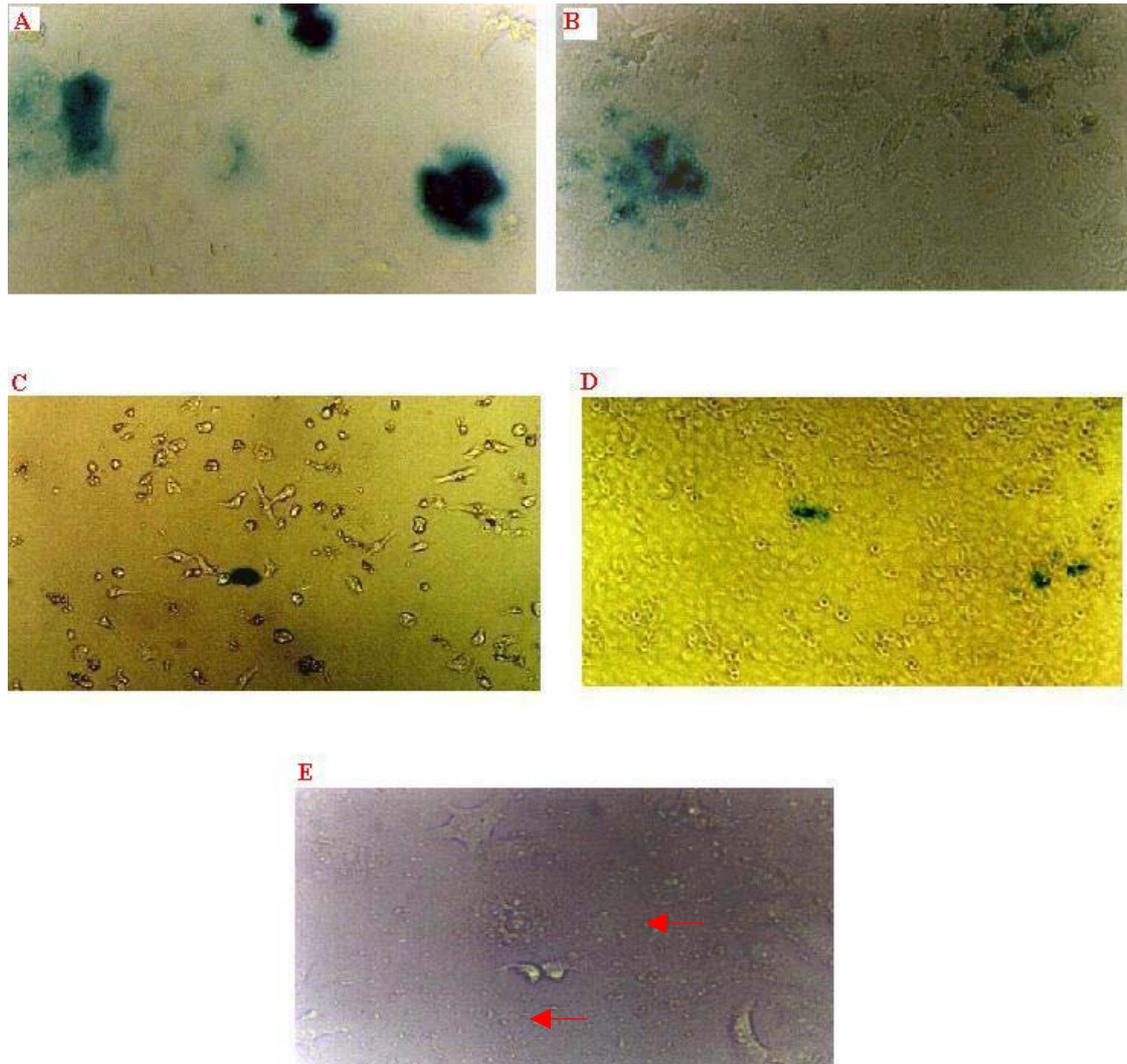
#### 4.2.3.4 Células de cultivo secundário

##### 4.2.3.4.1 Transfecções em células de PFB

Na tentativa de transfecção realizada nas células de cultivo secundário de PFB, tanto as células controle (que não foram transfectadas com DNA), bem como as transfectadas apresentaram uma coloração azul clara. As possíveis causas para este resultado são que as células poderiam estar em senescência, com contaminação bacteriana ou com micoplasma. Foi realizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para verificar se as células estavam contaminadas com *Mycoplasma spp* (Anexo 5). O resultado da PCR confirmou a presença do microrganismo nas células de cultivo secundário.

#### 4.2.3.4.2 Transfecções em células de MSO

Na tentativa de transfecção realizada em células de cultivo secundário de MSO, tanto utilizando o DDAB, bem como Lipofectamine™, não foram obtidas células transfectadas.



**Figura 11** – Células Vero transfectadas com pCH110. Nas imagens **A** e **B** (aumento 320x) foram transfectadas com o plasmídeo circular, só que em **A** foi utilizado o método por Lipofectamine™ e em **B** foi utilizado DDAB; em **C** e **D** (aumento 100x) as células foram transfectadas com o plasmídeo linear, sendo que em **C** foi utilizado cinco vezes mais a quantidade de Lipofectamine™ para a transfecção e em **D** foi utilizado DDAB na mesma quantidade que em **B**. Na Figura **E** é possível visualizar a formação dos complexos (setas vermelhas) entre Lipofectamine™ e o DNA plasmídeo circular (aumento 320x).

### 4.3 Análise dos complexos DNA – lipídios catiônicos

Na Figura 11, podemos visualizar as reações que foram realizadas na mesma proporção que as utilizadas na transfecção. Estas reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.

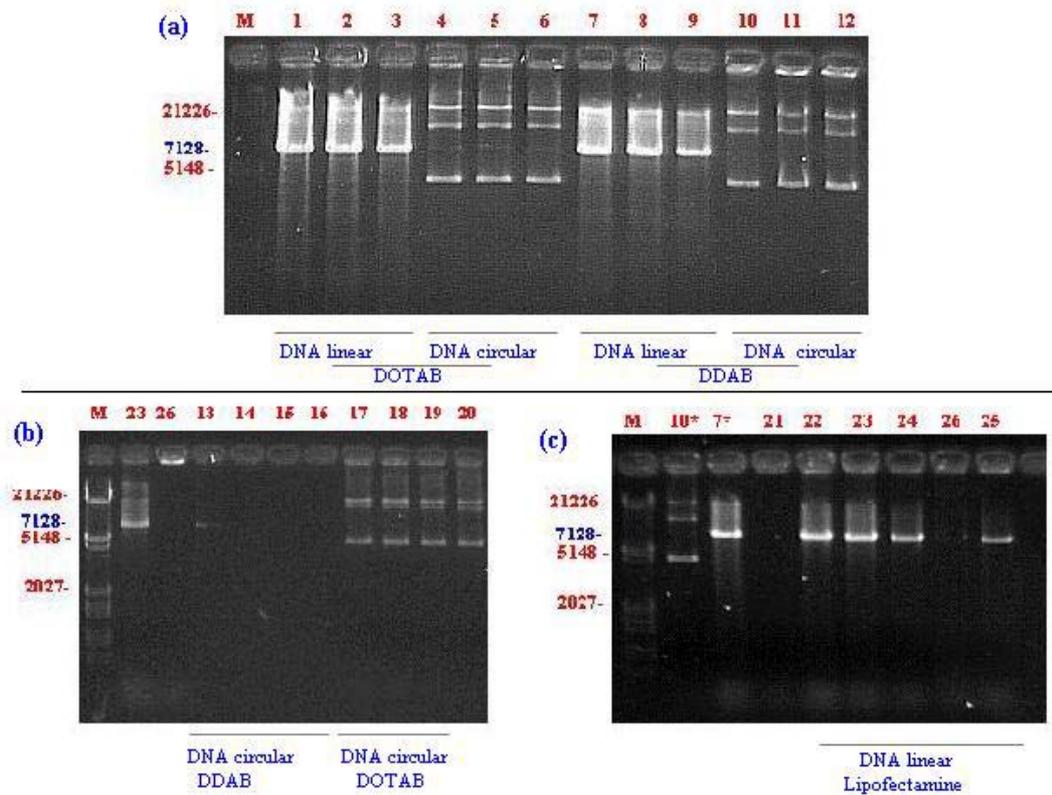
Observou-se que, nas reações entre diferentes quantidades de DOTAB e DNA circular (reações 4 à 6 e 17 à 19), não houve diferença entre a intensidade e altura da banda de DNA em relação ao DNA controle que é composto por solução fisiológica e o plasmídeo pCH110 circular (reação 20). Este resultado demonstrou que o DOTAB não interferiu na conformação do DNA e nem na intercalação do BET. Porém, nas reações do DOTAB com o DNA linear, verificou-se que há uma diminuição na quantidade de DNA, tanto no rastro de DNA, bem como na banda (reações 1 à 3). Esta diminuição ocorreu com o aumento da quantidade de DOTAB.

Para as reações entre DDAB e pCH110 linear (reações 7 à 9), podemos verificar que, com o aumento da quantidade de DDAB, há uma diminuição gradativa de DNA. Este resultado não foi observado nas reações entre o DDAB e o pCH110 circular (reações de 10 à 12), onde a intensidade e a distância que o DNA correu no gel foram as mesmas, mesmo com o aumento da concentração de DDAB. Nas reações 14 à 16, o DNA aplicado no gel foi todo para a superfície devido ao alto volume de etanol (solvente do DDAB) presente na reação.

### 4.3 Análise do complexo DNA – Lipofectamine™

A reação entre a Lipofectamine™ e o plasmídeo circular demonstrou que, na mesma proporção utilizada para a transfecção, eles formam um complexo de um tamanho que não consegue se deslocar no gel (reação 21). Este complexo não permitiu que o BET se intercalasse no DNA, pois não foi possível visualizar fluorescência,

porém foi possível verificar a existência de um conteúdo acinzentado junto ao poço onde o DNA foi colocado. Já a reação entre a Lipofectamine™ e o plasmídeo linear com as mesmas proporções utilizadas na reação 21 (350ng de DNA e 2,6μL de Lipofectamine™) verificou-se que não ocorreu a formação do complexo pois o DNA percorreu no gel a distância esperada e a intensidade de fluorescência não diminuiu. Com o aumento da quantidade de Lipofectamine™ (reações 23 a 25, onde o aumento da quantidade de Lipofectamine™ foi respectivamente 2x, 3x e 4x o volume da reação 22) ocorreu equivalente diminuição de DNA que correu no gel e pode-se verificar um aumento na quantidade de material retido junto ao poço, devido a formação de complexos lipossomos-DNA. Na reação 26, onde a quantidade de Lipofectamine™ é cinco vezes superior (13μL de Lipofectamine™ para 350ng de DNA) a quantidade usada na reação 22, praticamente todo o DNA linear formou o complexo com o lipossomo, não correndo no gel e permanecendo retido junto ao poço.



**Figura 12** – Análise da formação de complexos entre diferentes proporções dos lipídios catiônicos e Lipofectamine™ com pCH110 circular e linear. a) Reações com baixas quantidades entre DOTAB e DDAB com pCH110 linear e circular; b) Reações com altas quantidades de DOTAB e DDAB com pCH110 circular; c) Reações com diferentes volumes de Lipofectamine™ com DNA linear. M - marcador; Reações 1 à 6 e 17 à 19: DOTAB e DNA; reações 7 à 12 e 14 à 16: DDAB e DNA; reações 21 à 26: Lipofectamine™ e DNA. 7\* e 10\* : mesma proporção de DNA em relação a DDAB porém foi utilizado 350ng de DNA.

## 4.4 Microscopia de Força Atômica

### 4.4.1 Imagens da reação entre o lipossomo (Lipofectamine™) e o plasmídeo linear

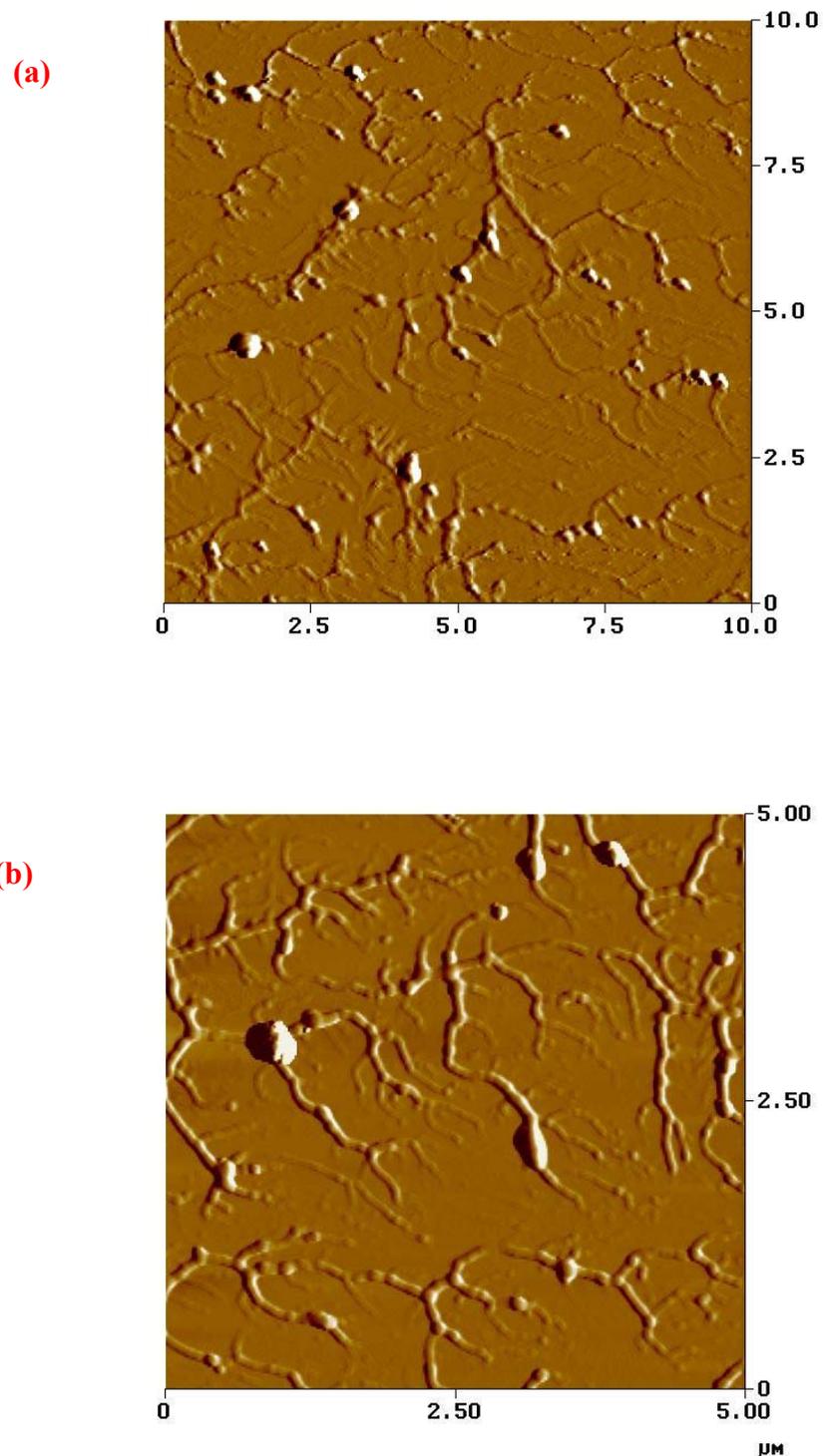
Através da MFA, pode-se visualizar a presença de esferas, sendo a grande parte de formatos regulares. A maior parte das esferas (80%) tinha um diâmetro em torno de 250nm, porém haviam esferas maiores que mediam 400nm e uma esfera apresentou diâmetro de 530nm. Junto às esferas e distribuídas por toda a imagem foram observadas estrias com ramificações que se afilavam. Algumas das esferas encontravam-se sobre as estrias, mas grande parte delas encontravam-se dentro das estrias, fazendo parte da estrutura. Estas estrias chegavam a atingir o comprimento de 1,8 $\mu$ m e a largura máxima encontrada foi de 200nm (Figura 12).

### 4.4.2 Imagens da reação entre o lipossomo (Lipofectamine™) e o plasmídeo circular

Foram observadas estruturas de formas irregulares e com diferentes tamanhos. Foi verificada 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 (Figura 13).

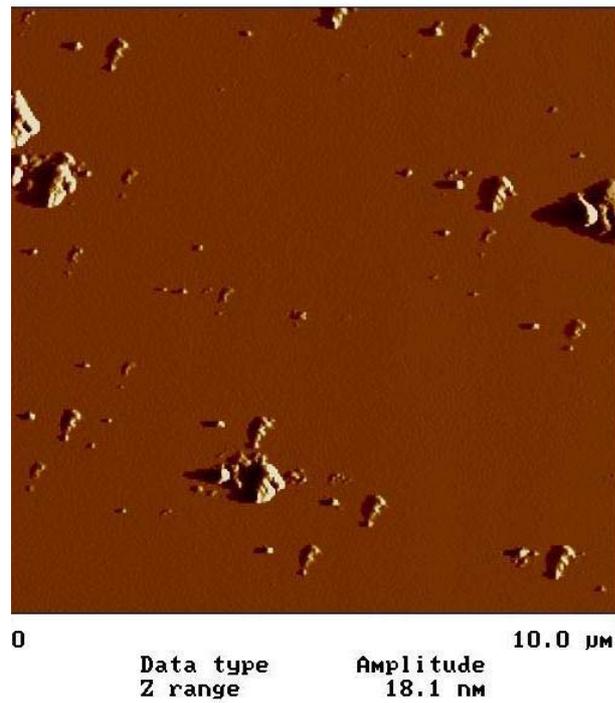
### 4.4.3 Imagens da reação entre o DDAB e o plasmídeo circular

Na imagem, predominam esferas de aproximadamente 50 a 100nm (Figura 14A). Algumas destas esferas se encontram sobre algumas estruturas na forma de estrias (Figura 14B). Estas estrias também são observadas com diferentes formas, comprimentos e larguras (Figura 14C). Há também algumas estruturas irregulares que atingem até 500nm (Figura 14D).

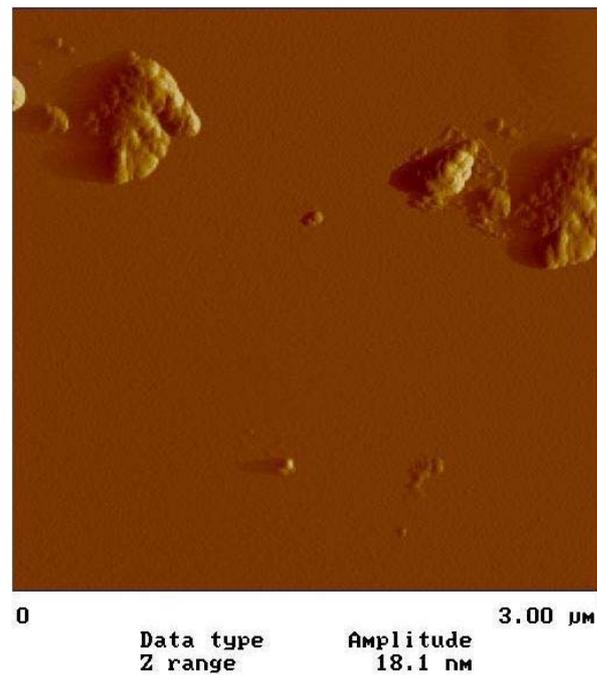


**Figura 13** – Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 2,6 $\mu$ L de Lipofectamine™ e 350 ng de pCH110 linearizado. São observadas esferas junto às estrias. Estas esferas variam de 150 a 530nm, sendo que grande parte são de 250nm de diâmetro. a) Imagens obtidas numa dimensão de 100 $\mu$ m<sup>2</sup>. b) Imagens obtidas numa dimensão de 25 $\mu$ m<sup>2</sup>

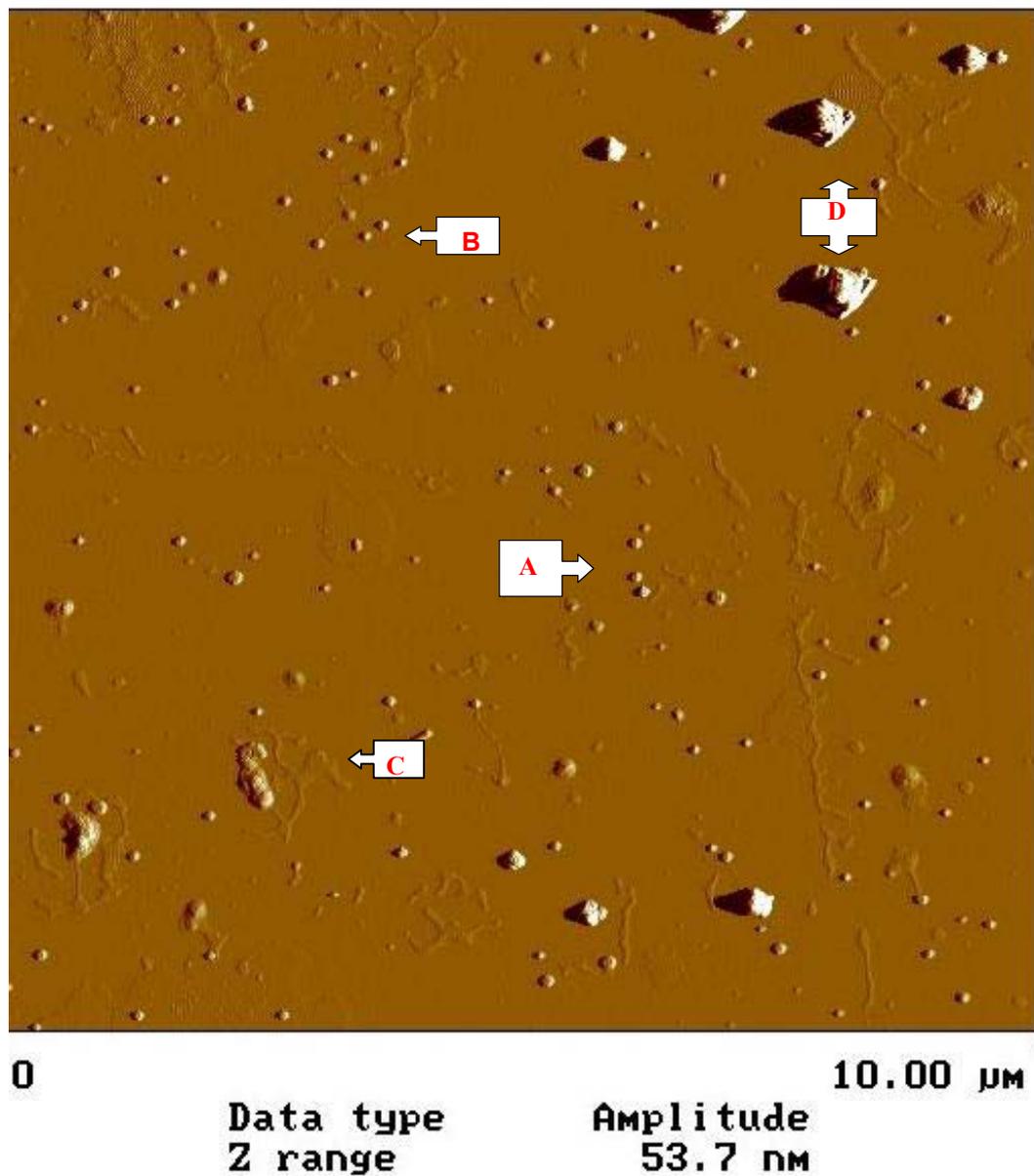
(a)



(b)



**Figura 14** - Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 2,6 $\mu\text{L}$  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 a) Imagens obtidas numa dimensão de 100 $\mu\text{m}^2$ . b) Imagens obtidas numa dimensão de 9 $\mu\text{m}^2$ .



**Figura 15** - Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica da reação entre 5,6μg de DDAB e 350 ng de pCH110 circular. Predomina na imagem esferas de aproximadamente 50 a 100nm (A). Algumas destas esferas se encontram sobre algumas estruturas na forma de estrias (B). Esta estrias também são observadas com diferentes formas, comprimentos e larguras (C). Há também algumas estruturas irregulares que atingem até 500nm (D).

## 5 DISCUSSÃO

Técnicas de transfecção gênica utilizando lipossomos obtidos com lipídios catiônicos e neutros têm sido amplamente aplicadas e estudadas. Muitas são as técnicas para a obtenção de lipossomas (Saunders *et al.*, 1962; Batzri e Korn, 1972; Bangham *et al.*, 1974; Deamer & Bangham, 1976; Campbell, 1995). Porém, o desenvolvimento destas técnicas pode apresentar etapas que são laboriosas, necessitar de equipamentos especiais, formar vesículas heterogêneas ou serem ineficientes para o transporte de DNA.

Diversas preparações de lipossomos catiônicos são viáveis comercialmente no entanto, eles são relativamente caros para o uso em larga escala *in vitro* ou *in vivo* (Campbell, 1995).

Khun *et al.* (1999) propuseram um sistema de transfecção onde moléculas anfifílicas interagiriam diretamente com o DNA sem a necessidade de formação prévia de lipossomos.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento prático desta teoria onde diversos parâmetros que influenciam na eficiência de transfecção foram levados em consideração, tais como: hidrofobicidade da molécula anfifílica, citotoxicidade, tipo de célula a ser transfectada e estrutura do DNA.

A teoria foi desenvolvida baseada na utilização de um surfactante, mais especificamente o DOTAB. Inicialmente, foi obtida uma concentração teórica de 17µg/mL de DOTAB para se chegar ao ponto de transição onde o surfactante se liga ao DNA neutralizando 80% de sua carga. Foram realizados testes com concentrações inferiores e superiores a este valor para verificar a eficiência de transfecção. Nas concentrações de 13 µg/mL e 19 µg/mL de DOTAB não ocorreu transfecção, porém na concentração de 23 µg/mL duas células foram transfectadas mas a toxicidade foi alta. A

toxicidade do DOTAB pode ser explicada por sua característica anfifílica. Moléculas anfifílicas tendem a formar micelas em água. Quando junto à membrana celular, a extremidade hidrofóbica do surfactante liga-se as regiões hidrofóbicas das proteínas da membrana, deslocando as moléculas lipídicas. Como a outra extremidade da molécula é polar, essa ligação tende a solubilizar as proteínas da membrana, tornando-as inativas (Alberts *et al.*, 1997). A aderência entre a membrana e a superfície do frasco de cultivo celular se dá por proteínas. Verificou-se o desprendimento e arredondamento das células, provavelmente devido à solubilização das proteínas de membrana pela alta concentração de DOTAB.

A segunda opção foi a escolha do DDAB. Este lipídio catiônico apresenta uma dupla cadeia de hidrocarbonos e um número de carbonos superior em cada cadeia quando comparado ao DOTAB, o que lhe confere uma característica mais hidrofóbica. Como foi demonstrado que a concentração molar de lipídio catiônico necessária para atingir o ponto de transição diminui de acordo com o grau de hidrofobicidade (Kuhn *et al.*, 1999), poderíamos utilizar uma menor concentração de DDAB que neutralizaria a carga de DNA. Pelo número de carbonos presentes na cadeia (a hidrofobicidade é equivalente ao comprimento da cadeia e não ao número de cadeias presentes na molécula) o DDAB apresenta  $\beta_x = -5$ , enquanto que o DOTAB é  $\beta_x = -3,5$ . Para sabermos a quantidade inicial de DDAB a ser utilizada, diminuiu-se o valor obtido, pois utilizamos a equação que leva em consideração diferentes concentrações de sal, e esta foi baseada no DOTAB. Então, a partir do valor obtido para o DOTAB chegamos ao valor do DDAB. Porém, de acordo com a hidrofobicidade deste último, foram utilizados valores inferiores ao obtido.

Se compararmos em quantidade molar, o DDAB obteve uma eficiência de transfecção de até 20% utilizando 40 nmoles, enquanto que o DOTAB, com 80 nmoles,

transfectou duas células, que não representou nem 1% de células transfectadas e foi extremamente citotóxico.

A transfecção com o DDAB apresentou eficiência semelhante com o plasmídeo pCH110 na forma linear e na circular, enquanto que, utilizando Lipofectamine™, este não teve a mesma eficiência de transfecção ao utilizarmos a mesma quantidade para transfectar o plasmídeo linear e o circular.

Os trabalhos relacionados com o transporte de DNA de diferentes conformações são contraditórios. Através de Eletroporação, Newmann *et al.* (1982) demonstraram uma eficiência de transfecção aproximadamente três vezes superior utilizando DNA linear em relação ao circular. De acordo com o modelo de eletroporação, a interação do campo elétrico externo com os dipolos lipídicos induz à formação de um poro. Assim, como a entrada do DNA ocorre através de um poro, pode-se supor que o DNA linear teria maior facilidade de passar pelo poro do que o circular. Porém, também por eletroporação, Litzinger e Huang (1992) obtiveram eficiência de transfecção semelhante entre o DNA linear e o DNA circular e Xi e Tsong (1993) demonstraram uma expressão gênica de três a cinco vezes mais eficiente com DNA super enrolado do que com DNA linear.

Weintraub *et al.* (1986) utilizaram Ca-fosfato e DEAE e obtiveram níveis mais altos de expressão utilizando o plasmídeo super enrolado em relação ao linear quando transfectados em células CV-1 ou células L.

Even-Chen & Barenholz (2000) utilizaram o lipossoma formado por DOTAP/DOPE e demonstraram que, tanto o DNA super enrolado, como o relaxado e o DNA fita simples, tiveram quantias semelhantes complexadas.

Os estudos que consideram as implicações das diferenças estruturais entre o DNA linear e circular na transfecção gênica são recentes.

A introdução de DNA plasmideal linear tem se mostrado mais eficiente do que a do circular para transformar estavelmente células em cultura (Folger *et al.*, 1987). Leahy *et al.* (1997) digeriram um vetor plasmideal contendo o gene da cloranfenicol acetil transferase (CAT) mantendo o conjunto de transcrição deste gene intacto. Após a formação de concatâmeros, foi realizada a transfecção e obteve-se um aumento de 14 vezes na atividade de CAT quando comparado com o plasmídeo transfecado na forma circular. Chen *et al.* (2001) compararam a habilidade entre plasmídeos circular e linear em transfectar hepatócitos *in vivo* e verificaram que a expressão gênica de plasmídeo circular acabou tão logo após o transporte, enquanto que, com DNA linearizado observou-se a expressão em altos níveis (10 a 100 vezes mais alta do que com o circular) de produto transgênico, a qual persistiu por mais de 9 meses. Porém, foi verificado que estes concatâmeros não se integraram ao cromossomo. Estas características apresentadas pela expressão do plasmídeo na forma linear (obtenção de altos níveis do produto transgênico e o DNA não ter se integrado ao genoma), são de grande utilidade para vacinas de DNA. Neste caso, deseja-se a expressão transitória em altos níveis da proteína imunodominante do patógeno, para que o sistema imune a reconheça, desenvolva anticorpos e desencadeie o mecanismo de memória celular frente a este patógeno.

Em oposição ao descrito acima, foi demonstrado que a introdução de DNA linear em células induz um sistema enzimático de reparo de quebra de dupla-fita do DNA cromossomal. Dellaire *et al.* (2002) demonstraram que o linear extracromossomal pode se integrar ao genoma celular através do sítio para o reparo do DNA cromossomal.

Para verificarmos a interação dos lipídios catiônicos e da Lipofectamine™ com os plasmídeos circular e linear, realizamos a eletroforese destes na proporção em que foram transfecados, porém em menor quantidade. Quando 90% da carga de fosfato do

DNA é neutralizada, há uma reação energeticamente favorável que leva a condensação espontânea do DNA, adquirindo uma forma toroidal (Bloomfield, 1991). Nesta estrutura, o DNA se torna inacessível para pequenas moléculas, tal como a intercalação com o BET e fica protegido contra a degradação por DNase I (Gerhon *et al.*, 1993). A ocorrência destas estruturas pode ser caracterizada através da eletroforese em gel de agarose, pois, com a formação de complexos maiores, ocorre o retardo da passagem do DNA e há também a diminuição da intensidade da fluorescência pois o BET não consegue se intercalar ao DNA.

No trabalho realizado, observou-se uma diminuição na intensidade de fluorescência nas reações entre os lipídios catiônicos e o DNA linearizado. Tanto com o aumento do DOTAB como com o aumento do DDAB, ocorreu uma diminuição de DNA corado com BET. Supõe-se que parte deste DNA adquiriu a forma toroidal por estar sendo neutralizado pelo lipídio catiônico. Porém, este fato não foi observado na reação entre os lipídios e o DNA circular.

Entretanto, a presença de etanol absoluto usado como solvente do DDAB poderia estar interferindo na quantidade do DNA que fica depositado no poço do gel. Esta interferência foi observada quando se utilizou grandes quantidades de DDAB para reagir com o DNA circular. Nestas reações, havia uma alta quantidade de etanol absoluto já que o DDAB torna-se insolúvel a partir de certas concentrações. Portanto, as amostras com as maiores concentrações de DDAB não permaneceram no gel. O etanol diminui a densidade do glicerol, que é um componente adicionado junto ao DNA para depositá-lo no poço. O glicerol tem uma densidade mais alta que o tampão para eletroforese, permitindo que o DNA fique dentro do poço do gel até ser submetido à corrente elétrica.

O DDAB pareceu neutralizar uma quantidade maior de DNA linear do que o DOTAB. Segundo Bhattacharia e Mandal (1997), o efeito da hidrofobicidade tem relação direta com a mudança na estrutura do DNA. Em seu trabalho eles associaram DNA com diferentes surfactantes catiônicos. Foram comparados o cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) e o brometo de dihexadecildimetilamônio (DHDAB) que apresentam a cadeia de hidrocarbonos com o mesmo número de carbonos, porém o primeiro apresentava uma cadeia e o segundo duas cadeias de hidrocarbonos. Foi verificado que ambos necessitaram da mesma concentração para atingir a neutralização do DNA. Comparando com o brometo de dioctildimetilamônio (DODAB), que apresenta duas cadeias, porém com a metade do número de carbonos, este necessitou de uma concentração 10 vezes superior ao CTAC e DHDAB para neutralizar o DNA.

O resultado encontrado com a reação entre Lipofectamine™ e DNA demonstrou a importância da formação de um complexo maior para ocorrer transfecção. A Lipofectamine™ formou este complexo com o plasmídeo circular. Já em relação ao plasmídeo linear, foi necessário aumentar em cinco vezes a quantidade da Lipofectamine™ para que ela formasse um complexo que não se deslocaria no gel e que também não permitiria que o BET se intercalasse no DNA.

Smith *et al.* (1993) diferenciaram a interação de lipossoma com DNA plasmídeo circular super enrolado e relaxado. O plasmídeo relaxado apresenta um maior número de cargas negativas expostas que o DNA super enrolado. Por este motivo, o DNA relaxado teve mais afinidade com o lipossoma do que o DNA super enrolado. Baseando-se nesta diferenciação, supõe-se que o DNA linear apresenta um maior número de cargas negativas expostas do que o DNA plasmídeo circular, demonstrando-se a necessidade de uma maior quantidade de moléculas de lipossomos para neutralizar o DNA linear e, assim, formar um complexo passível de transfecção.

O aumento da partícula de lipossoma após formar um complexo com o DNA foi demonstrado por Son *et al.* (2000) através da medida do diâmetro hidrodinâmico da partícula. Tanto para Lipofectin™/DNA, Lipofectamine2000™/DNA e DC-Chol/DNA, os complexos foram 1,5 a 3 vezes maiores que os lipossomas pré-formados. O aumento do diâmetro dos complexos foi também proporcional ao tempo de incubação do lipossomo com o DNA no meio e pelo aumento da concentração de lipossomo em relação ao DNA. Estes dados corroboram a observação feita durante o processo de transfecção com Lipofectamine™, onde, após as cinco horas de incubação com o DNA no meio sobre a cultura de células, visualizou-se, por microscopia óptica, a presença dos complexos.

De acordo com os resultados encontrados na MFA por Nakanisshi & Noguchi (2001), verificou-se que é necessário formar um complexo entre o DNA e o lipossoma para que ocorra a transfecção. Este complexo está relacionado com a capacidade do lipossoma neutralizar a carga do DNA e assim envolvê-lo. Quando o DNA tem a carga parcialmente neutralizada, ocorre a formação de estruturas particuladas que apresentam menor eficiência de transfecção.

Através da MFA, pôde-se verificar, neste estudo, que o lipossomo com o DNA linear apresentou dimensões inferiores ao complexo lipossomo/DNA circular. Os resultados encontrados na MFA em relação a Lipofectamine™ e o DNA circular e linear foram de acordo com os achados na eletroforese em gel de agarose. Foi observada, predominantemente, a presença de pequenas esferas de 250nm na reação da Lipofectamine™ com o DNA linear. Estas dimensões estão de acordo com Felgner *et al.* (1987), que descreve os lipossomos que ainda não reagiram com o DNA com este tamanho. Assim, podemos verificar que não houve formação de um complexo e, conseqüentemente, o DNA percorreu a distância normal na eletroforese.

Através da MFA, observou-se diferentes estruturas entre o DDAB e o DNA circular. A presença de esferas de aproximadamente 100nm foi predominante. O DDAB, por ser um lipídio que apresenta duas cadeias de hidrocarbonos, tende, ao ser colocado em água, formar uma bicamada lipídica, porém, junto ao DNA, se neutralizá-lo, tende a provocar a condensação do DNA. Uma estrutura semelhante à visualizada na MFA foi obtida por Zhang *et al.* (1996). Sob condições apropriadas, os complexos DNA-lipídios preparados em detergente formaram pequenas partículas circulares de 50 a 150nm, que consistiam do DNA na forma toroidal intercalado com os lipídios catiônicos e neutros presentes. Esta estrutura mostrou maior eficiência de transfecção do que através do lipossoma, porém o seu mecanismo de transfecção não foi analisado.

Pôde-se supor que a estrutura DDAB/DNA que é transfectada está relacionada com o mecanismo de internalização do DNA. As vesículas circulares, por serem semelhantes aos complexos lipossoma/DNA, poderiam ser internalizadas por endocitose. Porém, no trabalho de Kawaura *et al.* (1998), foram realizadas transfecções com lipossomas de diferentes tamanhos e os menores de 400 nm não foram internalizados. Além disso, pôde-se verificar que, na proporção utilizada de DDAB e DNA, não ocorreu alteração da estrutura de todo o DNA, já que no gel de agarose, tanto o DNA linear como o circular, foram visualizados.

Uma outra hipótese é que os lipídios catiônicos estariam se fusionando com a membrana celular e liberando o DNA no citoplasma. Como foi demonstrado por Bhattacharya & Mandal (1997), o DNA que é neutralizado pelo lipídio catiônico, quando separado do lipídio, volta a adquirir a estrutura original, sendo desfeita a estrutura toroidal. Foi observada pela expressão da  $\beta$ -galactosidase nas células, que utilizando o DDAB, ocorreu uma eficiência de transfecção inferior do que utilizando Lipofectamine™. Se ocorresse a fusão do DDAB com a membrana celular, o DNA

entraria na célula, adquiriria a estrutura original e ficaria mais exposta a ação de endonucleases. Em consequência, ocorreria a diminuição de eficiência de transfecção e da quantidade de DNA expresso, o que explicaria a característica das células transfectadas com DDAB apresentarem grânulos azuis após coradas com X-gal, enquanto que as células transfectadas com Lipofectamine™, apresentaram-se totalmente coradas, sendo provável uma maior presença de  $\beta$ -gal.

Outro fator que poderia estar interferindo na eficiência de transfecção é a presença de estruturas heterogêneas. Considerando que, as pequenas esferas que são transfectadas, elas provavelmente foram obtidas pela neutralização de DNA. Porém, verificou-se a presença de estruturas na forma de estrias, que poderiam ser DNA que não teria sido totalmente neutralizado. Esse fato explicaria que, no gel de agarose, se observa DNA não neutralizado entre DDAB e plasmídeo circular. Foram igualmente observadas estruturas maiores de 300 nm com formas irregulares, que poderiam ser moléculas de DDAB que não se dissolveram na água e se associaram pela sua região hidrofóbica ou associadas ao DNA, o que diminuiria o DNA disponível para a transfecção.

Não foi possível verificar qual é a estrutura de DDAB/DNA que é transfectada, porém, o mecanismo parece ser diferente do lipossomo que ocorre por endocitose (Lappalainen *et al.*, 1997). Sabendo-se qual das estruturas é internalizada e qual é o mecanismo de entrada do DNA nas células, seria possível buscar a formação de estruturas mais homogêneas e, em consequência, otimizar a realização desta técnica de transfecção.

## 6 CONCLUSÕES

- Foi confirmada, na prática, a teoria de Khun *et al.* (1999);
- O lipídio catiônico DDAB apresentou-se mais eficiente e menos tóxico que o surfactante DOTAB;
- O DDAB transfectou com semelhante eficiência o pCH110 (plasmídeo que expressa a enzima  $\beta$ -galactosidase) circular e linear em células de linhagem VERO;
- A Lipofectamine™ (lipossomo formado por DOSPA e DOPE) não transfectou o pCH110 linear com a mesma quantidade utilizada para o circular;
- A Lipofectamine™ transfectou o pCH110 na forma circular com melhor eficiência do que utilizando o DDAB.
- Este sistema se mostrou simples, econômico e com baixa toxicidade para transfectar células de linhagem utilizando tanto plasmídeo linear como circular.

## 7 PERSPECTIVAS

- Verificar a eficiência de transfecção através da quantificação da  $\beta$ -galactosidase expressa e avaliar a reprodutibilidade da técnica;
- Otimizar a técnica de transfecção com outros parâmetros, tais como tempo de incubação e diferentes lipídios catiônicos;
- Realizar transfecções com diferentes plasmídeos e culturas de células;
- Utilizar outras ferramentas, tal como Microscopia Eletrônica associada à Imuno-histoquímica, para tentar identificar o mecanismo de transfecção nesta técnica;
- Verificar a sua aplicação *in vivo*, através da imunização de camundongos com um plasmídeo complexado com o DDAB.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, N.; HOGENESCH, H.; GUO, P.; NORTH, A.; SUCKOW, M.; MITTAL, S.K. Biodegradable alginate microspheres as a delivery system for naked DNA. **Canadian Journal Veterinary Research**. v.63, n.2, p.148-152, 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p.488-489, 1997.

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

ANDERSON, W.F. Prospects for human gene therapy. **Science**. v.226, p.401-409, 1984.

AUSUBEL, F.M. **Current protocols in molecular biology**. Wiley Interscience, New York, 1991.

AXELROD, H.R.; SOFIA, M.J.; WALKER, S. Chemistry and cellular aspects of cationic facial amphiphiles. **Advances in Drug Delivery Reviews**. v.30, p.61-71, 1998.

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, 2003.

BALLY, M. B.; ZHANG, Y.P.; WONG, F. M.P.; KONG, S.; WASAN, E.; REIMER, D.L. Lipid/DNA complexes as an intermediate in the preparation of particles for gene transfer: an alternative to cationic liposome/DNA aggregates. **Advances in Drug Delivery Reviews**. v.24, p. 275-290, 1997.

BALLY, M.B.; HARVIE, P.; WONG, F.M.; KONG, S.; WASAN, E.K.; REIMER, D.L. Biological barriers to cellular delivery of lipid-based DNA carriers. **Advances in Drug Delivery Reviews**. v.38, n.3, p.291-315, 1999

BALLY, M.B.; ZHANG, Y.P.; WONG, F.M.P.; KONG, S.; WASAN, E.; REIMER, D.L. Lipid/DNA complexes as an intermediate in the preparation of particles for gene transfer: an alternative to cationic liposome/DNA aggregates. **Advances in Drug Delivery Reviews**. v.24, p.275-290, 1997.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**. v.8, p.660-668, 1964.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; MILLER, N. Cation permeability of phospholipid model membranes: effects of narcotics. **Nature**. v.208, p.1295-1297, 1965a.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**. v.13, p.238-252, 1965b.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; MILLER, N. preparation and use of liposomes as models of biological membranes. **Methods in Membrane Biology**. v.I, p.1-8, Korn, E.D., Ed. New York: Plenum Press, 1974.

BARBANTI-BRODANO, G. & FIUME, L. Selective killing of macrophages by amanitin-albumin conjugates. **Nature**. v. 243, p.281-283, 1973.

BARCHFELD, G.L.& DEAMER, D.W. The effect of general anesthetics on the proton and potassium permeabilities of liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.819, p.161-169, 1985.

BARRY, M.A. & JOHNSTON, S.A. Biological features of genetic immunization. **Vaccine**. v.15, n.8, p. 788-791, 1997.

BATZRI, S. & KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.298, p.1015-1019, 1975.

BEHR, J.P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. **Bioconjugate Chemistry**. v.5, p.382-389, 1994.

BEHR, J.P.; DEMENEIX, B.; LOEFFLER, J.P.; PEREZ-MUTUL, J. Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**. v.86, n.18, p.6982-6986, 1989.

BHATTACHARYA, S. & MANDAL, S.S. Interaction of surfactants with DNA. Role of hydrophobicity and surface charge on intercalation and DNA melting. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1333, p.29-44, 1997.

BLAESE, R.M. The ADA Human Gene Therapy Clinical Protocol. **Human Gene Therapy**. v.1, n.3, p.327, 1990.

BLAESE, R.M.; CULVER, K.W.; MILLER, A.D.; CARTER, C.S.; FLEISHER, T.; CLERICI, M.; SHEARER, G.; CHANG, L.; CHIANG, Y.; TOLSTOSHEV, P.; GREENBLATT, J.J.; ROSENBERG, S.A.; KLEIN, H.; BERGER, M.; MULLEN, C.A.; RAMSEY, W.J.; MUUL, L.; MORGAN, R.A.; ANDERSON, W.F. T Lymphocyte-Directed gene therapy for ADA<sup>-</sup> SCID: initial trial results after 4 years. **Science**. v.270, p.475-479, 1995.

BLYTHMAN, H.; CESELLAS, P.; GROS, O.; GROS, P.; JANSEN, F.K.; PAOLUCCI, B.P.; VIDAL, H. Immunotoxins: hybrids molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells. **Nature**. v.290, p.145-146, 1981.

BOWERSOCK, T.L.; HOGENESCH, H.; SUCKOW, M.; GUIMOND, P.; MARTIN, S.; BORIE, S.; TORREGROSA, S.; PARK, I.I.; PARK, K. Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. **Vaccine**. v.17, p.1804-1811, 1999.

BURTON, E.A.; WECHUCK, J.B.; WENDELL, S.K.; GODIS, W.F.; FINK, D.J.; GLORIOSO, J.C. Multiple applications for replication-defective Herpes Simplex Virus vectors. **Stem Cells**. v.19, p.358-377, 2001.

CAMPBELL, M.J. Lipofection reagents prepared by a simple ethanol injection technique. **BioTechniques**. v.18, n.6, p.1027-1032, 1995.

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

CAPECCHI, M.R. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. **Trends in Genetics**. v.5, p.70, 1989.

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.

CIFTCI, K.& TROVITCH, P. Applications of genetic engineering in veterinary medicine. **Advances in Drug Delivery Reviews**. v.43, n.1, p.57-64, 2000.

CLERC, P.; AILLAN-BARREAU, C.; DESBOIS, C.; PRADAYROL, L.; FOURMY, D.; DUFREY, M. Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas. **Pharmacology & Toxicology**. v.91, n.6, p.321-326, 2002.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; CHEEVERS, W.P.; CORK, L.C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**. v.207, p.997-999. 1980.

CURIEL, D.T.; AGARWAL, S.; WAGNER, E.; COTTEN, M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.88, n.19, p.8850-8854, 1991.

DAVIS, H.L.; MICHEL, M.L.; MANCINI, M.; SCHLEEF, M.; WHALEN, R.G. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. **Vaccine**. v.12, n.16, p.1503-1509, 1994.

DAVIS, H.L.; MICHEL, M.L.; WHALEN, R.G. Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. **Annals of the New York Academy of Science**. v.772, p.21-29, 1995.

DAVIS, H.L.; WHALEN, R.G.; DEMENEIX, B.A. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. **Human Gene Therapy**. v.4, n.2, p.151-159, 1993.

DELLAIRE, G.; YAN, J.; LITTLE, K.C.; DROUIN, R.; CHARTRAN, P. Evidence that extrachromosomal double-strand break repair be coupled to the repair of chromosomal double-strand break mammalian cells. **Chromosoma**. v.115, n.5, p.304-312, 2002.

DEAMER, D.& BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.443, p.629-634, 1976.

DIMITRIADIS, G.J. translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. **Nature**. v.274, p.923-924, 1978.

DRISCOLL, M. & GERSTBREIN, B. Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. **Nature Reviews. Genetics**. v.4, n.3, p.181-194, 2003.

EVEN-CHEN, S.; BARENHOLZ, Y.; DOTAP cationic liposomes prefer relaxed over supercoiled plasmids. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1509, p.176-188, 2000.

FARHOOD, H.; BOTTEGA, R.; EPAND, R. M.; HUANG, L. Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. **Biochimica et Biophysica Acta** . v.1111, n.2, p.239-246, 1992.

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.

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, USA**. v.84, p.7413-7417, 1987.

FELGNER, P.L.; RINGOLD, G.M. Cationic liposome-mediate transfection. **Nature**. v.337, n.6205, p.387-388, 1989.

FRALEY, R.T.; FORNARI, C.S.; KAPLAN, S. Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.76, n.7, p.3348-3352, 1979.

FRIEDMANN, T. Overcoming the obstacles to gene therapy. **Scientific American**. v.276, p.80-85, 1997.

FYNAN, E.F.; ROBINSON, H.L.; WEBSTER, R.G. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. **DNA Cellular Biology**, v.12 p.785-789, 1993.

FYNAN, E.F.; WEBSTER, R.G.; FULLER, D.H.; HAYNES, J.R.; SANTORO, J.C.; ROBINSON, H.L. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.90, p.11478-11482, 1993.

GAO, X. & HUANG, L. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.179, n.1, p.280-285, 1991.

GHOSH, M.; GHOSH, K.; COHEN, J.S. Translation inhibition by phosphorothioate oligodeoxynucleotides in cell-free systems. **Antisense Research and Development**. v.2, p.111-118, 1992.

GHOSH, Y.K.; VISWESWARIAH, S.S.; BHATTACHARYA, S. Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency. **FEBS Letters**. v.473, n.3, p.341-344, 2000.

GOINS, W.F.; LEE, K.A.; CAVALCOLI, J.D. Herpes simplex virus type 1 vector-mediated expression of nerve growth factor protects dorsal root ganglion neurons from peroxide toxicity. **Journal of Virology**. v.73, p.519-532, 1999.

GRAHAM, F.L. AND VAN DER EB, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**. v. 52, p. 456, 1973.

GREGORADIS, G.; SAFFIE, ROGHIEH, S.; BRIEN DE SOUZA, J. Liposome-mediated DNA vaccination. **FEBS Letters**. v.402, p.107-110, 1997.

GREGORIADIS, G.; SAFFIC, R.; HART, S.L. **Journal Drug Targetting**. v.3, p.467-475. 1996.

HAMMER, R.E.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene. **Nature**. v.311, n.5981, p.65-67, 1984.

HASSETT, D.E. & WHITTON, J.L. DNA immunization. **Trends in Microbiology**. v.4, n.8, p.307-312, 1996.

HAWLEY-NELSON P.; CICCARONE, V.; GEBEYEHU, G.; JESSEE, J.; FELGNER, P.L. LipofectAMINE reagent: a new higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. **Focus**. 15, p.73-79, 1993.

HAWLEY-NELSON, P.; CICCARONE, V.; GEBEYEHU, G.; JESSE, J.; FELGNER, P.L. Lipofectamine Reagent: A new Higher Efficiency Polycationic Liposome Transfection Reagent. **Focus**. v.15, p.73-79, 1993.

HERZOG, R.W.; YANG, E.Y.; COUTO, L.B.; HAGSTROM, J.N.; ELWELL, D.; FIELDS, P.A.; BURTON, M.; BELLINGER, D.A.; READ, M.S.; BRINKHOUS, K.M.; PODSAKOFF, G.M.; NICHOLS, T.C.; KURTZMAN, G.J.; HIGH, K.A. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. **Nature Medicine**. v.5, p.56-63, 1999.

HILBERT, A.K.; FRITZSCHE, U.; KISSEL, T. Biodegradable microspheres containing influenza A vaccine: immune response in mice. **Vaccine**. v.17, p.1065-1073, 1999.

HOFLAND, H. E.J.; SHEPHARD, L.; SULLIVAN, S. Formation of stable cationic lipid/DNA complexes for gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.93, p. 7305-7309, 1996.

HOWARD, M.K.; KERSHA, W. T.; GIBB, B.. High efficiency gene transfer to the central nervous system of rodents and primates using herpes virus vectors lacking functional ICP27 and ICP34.5. **Gene Therapy**. v.5, p.1137-1147, 1998.

JIANG, W.; BAKER, H.J.; SWANGO, L.J.; SCHORR, J.; SELF, M.J.; SMITH, B.F. Nucleic acid immunization protects dogs against virus challenge with virulent canine parvovirus. **Vaccine**. v.16, n.6, p.601-607, 1998.

KASAHARA, N.; DOZY, A.M.; KAN, Y.W. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. **Science**. v.266, p.1373-1376, 1994.

KAY, M.A.; LIU, D.; HOOGERBRUGGE, P.M. Gene therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.94, p. 12744-12746, 1997.

KAWAURA, C.; NOGUCHI, A.; FURUNO, T.; NAKANISHI, M. Atomic force microscopy for studying gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative. **FEBS Letters**. v.421, p.69-72, 1998.

KIKUCHI, K.; IKEDA, H.; TSUCHIKAWA, T.; TSUJI, T.; TANAKA, S.; FUGO, K.; SUGA, K.; TANAKA, Y.; TATENO, M.; MARUYAMA, N.; YOSHIKI, T. A novel animal model of thymic tumour: development of epithelial thymoma in transgenic rats carrying human T lymphocyte virus type I pX gene. **International Journal of Experimental Pathology**. v.83, n.5, p.247-255, 2002.

KUHN, P. S.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Complex formation between polyelectrolytes and ionic surfactants. **Chemical Physics Letters**. v.298, p.51-56, 1998.

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

LAPPALAINEN, K.; MIETTINEN, R.; KELLOKOSKI, J.; JÄÄSKELÄINEN, I.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. Intracellular Distribution of Oligonucleotides Delivered by Cationic Liposomes: Light and Electron Microscopic Study. **The Journal of Histochemistry e Cytochemistry**. v.45, n.2, p. 265-274, 1997.

LAPPALAINEN, K.; URTTI, A.; SÖDERLING, E.; JÄÄSLELÄINEN, I.; SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1196, p.201-208, 1994.

LEAHY, P.; CARMICHAEL, G.G.; ROSSOMANDO, E.F. Transcription from plasmid expression vectors is increased up to 14-fold when plasmids are transfected as concatemers. **Nucleic Acids Research**. v.25, n.2, 1997.

LEVENTIS, R. SILVIUS, J.R. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.3123, n.1, p.124-132, 1990.

LITZINGER, D.C. & HUANG, L. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1113, p.201-227, 1992.

LOZIER, J.N.; THOMPSON, A.R.; HU, P.C.; READ, M.; BRINKHOUS, K.M.; HIGH, K.A.; CURIEL, D.T. Efficient transfection of primary cells in a canine hemophilia B model using adenovirus-polylysine-DNA complexes. **Human Gene Therapy**. v.5, n.3, p.313-322, 1994.

LUTHMAN, H & MAGNUSSON, G. High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. **Nucleic Acids Research**. v.11, n.5, p.1295-1308, 1983.

MANN, R.; MULLIGAN, R.C.; BALTIMORE, D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. **Cell**. v.33, p.153, 1983.

McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H. Immunodiagnosis of Ehrlichia canis infection with recombinant proteins. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.1, p.325-322, 2001.

MISKIMINS, W.K. & SHIMIZU, N. Genetics of cell surface receptors for bioactive polypeptides: variants of Swiss/3T3 fibroblasts resistant to a cytostatic chimeric insulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.** v.78, p.445-449, 1981.

MORIUCHI, S.; KRISK, Y.D.M.; MARCONI, P.C. HSV vector cytotoxicity is inversely correlated with effective TK/GCV suicide gene therapy of rat gliosarcoma. **Gene Therapy.** v.7, p.1483-1490, 2000.

MUZICZKA, N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. **Currents Topics in Microbiology and Immunology.** v.158, p.97-129, 1992.

NAKANISHI, M. & NOGUCHI, A. Confocal and probe microscopy to study gene transfection mediated by cationic liposomes with a cationic cholesterol derivative **Advances in Drug Delivery Reviews.** v.52, n.3, p.197-207, 2001.

NALDINI, L.; BLÖMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F.H.; VERMA, I.M.; TRONO, D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. **Science.** v.272, p.263-267, 1996.

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.

OKAYAMA, R.; NOJI, M.; NAKANISHI, M. Cationic cholesterol with a hydroxyethylamino head group promotes significantly liposome-mediated gene transfection. **FEBS Letters.** v.408, n.2, p.232-234, 1997.

ORRANTIA, E.; CHANG, P.L. Intracellular distribution of DNA internalized through calcium phosphate precipitation. **Experimental Cell Research.** v.2, p.170-174, 1990.

OSTRO, M.J.; GIACOMONI, D.; LAVALLE, D.; PAXTON, W.; DRAY, S. Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome-mediated insertion into a human cell line. **Nature.** v.274, p.921-923, 1978.

PAGANO, R.E. & WEINSTEIN, J.N.; Interactions of liposomes with mammalian cells. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering.** v.7, p.435-468, 1978.

PIRZADEH, B.; DEB, S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal of General Virology.** v.79, p.989-999, 1998.

PURCELL, D.F.; BROSCIOUS, C.M.; VANIN, E.F.; BUCKLER, C.E.; NIENHUIS, A. W.; MARTIN, M.A. An array of murine leukemia virus-related elements is transmitted and expressed in a primate recipient of retroviral gene transfer. **Journal of Virology.** v.70, n.2, p.887-897, 1996.

QUINTIN-COLONNA, F.; DEVAUCHELLE, P.; FRADELIZI, D.; MOUROT, B.; FAURE, T.; KOURILSKY, P.; ROTH, C.; MEHTALI, M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. **Gene Therapy.** v.3, n.12, p.1104-1112, 1996.

RÄDLER, 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, n.5301, p.810-814, 1997.

REID, T.; WARREN, R.; KIRN, D. Intravascular adenoviral agents in cancer patients: Lesson from clinical trials. **Cancer Gene Therapy**. v.9, n.12, p.979-986, 2002.

REMY, J.S.; SIRLIN, C.; VIERLIN, P.; BEHR, J.P. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. **Bioconjugate Chemistry**. v.5, p.647-654, 1994.

ROPERT, C. Liposomes as a gene delivery system. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.32, n.2, p.163-169, 1999.

ROSE, J.K.; BUONOCORE, L.; WHITT, M.A. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. **Biotechniques**, v.10, n.4, p.520-525, 1991.

SALZMAN, N.H.; GHOSH, D.; HUTTNER, K.M.; PATERSON, Y.; BEVINS, C.L. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. **Nature**. v.422, p.438-439, 2003.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**, 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989.

SAUNDERS, L.; PERRIN, J.; GAMMACK, D.B. Aqueous dispersion of phospholipids by ultrasonic radiations. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.14, p.567-572, 1962.

SCHAFFER, D.V. & LAUFFENBURGER, D.A.; Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. **Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n.8, p.004-009, 1998.

SMITH, J.G.; WALZEM, R.L.; GERMAN, J. B. Liposomes as agents of DNA transfer. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1154, p.327-340, 1993.

SNYDER, R.O.; MIAO, C.; MEUSE, L.; TUBB, J.; DONAHUE, B.A.; LIN, H.F.; STAFFORD, D.W.; PATEL, S.; THOMPSON, A.R.; NICHOLS, T.; READ, M.S.; BELLINGER, D.A.; BRINHOUS, K.M.; KAY, M.A. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. **Nature Medicine**. v.5, p.64-70, 1999.

SON, K.K.; PATEL, D.H.; TKACH, D.; PARK, A. Cationic liposome and plasmid DNA complexes formed in serum-free medium under optimum transfection condition are negatively charged. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1466, p.11-15, 2000.

SPRADLING, A.C. & RUBIN, G.M. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. **Science**. v.218, n.4570, p.341-347, 1982.

STEIN, C.A. & CHENG, Y.C. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - Is the bullet really magical. **Science**. v.261, p.1004-1012, 1993.

STEIN, C.A.; TONKINSON, J.; YAKUBOC, L. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides-anti-sense inhibitors of gene expression?. **Pharmacology & Therapeutics**. v.52, p.365, 1991.

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

TELLING, G.C.; SCOTT, M.; HSIAG, K.K.; FOSTER, D.; YANG, S.; TORCHIA, M.; SIDLE, K.C.L.; COLLINGE, J.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, B. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.91, p.9936-9940, 1994.

THIERRY, A.R. & DRITSCHILO; A. Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated . **Nucleic Acids Research**. v.20, p.5691-5698, 1992.

VAHERI, A. AND PAGANO, J.S. Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. **Virology**. v.27, p.434, 1965.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; BRAUN, R.P.; LEWIS, P.J.; KARVONEN, B.C.; BABIUK, L.A.; GRIEBEL, P.J. Immunization of neonates with DNA encoding a bovine herpesvirus glycoprotein is effective in the presence of maternal antibodies. **Viral Immunology**. v.12, n.1, p.67-77, 1999.

VAN DRUNEN LITTEL-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-VAN DEN HURK, L.; BRAUN, R.P.; LEWIS, P.J.; KARVONEN, B.C.; BACA-ESTRADA, M.E.; SNIDER, M.; MCCARTNEY, D.; WATTS, T.; BABIUK, L.A. Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. **Journal of General Virology**. v.79, p. 831-839, 1998.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.V. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2606-2615, 1992.

VERMA, I.M. & SOMIA, N. Gene therapy- promises, problems and prospects. **Nature**. v.389, p.239-242, 1997.

WAGNER, R.W.; MATTEUCCI, M.D.; LEWIS, J.G.; GUTIERREZ, A.J.; MOULDS, C.; FROEHLER, B.C. Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. **Science**. v.260, p.1510, 1993.

WALKER, S.; SOFIA, M.J.; AXELROD, H.R. Chemistry and cellular aspects of cationic facial amphiphiles. **Advance in Drug Delivery Reviews**. v.30, p.61-71. 1998.

WALKER, S.; SOFIA, M.J.; KAKARLA, R.; KOGAN, N.A.; WIERICHS, L.; LONGLEY, C.B.; BRUKER, K.; AXELROD, H.R.; MIDHA, S.; BABU, S.; KAHNE, D. Cationic facial amphiphiles: A promising class of transfection agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.** v.93, p.1585-1590, 1996.

WANG, B.; UGEN, K.E.; SRIKANTAN, V.; AGADJANYAN, M.G.; DANG, K.; REFAELI, Y.; SATO, A.I.; BOYER, J.; WILLIAMS, W.V.; WEINER, D.B. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.** v.90, p.4156-4160, 1993.

WARRANT, R.W. & KIM, S.H. Alpha-Helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine-transfer RNA complex and a nucleoprotamine model. **Nature.** v.271, n.5641, p.130-135, 1978.

WEINTRAUB, H.; CHENG, P.F.; CONRAD, K. Expression of transfected DNA depends on DNA topology. **Cell.** v.46, p.115-122. 1986.

WEISS, W.A.; BURNS, M.J.; HACKETT, C.; ALDAPE, K.; HILL, J.R.; KURIYAMA, H.; KURIYAMA, N.; MILSHTEYN, N.; ROBERTS, T.; WENDLAND, M.F.; DEPINHO, R.; ISMAEL, M.A. Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. **Cancer Research.** v.63, p.1589-1595, 2003.

WILSON, S.P. & SMITH, L.A. Addition of glycerol during DNA exposure enhances calcium phosphate transfection. **Analytical Biochemistry.** v.246, n.1, p.148-150, 1997.

WILSON, S.P.; YEOMANS, D.C.; BENDER, M.A. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.** v.96, p.3211-3216, 1999.

WOLFF, J.A.; MALONE, R.W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P.L. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. **Science.** v. 247, p.1465-1468, 1990.

YAMADA, M.; OLIGINO, T.; MATA, M. Herpes simplex virus vector-mediated expression of Bcl-2 prevents 6-hydroxydopamine induced degeneration of neurons in the substantia nigra *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.** v.96, p.4078-4083, 1999.

YASWEN, P.; STAMPFER, M.R.; GHOSH, K.; COHEN, J.S. Effects of sequence of thioated oligonucleotides on cultured human mammary epithelial cel. **Antisense Research and Development.** v.3, p. 67-77, 1993.

YOU J, KAMIHIRA M, IJIMA S. Enhancement of transfection efficiency by protamine in DDAB lipid vesicle-mediated gene transfer. **Journal of Biochemistry.** v. 125, n.6, p.1160-1177, 1999.

YOU, J.; KAMIHIRA, M.; IJIMA, S. Enhancement of transfection efficiency by protamine in DDAB lipid vesicle-mediated gene transfer. **Journal of Biochemistry.** v.125, n.6, p.1160-1177, 1999.

XI, T.D.; TSONG, T.Y. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. V. Effects of DNA topology on surface binding, cell uptake, expression, and integration into host chromosomes os DNA in the mammalian cell. **Biophysica Journal**. v.65, n.4, p.1684-1689, 1993.

ZAMECNIK, P.C. & STEPHENSON, M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replicaion and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v.75, p. 280-284, 1978.

ZHOU, X. & HUANG, L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1189, p.195-203, 1991.

**ANEXO 1****SOLUÇÕES****a) Solução de Tripsina Versene 10x (Solução para estoque)**

Cloreto de Sódio (NaCl)	80 g
Cloreto de Potássio (KCl)	4 g
Dextrose	10 g
Bicarbonato de Sódio	5,8 g
Tripsina	5 g
EDTA	2 g
Vermelho de Fenol (0,5%)	4 mL
Penicilina	1.000.000 UI
Estreptomicina	1.000 mg
Amphotericina B	25 mg
Água destilada	q.s.p 1000 mL

Para solução em uso diluir 50mL da solução estoque em 450mL de água destilada.

**b) Meio LB ( Luria - Bertani)**

Bacto triptone	10 g
Bacto yeast ext reac	5 g
Cloreto de Sódio	10 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

**c) Meio SOC**

Bacto-tryptone	20 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	0,5 g
KCl 250mM	10 mL
MgCl <sub>2</sub> 2M	5 mL
Glucose 1M	20 mL
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

## ANEXO 2

### TÉCNICA PARA PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDEAL POR POLIETILENOGLICOL A 13% (PEG 13%), DE ACORDO COM PROMEGA BIOTEC.

⇒ Semear uma colônia da bactéria de interesse em 2,5 ml de meio LB + 2,5 µL de ampicilina (50 µg/mL). Deixar *o.n.* (agitando em 37°C, shaker, 180 – 200 rpm)

⇒ Passar os 2,5 mL do LB com o crescimento bacteriano para um Erlenmeyer com 250 mL de LB +250 µL de ampicilina. Deixar O.N. (agitando em 37°C, shaker, 180 – 200 rpm).

⇒ Centrifugar a 5000 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C durante 15 min. Ressuspender o pellet em 6 mL da seguinte solução gelada:

25 mM Tris-HCl pH7,5  
10 mM de EDTA  
15% sacarose  
2 mg/mL de lisozima  
+ 12 mg de lisozima

⇒ Incubar em gelo por 20 min;

⇒ Adicionar 12 mL NaOH 0,2M c/ 1% de SDS. Misturar cuidadosamente por inversão e incubar por 10 min;

⇒ Adicionar 7,5 mL de NaCOOCH<sub>3</sub> 3 M pH 4,6. Misturar cuidadosamente por inversão e incubar em gelo por 20min;

⇒ Centrifugar por 30 min a 15.000 rpm. Remover o sobrenadante (SN) para outro tubo (FALCON) e adicionar a este SN, 50 µL de RNAase (1mg/mL), incubar por 30 min a 37°C;

⇒ Fazer duas extrações FENOL-CLOROFÓRMIO (vol/vol; 3500 rpm, 10). A seguir, passar o SN para tubos COREX e adicionar 2 vol de etanol absoluto para precipitar o DNA;

⇒ Centrifugar durante 15 min a 8000 rpm;

⇒ Dissolver o *pellet* em 1,6 mL de água Milliq;

⇒ Adicionar 0,4 mL de NaCl 4 M e misturar. Depois adicionar 2mL de PEG 13%, misturar. Incubar no gelo por 1 hora;

⇒ Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min.

⇒ Remover o SN e lavar o *pellet* com etanol 70% (colocar 1 mL de etanol 70%, centrifugar e retirar o SN. Deixar secar o *pellet* e dissolvê-lo em um volume apropriado de T.E. pH8,0 (200 a 500 µL) em eppendorf. Congelar em freezer - 20°C.



## ANEXO 4

### REALIZAÇÃO DE PCR PARA A DETECÇÃO DE *Mycoplasma spp.*

Com o objetivo de verificar se as células de PFB estavam contaminadas com *Mycoplasma spp.*, o qual interfere na coloração com X-gal após a transfecção, realizou-se a técnica de PCR para verificar a presença de DNA de micoplasma nas células.

#### Extração de DNA

Obteve-se uma monocamada de células de PFB em uma garrafa de 150cm<sup>2</sup>, as células foram individualizadas com VT, centrifugadas a 1200g por 10 min e o sedimento de células foi utilizado para a extração de DNA com DNAzol<sup>®</sup> (GIBCO) de acordo com o protocolo do fabricante.

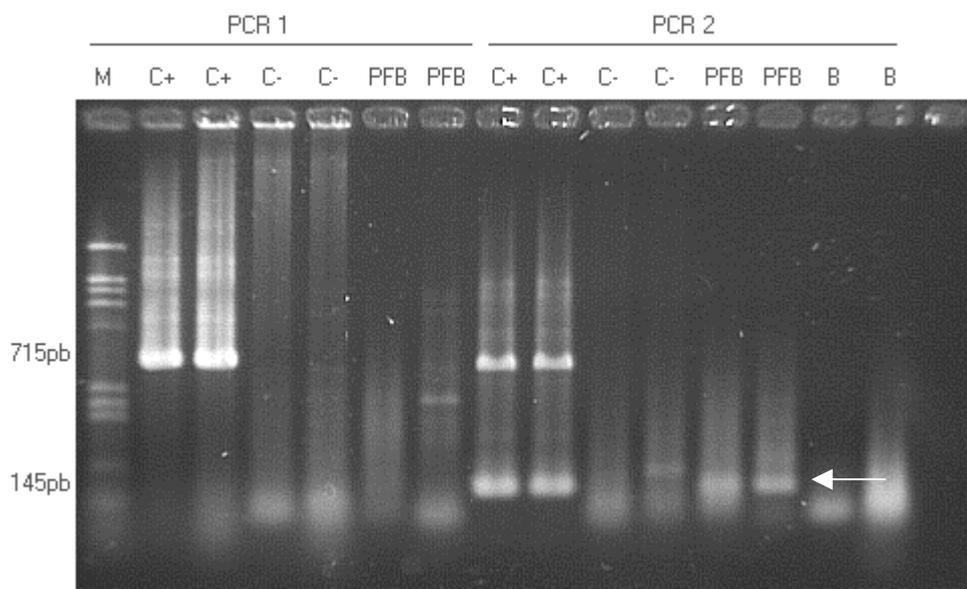
#### Técnica de PCR

A técnica de PCR foi realizada segundo van Kuppeveld *et al.* (1992). Para a realização da primeira reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos GPO-1 (5'-ACTCCTACGGGAGCAGCAGTA-3') e MGSO (5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'). As condições de reação (temperatura e tempo) foram: 40 ciclos constituídos de 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 2 min para a obtenção de um produto da amplificação de 715 pb. Uma segunda reação de PCR foi realizada utilizando novamente o oligonucleotídeo MGSO junto com GPO-2 (5'-CTTAAAGGAATTGACGGGAACCCG-3'). As condições foram: 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 45 seg e 72°C por 45 seg e o produto da amplificação é de 145 pb. Para cada reação foram utilizados 2,5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase; dNTPs 0,2 mM; Tris.HCl pH 8,0 10 mM; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM.; 100 ng de cada oligonucleotídeos e o DNA das amostras (na primeira PCR foram feitas duas reações diferentes com cada amostra, uma foi utilizado 5 µL de DNA e na outra 10 µL; na segunda PCR foi utilizado 2 µL do produto da primeira PCR).

Os produtos obtidos na amplificação foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 0,05% (BET) e visualizados em fonte transluminadora de luz ultra violeta.

### Realização de PCR para a detecção de micoplasma nas células de PFB

A análise do produto da “hemi nested” PCR para a detecção de micoplasma apresentou o fragmento de 145 pb referente a região do genoma do micoplasma, comprovando a contaminação das células com micoplasma (Fig. 15).



**Figura 15** – Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo com o produto amplificado após a realização da primeira PCR (PCR 1) e da segunda PCR (PCR 2) para a detecção de DNA de *Mycoplasma spp* nas células de PFB. **M**: marcador (BSSK); **C+**: controle positivo; **C-**: controle negativo; **PFB**: produto das células de PFB; **B**: branco. Em cada amostra tem duas colunas sendo que a primeira é da reação que partiu com um volume de 5  $\mu$ L e na segunda de 10  $\mu$ L da preparação de DNA.